

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 623**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/64** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008 E 16167534 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3078743**

54 Título: **Antídotos para inhibidores del factor Xa y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**28.09.2007 US 976343 P**

**20.08.2008 US 90574 P**

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

**27.11.2020**

73 Titular/es:

**PORTOLA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**

**270 East Grand Avenue, Suite 22**

**South San Francisco, California 94080, US**

72 Inventor/es:

**LU, GENMIN;**

**PHILLIPS, DAVID R.;**

**ANDRE, PATRICK y**

**SINHA, UMA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 796 623 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Antídotos para inhibidores del factor Xa y procedimientos de uso de los mismos

### 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de derivados del factor Xa (fXa) que tienen actividad procoagulante intrínseca reducida o carecen de ella pero también son capaces de unirse a y/o neutralizar inhibidores de fXa actuando de este modo como antídotos para anticoagulantes dirigidos a fXa.

10

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los anticoagulantes atienden una necesidad en el mercado en el tratamiento o la prevención de trombosis no deseada en pacientes con una tendencia a formar coágulos de sangre, tales como, por ejemplo, aquellos pacientes que tienen trastornos de coagulación, confinados a periodos de inmovilidad o que se están sometiendo a cirugías médicas. Una de las principales limitaciones de la terapia anticoagulante, sin embargo, es el riesgo de hemorragia asociado con los tratamientos, y limitaciones en la capacidad de invertir rápidamente la actividad anticoagulante en caso de sobredosis o si se requiere un procedimiento quirúrgico urgente. Por lo tanto, antídotos específicos y eficaces para todas las formas de terapia anticoagulante son altamente deseables. Por consideraciones de seguridad, también es ventajoso tener un par anticoagulante-antídoto en el desarrollo de nuevos fármacos anticoagulantes.

Los pares anticoagulante-antídoto disponibles actualmente para sobreanticoagulación son heparina - protamina y warfarina - vitamina K. Plasma fresco congelado y factor VIIa recombinante (rfVIIa) también se han usado como antídotos inespecíficos en pacientes en tratamiento con heparina de bajo peso molecular, que padecen traumatismo grave o hemorragia grave. (Lauritzen, B. y col., Blood, 2005, 607A-608A). También se describen fragmentos de protamina (patente de Estados Unidos N.º 6.624.141) y pequeños péptidos sintéticos (patente de Estados Unidos N.º 6.200.955) como heparina o antídotos de heparina de bajo peso molecular; y muteínas de trombina (patente de Estados Unidos N.º 6.060.300) como antídotos para inhibidor de trombina. Intermedios y derivados de protrombina se han descrito como antídotos para hirudina y trombina sintética (patentes de Estados Unidos N.º 5.817.309 y 6.086.871).

Una forma prometedora de terapia anticoagulante se dirige al factor Xa (fXa), y de hecho, varios inhibidores de fXa directos están actualmente en diferentes fases de desarrollo clínico para uso en terapia anticoagulante. Muchos de estos son moléculas pequeñas. Aunque estos nuevos inhibidores de fXa se muestran prometedores para el tratamiento, aún se necesitan antídotos específicos y eficaces. En el caso de sobreanticoagulación o requisito de cirugía en pacientes tratados con estos inhibidores de fXa, puede requerirse un agente para neutralizar sustancialmente el inhibidor o inhibidores de fXa administrados y restaurar la hemostasia normal.

Los agentes disponibles actualmente, tales como el factor VIIa recombinante (rfVIIa), están mecánicamente limitados y son inespecíficos para la inversión de inhibidores de fXa y, por lo tanto, opciones mejoradas para el facultativo son altamente deseables. En estudios en ser humano, rfVIIa se ha usado para invertir el efecto de inhibidores de fXa dependientes de antitrombina III indirectos, tales como fondaparinux e idraparinux (Bijsterveld, NR y col., Circulation, 2002, 106: 2550-2554; Bijsterveld, NR y col., British J. of Haematology, 2004(124): 653-658). El mecanismo de acción del factor VIIa (fVIIa) es actuar con el factor tisular para convertir el factor X (fX) presente en la circulación sanguínea en fXa para restaurar la hemostasia normal el pacientes. Este modo de acción dicta necesariamente que la concentración potencial más elevada de fXa que podría alcanzarse para neutralizar inhibidores de fXa dirigidos al sitio activo está limitada por la concentración plasmática circulante de fX. Por lo tanto, el potencial de usar rfVIIa para invertir el efecto de inhibidores de fXa directos está mecánicamente limitado. Dado que la concentración plasmática circulante de fX es 150 nanomolar ("nM"), la cantidad máxima de fXa producida por este modelo sería de 150 nM. Por lo tanto, el potencial de uso de rfVIIa para invertir el efecto de inhibidores de fXa directos está mecánicamente limitado. Las concentraciones terapéuticas descritas de inhibidores de fXa de molécula pequeña tales como rivaroxaban han sido mayores (aproximadamente 600 nM, Kubitzka D, y col., Eur. J. Clin. Pharmacol., 2005, 61: 873-880) que la cantidad potencial de fXa generada por rfVIIa. El uso de rfVIIa para la inversión de niveles terapéuticos o supratrapéuticos de anticoagulación mediante inhibidor de fXa proporcionaría, por lo tanto, niveles inadecuados de eficacia. Tal como se muestra en la figura 4, el uso de rfVIIa tiene un efecto limitado en la neutralización de la actividad anticoagulante de un inhibidor del factor Xa betrixaban (descrito a continuación). El fVIIa recombinante mostraba una actividad de antídoto sensible a la dosis de 50 nM a 100 nM, pero el efecto se estabilizaba entre 100 nM y 200 nM, indicando que su efecto de antídoto está limitado por factores diferentes de su concentración. En todas las concentraciones de rfVIIa ensayadas, betrixaban seguía mostrando una inhibición en respuesta a la dosis de fXa, hasta aproximadamente el

75% de inhibición a una concentración de 250 nM. Esta observación es coherente con el mecanismo de acción propuesto de fVIIa. Esto también está apoyado por estudios que muestran que rfVIIa no invertía completamente el efecto inhibitorio de fondaparinux sobre los parámetros de generación de trombina y activación de protrombina. (Gerotiafas, GT, y col., Thrombosis & Haemostasis 2204(91): 531-537).

5

El fXa activo exógeno no puede administrarse directamente a un sujeto de una manera similar a rfVIIa. A diferencia de rfVIIa, que tiene una muy baja actividad procoagulante en ausencia de su cofactor, el factor tisular, el fXa nativo es una potente enzima y tiene un riesgo potencial de causar trombosis. Por lo tanto, el uso de rfVIIa o fXa activo como antídoto para una terapia anticoagulante de fXa presenta desventajas.

10

Por lo tanto, existe una necesidad de agentes antídoto mejorados que no causen trombosis no deseada y que sean eficaces en neutralizar sustancialmente la actividad anticoagulante de un inhibidor de fXa en caso de una sobredosis del inhibidor de fXa o en caso de que sea necesario restaurar la hemostasia normal para prevenir o detener una hemorragia.

15

### RESUMEN DE LA INVENCION

Se ha descubierto ahora que la administración de derivados modificados de proteínas de fXa son útiles como antídotos para anticoagulantes dirigidos a fXa. Los derivados modificados de proteínas de fXa no compiten con fXa para ensamblarse en el complejo de protrombinasa, sino que en su lugar se unen a y/o neutralizan sustancialmente los anticoagulantes, tales como inhibidores de fXa. Los derivados útiles como antídotos se modifican para reducir o eliminar actividades procoagulante y anticoagulante intrínsecas, mientras conservan la capacidad de unirse a los inhibidores. Se contempla que los derivados de la divulgación pueden incluir modificar el sitio activo, o cambiar o eliminar todo el dominio Gla de fXa, o diversas combinaciones de los mismos. Se contempla, además, que la modificación del dominio Gla reduce o elimina el efecto anticoagulante del derivado de fXa sobre la hemostasia normal, debido a que se sabe que un fXa de longitud completa modificado en el sitio activo es un anticoagulante.

Se contempla, además, que modificar el dominio EGF (delecionando o sustituyendo el dominio EGF1, EGF2, o ambos EGF1 y EGF2) del fXa proporciona un derivado útil para los procedimientos de esta divulgación. La modificación del dominio EGF puede realizarse en solitario o además de la modificación del dominio Gla.

El derivado conserva las características estructurales necesarias para unirse al anticoagulante (o inhibidor de fXa) dirigido a fXa. Mediante la unión del derivado, directa o indirectamente, al inhibidor, el inhibidor es sustancialmente neutralizado.

35

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un transportador y un polipéptido para uso en terapia donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de homología con la SEQ ID NO. 12, donde el polipéptido:

40

- (i) tiene actividad catalítica reducida;
- (ii) es capaz de unirse a un inhibidor del factor Xa; y
- (iii) no puede ensamblarse en el complejo de protrombinasa.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un transportador y un polipéptido bicatenario para uso en terapia donde el polipéptido bicatenario comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de homología con la SEQ ID NO. 13, donde el polipéptido:

45

- (i) tiene actividad catalítica reducida;
- (ii) es capaz de unirse a un inhibidor del factor Xa; y
- (iii) no puede ensamblarse en el complejo de protrombinasa.

50

En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un transportador y un polipéptido para uso en terapia donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de homología con la SEQ ID NO. 15, y que no incluye una cadena ligera de factor Xa pero contiene un dominio catalítico de serina proteasa presente en la cadena pesada, donde el polipéptido (i) tiene actividad catalítica reducida; y (ii) es capaz de unirse a un inhibidor del factor Xa.

55

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un transportador y un polipéptido para uso en terapia donde el polipéptido comprende un fragmento de cadena ligera de fXa que tiene la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.14 y un fragmento de cadena pesada de fXa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 15.

5 El derivado tiene las siguientes propiedades: bien actividad procoagulante reducida o bien ninguna; un dominio Gla modificado o eliminado; y un sitio activo modificado. El derivado de la invención se une selectivamente a, e inhibe, un inhibidor del factor Xa administrado de forma exógena neutralizando sustancialmente de este modo la actividad anticoagulante de un inhibidor de fXa. Diversas modificaciones adicionales a la proteína del factor Xa contempladas por la invención se encuentran en toda la descripción detallada.

10 Debe entenderse que los derivados contemplados por esta invención no son factor VIIa derivado de plasma, factor VIIa recombinante, plasma fresco congelado, concentrados del complejo de protrombina, o sangre completa.

15 Un aspecto de la presente invención es los derivados del factor Xa y composiciones que los contienen para uso en el tratamiento de pacientes que han recibido o están recibiendo terapia de sobreanticoagulación con un inhibidor del factor Xa o pacientes a los que se había administrado previamente un inhibidor del factor Xa y que necesitan entonces hemostasia, tal como la requerida por cirugía opcional o de urgencia. Las proteínas de fXa modificadas se distinguen de fXa de origen natural en que tienen actividad procoagulante intrínseca reducida o eliminada y no interferirán en la función fisiológica de fXa en la hemostasia, mientras siguen siendo capaces de unirse a y sustancialmente neutralizar inhibidores de fXa.

20 En otro aspecto, la proteína del factor Xa modificada se coadministra con un agente capaz de prolongar la semivida en plasma (o semivida en circulación) del derivado del factor Xa. En otro aspecto más, el antídoto está conjugado con un resto para prolongar su semivida en plasma.

25 También se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen el derivado del factor Xa que se une a (y/o sustancialmente neutraliza) el inhibidor del factor Xa pero no se ensambla en el complejo de protrombinasa. La composición farmacéutica comprende opcionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable.

30 En otro aspecto, esta divulgación proporciona un kit que comprende un inhibidor de fXa para uso anticoagulante y un antídoto para el inhibidor de fXa (o derivado del factor Xa) para uso cuando se necesita neutralización sustancial de la actividad anticoagulante del inhibidor de fXa.

35 Una realización de la invención se dirige a un polipéptido adecuado para uso en administración parenteral que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 12 o un polipéptido que tiene al menos el 80% de homología con la SEQ ID NO. 12, donde el polipéptido

- (i) tiene actividad catalítica reducida,
- (ii) es capaz de unirse al inhibidor del Factor Xa,
- (iii) no puede ensamblarse en el complejo de protrombinasa, y
- 40 (iv) comprende un dominio Gla modificado que carece de residuos de aminoácidos 6-39 de la SEQ ID NO. 3.

Otra realización se refiere a un polipéptido bicatenario adecuado para uso en administración parenteral que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 13 o un polipéptido que tiene al menos el 80% de homología con la SEQ ID NO. 13, donde el polipéptido

- 45 (i) tiene actividad catalítica reducida,
- (ii) es capaz de unirse al inhibidor del Factor Xa,
- (iii) no puede ensamblarse en el complejo de protrombinasa, y
- (iv) comprende un dominio Gla modificado que carece de residuos de aminoácidos 6-39 de la SEQ ID NO. 3.

50 Otra realización más se dirige a un polipéptido adecuado para uso en administración parenteral que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 15 o un polipéptido que tiene al menos el 80% de homología con la SEQ ID NO. 15, y que no incluye una cadena ligera de Factor Xa pero contiene un dominio catalítico de serina proteasa en la cadena pesada, donde el polipéptido (i) tiene actividad catalítica reducida; y (ii) es capaz de unirse a un inhibidor del factor Xa. Otra realización más se dirige a un polipéptido bicatenario que comprende un fragmento de cadena ligera de fXa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 14 y un fragmento de cadena pesada de fXa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 15.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un transportador y un polipéptido que se acaba

de describir.

También se proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido que se acaba de describir.

- 5 En el presente documento se proporciona, además, un conjugado peptídico que comprende un transportador enlazado covalente o no covalentemente a un polipéptido que se acaba de describir. El transportador puede ser un liposoma, una micela, un polímero farmacéuticamente aceptable, o un transportador farmacéuticamente aceptable.

Esta divulgación también se refiere a un anticuerpo que se une a un polipéptido que se acaba de describir. El anticuerpo es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. También está proporcionado por la divulgación un fragmento biológicamente activo del anticuerpo. El anticuerpo puede estar etiquetado de forma detectable. El anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) también es proporcionado por la divulgación como parte de una composición que comprende además un transportador.

15 En una realización por la divulgación, se proporciona un complejo anticuerpo-peptido que comprende el anticuerpo y un polipéptido que se une específicamente al anticuerpo. El polipéptido es el polipéptido contra el que se genera el anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

20 En otra realización de la divulgación, se proporciona un procedimiento para preparar un polipéptido de la invención que comprende expresar un polinucleótido que codifica el polipéptido en una célula huésped procariota o eucariota. La invención también proporciona un polipéptido bicatenario obtenible mediante el procedimiento. En una realización, la célula huésped es una célula eucariota y en particular es una célula de ovario de hámster chino. En una realización, la cadena pesada (SEQ ID NO. 15) se expresa en una célula procariota, tal como *E. coli*. En otra realización, el polipéptido está aislado.

En otra realización más de la divulgación, se proporciona una célula huésped procariota o eucariota aislada que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención. En una divulgación, la célula huésped está en una composición que comprende además un transportador.

30

En aún otra realización más, se proporciona una composición que comprende un derivado de fXa de la invención para uso en un procedimiento de prevención o reducción de hemorragia en un sujeto sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición que comprende un polipéptido de la invención y un transportador. Se proporciona, además, una composición que

35 comprende un derivado de fXa de la invención para uso en un procedimiento de unión selectivamente e inhibición de un inhibidor del factor Xa administrado de forma exógena en un sujeto sometido a terapia anticoagulante que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición recién descrita.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40

La figura 1 muestra esquemáticamente la estructura del dominio del factor X humano (SEQ ID NO. 1) mostrada en la tabla 1 tal como se describe en Leytus y col., *Biochem.*, 1986, 25, 5098-5102. La SEQ ID NO. 1 es la secuencia de aminoácidos de fX humano codificada por la secuencia de nucleótidos de fX humano (SEQ ID NO. 2) tal como se muestra en la tabla 2 conocida en la técnica anterior. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos traducida se describe en Leytus y col., *Biochem.*, 1986, 25, 5098-5102 y puede encontrarse en el GenBank, "NM\_000504" en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=89142731>>. La numeración de aminoácidos en esta secuencia se basa en la secuencia de fX. El precursor de fX humano (SEQ ID NO. 1) contiene una secuencia preprolíder (aminoácidos 1 a 40 de la SEQ ID NO. 1) seguida por secuencias correspondientes a la cadena ligera de fX (LC) (aminoácidos 41 a 179 de la SEQ ID NO. 1), el triplete RKR (aminoácidos 180 a 182 de la SEQ ID NO. 1) que se elimina durante la secreción de fX, y la cadena pesada de fX (aminoácidos 183 a 488 de la SEQ ID NO. 1) que contiene el péptido de activación (AP) (aminoácidos 183 a 234 de la SEQ ID NO. 1) y el dominio catalítico (aminoácidos 235 a 488 de la SEQ ID NO. 1).

50

La figura 2 (SEQ ID NO. 3) muestra la secuencia de aminoácidos de factor X humano maduro. La numeración de aminoácidos en esta figura se basa en la secuencia fX madura comenzando desde el extremo N de la cadena ligera de fX. El factor X circula en el plasma como una molécula bicatenaria enlazada por un puente disulfuro. La cadena ligera (LC) tiene 139 residuos de aminoácidos (aminoácidos 41 a 179 de la SEQ ID NO. 1) y contiene el dominio rico en ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla) (aminoácidos 1-45 de la SEQ ID NO. 3), incluyendo un corto apilamiento aromático (AS) (aminoácidos 40-45 de la SEQ ID NO. 3), seguido por dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico

55

(EGF) (EGF1: aminoácidos 46-84, EGF2: aminoácidos 85-128 de la SEQ ID NO. 3). La cadena pesada (HC) tiene 306 aminoácidos y contiene un péptido de activación de 52 aminoácidos (AP: aminoácidos 143-194 de la SEQ ID NO. 3) seguido por el dominio catalítico (aminoácidos 195-448 de la SEQ ID NO. 3). Los equivalentes de tríada catalítica a H57-D102-S195 en numeración de quimotripsina están ubicados en His236, Asp282 y Ser379 en la secuencia fX y 5 están subrayados (aminoácidos 236, 282 y 379 de la SEQ ID NO. 3).

La figura 3 muestra esquemáticamente la estructura del dominio de factor X humano maduro mostrada en la figura 2. La numeración de aminoácidos en esta figura se basa en la secuencia de fX maduro. Los sitios de escisión para digestión con quimotripsina para eliminar el fragmento que contiene el dominio Gla (aminoácidos 1-44 de la SEQ ID 10 NO. 3) y activación de fX para eliminar el péptido de activación están resaltados. La digestión con quimotripsina de fXa da como resultado un fXa sin dominio Gla que carece de los residuos de aminoácidos 1-44 (SEQ ID NO. 4).

La figura 4 muestra el efecto de concentraciones variables de fVIIa en presencia de factor tisular sobre la actividad anticoagulante de un inhibidor de fXa betrixaban (descrito a continuación) en un ensayo de generación de trombina 15 (expresada como unidades de fluorescencia relativa (RFU) (tal como se describe en el ejemplo 2)). Los datos muestran que una combinación de fVIIa y factor tisular fue incapaz de neutralizar completamente la actividad anticoagulante de un inhibidor de fXa, betrixaban, en concentraciones hasta 200 nM.

La figura 5 muestra que anhidro-fXa con su dominio Gla intacto invierte la inhibición de fXa por betrixaban en un sistema purificado que comprende fXa activo y betrixaban (círculo abierto), mientras que anhidro-fXa en solitario tiene actividad procoagulante despreciable (triángulo abierto) en comparación con fXa activo. La actividad cromógena de FXa se normalizó respecto a fXa activa en ausencia de cualquier inhibidor (cuadrado abierto). Esto se describe más exhaustivamente en el ejemplo 2. Los datos muestran que anhidro-fXa es inactivo hacia sustrato fXa aunque conserva la afinidad de unión al inhibidor de fXa. 25

La figura 6 muestra que el anhidro-fXa con dominio Gla intacto en la figura 5 es un potente inhibidor en ensayo de generación de trombina en plasma (expresada como unidades de fluorescencia relativa (RFU)) (tal como se describe en el ejemplo 2). Éste inhibía casi completamente la generación de trombina a aproximadamente 115 nM. Los datos muestran que anhidro-fXa sin modificación del dominio Gla no es adecuado para uso como un antídoto para el inhibidor 30 de fXa.

La figura 7 muestra la comparación de la actividad de coagulación de fXa activo en un formato de placa de 96 pocillos antes de la digestión con quimotripsina, y después de 15 minutos y 30 minutos de digestión con quimotripsina. Tal como se muestra en esta figura, el tiempo de coagulación (cambio de DO405) se retrasó significativamente después de que el fXa fuera digerido por quimotripsina durante 15 minutos y no se observó coagulación durante hasta 20 minutos cuando el fXa se digirió durante 30 minutos. Este resultado se usó también para establecer condiciones para digestión con quimotripsina de anhidro-fXa dado que no tienen ninguna actividad que pueda ser monitorizada durante la digestión. Esto se describe más exhaustivamente en el ejemplo 3. 35

La figura 8 muestra la afinidad de unión de des-Gla anhidro-fXa por un inhibidor del factor Xa betrixaban tal como se describe en el ejemplo 4. Los datos muestran que des-Gla anhidro-fXa, preparado mediante digestión quimotriptica de anhidro-fXa para eliminar el fragmento que contiene el dominio Gla (residuos 1-44), es capaz de unirse a betrixaban con afinidad similar a fXa nativo (fXa:  $K_i=0,12$  nM, des-Gla anhidro-fXa:  $K_d=0,32$  nM). 40

La figura 9 muestra la inversión de la actividad anticoagulante de concentraciones variables de betrixaban mediante la adición de un concentrado de 680 nM del antídoto (des-Gla anhidro-fXa) en un ensayo de generación de trombina del ejemplo 2. A la concentración de 680 nM, des-Gla anhidro-fXa fue capaz de producir restauración sustancialmente completa de actividad de fXa. 45

La figura 10 muestra la inversión de la actividad anticoagulante de 250 nM de betrixaban mediante concentraciones variables del antídoto (des-Gla anhidro-fXa) en ensayos de prolongación de la coagulación usando reactivo de aPTT en un formato de placa de 96 pocillos (tal como se describe en el ejemplo 3). Los datos muestran que el tiempo de coagulación era comparable al del plasma pobre en plaquetas de control cuando se usaron aproximadamente 608 nM del antídoto para neutralizar 250 nM del inhibidor de fXa betrixaban. 50

La figura 11 muestra el efecto sobre la actividad anticoagulante de enoxaparina (0,3125 - 1,25 U/ml) mediante 563 nM del antídoto (des-Gla anhidro-fXa) en ensayos de prolongación de la coagulación usando un reactivo de aPTT en un formato de placa de 96 pocillos, expresado como cambios en veces después de la normalización. El protocolo de ensayo se describe en el ejemplo 3. Los datos muestran que la adición de 563 nM del antídoto neutralizaba 55

significativamente la actividad de una heparina de bajo peso molecular, enoxaparina.

La figura 12 muestra el efecto del antídoto, des-Gla anhidro-fXa, sobre la actividad de trombina (5 nM) y su inhibición por 50 nM de argatroban, un inhibidor de trombina específico, en un ensayo cromógeno. Como se esperaba, el antídoto del inhibidor de fXa no afecta de forma detectable a la actividad trombina o su inhibición por el inhibidor específico argatroban a concentraciones hasta 538 nM. Esto se describe más exhaustivamente en el ejemplo 14.

La figura 13 muestra el efecto sobre la actividad anticoagulante de betrixaban 400 nM mediante concentraciones variables del antídoto, des-Gla anhidro-fXa, en un ensayo aPTT usando un temporizador de coagulación estándar. El protocolo de ensayo se describe en el ejemplo 3. Los datos muestran que el antídoto del inhibidor de fXa sustancialmente invierte la inhibición de fXa por 400 nM de betrixaban. Se estimó que la  $CE_{50}$  del antídoto era de aproximadamente 656 nM con betrixaban 400 nM.

La figura 14 muestra el mapa de la construcción de ADN para la expresión del mutante triple de fXa (SEQ ID NO. 12) en células CHO. ADN plasmídico se linealizó y se transfectó en células CHO dhfr(-). Las células se seleccionaron usando medios deficientes en tetrahidrofolato (HT) más metotrexato (MTX). Se cribaron clones estables para expresión de proteínas elevada mediante ELISA. El mutante triple de fXa se produjo en medio libre de suero y se purificó mediante combinación de columnas de intercambio iónico y afinidad. La numeración en el mapa se basaba en la secuencia de polinucleótidos que codifica fX humano, SEQ ID NO.1. Por ejemplo, una mutación de alanina en el sitio activo S419 (SEQ ID NO.1) es equivalente a la mutación en S379 (SEQ ID NO.3) de fX humano maduro descrita en toda la solicitud y más particularmente, en el ejemplo 7.

La figura 15 muestra una transferencia de Western de r-Antídoto purificado usando anticuerpos monoclonales que reconocen la cadena pesada y la cadena ligera de fX, respectivamente. Tras la reducción del puente disulfuro que conecta las cadenas ligera y pesada, la cadena pesada de r-antídoto migra a un peso molecular esperado similar al del fXa derivado de plasma. La delección de 6-39 aa en el dominio Gla de fXa mutante da como resultado una banda de peso molecular más bajo de la cadena ligera de r-antídoto en comparación con fXa normal.

La figura 16 muestra el nivel en plasma de betrixaban en ratones (n=7-10 por grupo) después de administración oral de betrixaban en solitario (15 mg/kg), o betrixaban (15 mg/kg) seguido por inyección intravenosa (300 µg, IV) de antídoto derivado de plasma (pd-antídoto) preparado de acuerdo con el ejemplo 1. El pd-antídoto se administró 5 minutos antes del punto temporal de 1,5 h, y muestras de sangre de ratón (0,5 ml) se extrajeron a 1,5, 2,0 y 4,0 h después de administración oral de betrixaban. Los niveles en plasma de INR en sangre completa, betrixaban y antídoto se analizaron. El nivel de betrixaban (Media±SEM) en plasma de ratón se representó gráficamente en función del tiempo para ratones después de 15 mg/kg (cuadrado abierto) y 15 mg/kg seguido por inyección del antídoto (círculo abierto). La correlación PK-PD del grupo tratado con antídoto en el punto temporal de 1,5 h (5 min después de la inyección del antídoto) se resumió en la tabla 13. Una única inyección del antídoto dio como resultado una reducción >50% de betrixaban funcional basándose en mediciones de INR. Esto se describe más exhaustivamente en el ejemplo 8.

La figura 17 muestra los resultados de un experimento en ratón con r-antídoto purificado (n=4-10 por grupo). El nivel de betrixaban en plasma de ratón (figura 17A) e INR en sangre completa (figura 17B) se compararon después de administración oral de betrixaban en solitario (15 mg/kg) o betrixaban (15 mg/kg) seguido por inyección intravenosa (300 µg) de r-antídoto. Se indicaron valores medios para cada grupo tratado. Tal como se resume en la tabla 14, una única inyección IV del r-antídoto dio como resultado >50% de corrección de INR en sangre completa *ex vivo*, justificando la neutralización eficaz de inhibidores de fXa por el antídoto mediante múltiples inyecciones u otros regímenes. Estos resultados demuestran que las variantes de fXa de esta invención tienen potencial de actuar como antídotos universales para invertir el efecto anticoagulante de inhibidores de fXa en pacientes con hemorragia u otras urgencias médicas. Esto se describe más exhaustivamente en el ejemplo 8.

La figura 18 muestra la inversión con r-antídoto del efecto inhibidor de enoxaparina en un ensayo de coagulación por cambio de turbidez de 96 pocillos. Los resultados son esencialmente similares a pd-antídoto (figura 11) lo que indica que ambos derivados de fXa tienen actividad de antídoto funcional comparable. r-antídoto 50 nM sustancialmente corregía (>75%) el efecto inhibidor de 1,25 U/ml de enoxaparina. El protocolo de ensayo se presenta en el ejemplo 11.

La figura 19 muestra la inversión con r-antídoto del efecto inhibidor de heparina de bajo peso molecular (LMWH) como se ensaya en un ensayo de coagulación en plasma humano. Ambas figuras 18 y 19 se describen en el ejemplo 11.

La figura 20 muestra la inversión con r-antídoto del efecto anticoagulación de rivaroxaban. Esto se describe más exhaustivamente en el ejemplo 12.

La figura 21 muestra el alineamiento de la secuencia de polinucleótidos y la secuencia de polipéptidos traducida de r-antídoto.

La figura 22 muestra los resultados de un experimento en ratón con una única inyección IV (1 inyección) o dos inyecciones (2 inyecciones) del r-antídoto (n=5 por grupo, 312 ug/200 ul de r-antídoto). El nivel de betrixaban en plasma (figura 22A) se comparó después de la administración oral de betrixaban (15 mg/kg) seguida por inyección intravenosa de vehículo o r-antídoto (véase el ejemplo 8 para detalles). Tal como se muestra en la figura 22A, una única inyección IV de r-antídoto incrementaba el nivel de betrixaban en plasma en más de 8 veces en comparación con control con vehículo (control\_1), indicando la capacidad del antídoto para capturar eficazmente betrixaban *in vivo*. Una segunda inyección del antídoto incrementaba adicionalmente el nivel de betrixaban en menos de 2 veces en comparación con la única inyección, indicando cantidad limitante de betrixaban en sangre de ratón y posible inversión de su efecto anticoagulante por el antídoto. La figura 22B demuestra que la INR medida disminuye a medida que la relación de antídoto/betrixaban se incrementa en plasma de ratón después de inyecciones individuales y dobles del antídoto.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### 20 I. Definiciones

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de cultivo tisular, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro del alcance de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición; la serie Ausubel y col. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson y col. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson y col. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5ª edición; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; patente de Estados Unidos N.º 4.683.195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, Londres); Herzenberg y col. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*; *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002)).

Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluyendo intervalos, son aproximaciones que se modifican (+) o (-) en incrementos de 0,1. Debe entenderse, aunque no se afirme siempre explícitamente, que todas las designaciones numéricas vienen precedidas por el término "aproximadamente". Debe entenderse también, aunque no siempre se afirme explícitamente, que los reactivos descritos en el presente documento son meramente ejemplares y que los equivalentes de estos se conocen en la técnica.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma singular "un", "uno" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un transportador farmacéuticamente aceptable" incluye una pluralidad de transportadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo mezclas de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" pretende significar que las composiciones y procedimientos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. "Que consiste/n esencialmente en" cuando se usa para definir composiciones y procedimientos, significará que excluye otros elementos de cualquier importancia esencial para la combinación para el uso pretendido. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos tal como se definen en el presente documento no excluiría contaminantes traza procedentes del procedimiento de aislamiento and purificación y transportadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes, y similares. "Que consiste/n en" significará que excluye más de un elemento traza de otros ingredientes y etapas del procedimiento sustanciales para administrar las composiciones de esta invención. Realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

Un "sujeto" de diagnóstico o tratamiento es una célula o un mamífero, incluyendo un ser humano. Los sujetos animales no humanos para diagnóstico o tratamiento incluyen, por ejemplo, murinos, tales como ratas, ratones, caninos, tales como perros, lepóridos, tales como conejos, ganado, animales para la práctica deportiva, y mascotas.

5

El término "proteína" y "polipéptido" se usan de forma indistinta y en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácido, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar enlazadas mediante enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede estar enlazada mediante otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos

10 y no se establece ninguna limitación sobre el número máximo de aminoácidos que puede comprender una secuencia de proteína o péptido. Tal como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y los isómeros ópticos tanto D como L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Abreviaturas de una letra y de tres letras de los aminoácidos de origen natural se enumeran a continuación. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina habitualmente un oligopéptido si la

15 cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido se denomina habitualmente un polipéptido o una proteína.

1-letra	3-letras	Aminoácido
Y	Tyr	L-tirosina
G	Gly	L-glicina
F	Phe	L-fenilalanina
M	Met	L-metionina
A	Ala	L-alanina
S	Ser	L-serina
I	Ile	L-isoleucina
L	Leu	L-leucina
T	Thr	L-treonina
V	Val	L-valina
P	Pro	L-prolina
K	Lys	L-lisina
H	His	L-histidina
Q	Gln	L-glutamina
E	Glu	Ácido L-glutámico
W	Trp	L-triptófano
R	Arg	L-arginina
D	Asp	Ácido L-aspártico
N	Asn	L-asparagina
C	Cys	L-cisteína

"Factor Xa" o "fXa" o "proteína fXa" se refiere a una serina proteasa en la ruta de coagulación sanguínea, que es producida a partir del factor X inactivo (fX). El factor Xa es activado por el factor IXa con su cofactor, el factor VIIIa, en un complejo conocido como Xasa intrínseca, o factor VIIa con su cofactor, el factor tisular, en un complejo conocido como Xasa extrínseca. fXa forma un complejo protrombinasa unido a la membrana con el factor Va y es el componente activo en el complejo de protrombinasa que cataliza la conversión de protrombina en trombina. La trombina es la enzima que cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina, que, en última instancia, causa la formación del coágulo

20 sanguíneo. Por lo tanto, la actividad biológica de fXa se denomina algunas veces "actividad procoagulante" en el presente documento.

25

La secuencia de nucleótidos que codifica el factor X humano ("fX") puede encontrarse en el GenBank, "NM\_000504" en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=89142731>>, y se enumera en la figura 1b y la SEQ ID NO. 2. La secuencia de aminoácidos y la estructura del dominio correspondientes de fX se describen en Leytus y col., Biochemistry, 1986, 25: 5098-5102. La estructura del dominio de fX maduro también se describe en Venkateswarlu, D. y col., Biophysical Journal, 2002, 82: 1190-1206. Tras la escisión catalítica de los primeros 52 residuos (aminoácidos 143 a 194 de la SEQ ID NO. 3) de la cadena pesada, fX es activado a fXa (SEQ ID NO. 6). FXa contiene una cadena ligera (SEQ ID NO. 8) y una cadena pesada (SEQ ID NO. 9). Los primeros 45 residuos de

30 aminoácido (residuos 1-45 de la SEQ ID NO. 6) de la cadena ligera se denomina el dominio Gla porque contiene 11 residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico modificados de forma posttraduccional (Gla). También contiene una corta secuencia de apilamiento aromático (6 residuos de aminoácido) (residuos 40-45 de la SEQ ID NO. 6). La digestión

35

con quimotripsina elimina selectivamente los 1-44 residuos dando como resultado fXa sin dominio Gla (SEQ ID NO. 4). El dominio catalítico de serina proteasa de fXa se ubica en la cadena pesada C-terminal. La cadena pesada de fXa es altamente homóloga con otras serina proteasas tales como trombina, tripsina, y proteína C activada.

5 La estructura del dominio de factor X maduro puede encontrarse en Venkateswarlu D. y col., *Biophysical J.*, 2002, 82, 1190-1206. La numeración de aminoácidos en esta figura es la misma que en la figura 3. El tripéptido de Arg140-Lys141-Arg142 (el triplete RKR tal como se muestra en la figura 1) que conecta la cadena ligera con el péptido de activación no se muestra, dado que la forma que carece del tripéptido es predominante en el plasma sanguíneo en circulación. Dominios individuales se muestran en cuadros. Esto incluye los aminoácidos 1-45 en la figura 2 (SEQ ID  
10 NO. 3). Residuos catalíticos funcionalmente importantes están rodeados por un círculo, y “ $\gamma$ ” representa el residuo Gla (ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico).

“fXa nativo” o “fXa de tipo silvestre” se refiere al fXa presente de forma natural en plasma o que está aislado en su forma original, sin modificar, que procesa la actividad biológica de activar protrombina promoviendo, por lo tanto, la  
15 formación del coágulo sanguíneo. La expresión incluye polipéptidos de origen natural aislados a partir de muestras de tejido, así como fXa producido de forma recombinante. “fXa activo” se refiere a fXa que tiene la actividad biológica de activar protrombina. “fXa activo” puede ser fXa nativo o fXa modificado que conserva actividad procoagulante.

“Derivados de fXa” o “fXa modificado” o “derivados de una proteína de factor Xa” se refiere a proteínas de fXa que han sido modificadas de modo que se unan, directa o indirectamente, a un inhibidor del factor Xa y no se ensamblan en el  
20 complejo de protrombinasa. Estructuralmente, los derivados se modifican para proporcionar ninguna actividad procoagulante o actividad procoagulante reducida. “Actividad procoagulante” se denomina en el presente documento como la capacidad de un agente para causar coagulación sanguínea o formación de coágulos. Actividad procoagulante reducida significa que la actividad procoagulante se ha reducido en al menos aproximadamente el 50%, o más de  
25 aproximadamente el 90%, o más de aproximadamente el 95% en comparación con fXa de tipo silvestre. Por ejemplo, fX-S395A recombinante esencialmente no tiene ninguna actividad procoagulante, según lo medido mediante ensayos in vitro, tales como ensayos de actividad de fXa.

Los derivados tienen sitios activos modificados o dominios Gla modificados o ambos. Modificaciones adicionales  
30 también son contempladas. Se contempla que dichas modificaciones pueden realizarse de una o más de las siguientes maneras: deleción de uno o más de los aminoácidos de la secuencia, sustitución de uno o más residuos de aminoácidos con uno o más residuos de aminoácidos diferentes, y/o manipulación de una o más cadenas laterales de aminoácido o sus extremos “C” o “N”.

35 La expresión “sitio activo” se refiere a la parte de una enzima o anticuerpo donde se produce una reacción química. Un “sitio activo modificado” es un sitio activo que ha sido modificado estructuralmente para proporcionar al sitio activo reactividad o especificidad química incrementada o reducida. Ejemplos de sitios activos incluyen, aunque sin limitarse a, el dominio catalítico de factor X humano que comprende los 235-488 residuos de aminoácido (figura 1), y el dominio catalítico de factor Xa humano que comprende los 195-448 residuos de aminoácido (figuras 2 y 3). Ejemplos de sitio  
40 activo modificado incluyen, aunque sin limitarse a, el dominio catalítico de factor Xa humano que comprende 195-448 residuos de aminoácido en la SEQ ID NO. 10, 11, 12, 13 o 15 con al menos una sustitución de aminoácidos en la posición Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 o Arg424.

Tal como se ha indicado anteriormente, los derivados de la invención pueden tener dominios Gla modificados o tienen  
45 todo el dominio Gla eliminado. Los ejemplos de derivados de fXa adecuados como antídotos en los procedimientos son FXa sin dominio Gla (SEQ ID NO. 4 o 5), FXa deficiente en Gla (SEQ ID NO. 7 con modificaciones descritas en el presente documento), fXa con modificaciones en el sitio catalítico (SEQ ID NO. 10 o 11), y fXa con modificaciones en los sitios que se sabe que son importantes para la interacción fV/fVa o la interacción fVIII/fVIIIa (SEQ ID NO. 4, 5, 7, 10, o 11 con al menos una sustitución de aminoácidos en la posición Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 o  
50 Arg424), tal como se describe en detalle en el presente documento. Ejemplos adicionales de los derivados de fXa contemplados por esta invención se proporcionan a continuación.

“FXa sin dominio Gla” o “des-Gla fXa” se refiere a fXa que no tiene un dominio Gla y abarca derivados de fXa que portan otras modificaciones además de la eliminación del dominio Gla. Los ejemplos de FXa sin dominio Gla en esta  
55 invención incluyen, aunque sin limitarse a, derivado de fXa que carece de los 1-39 residuos de aminoácido de la SEQ ID NO. 3; derivado de fXa que carece de los 6-39 residuos de aminoácido de la SEQ ID NO. 3, correspondientes a un mutante de fXa expresado en células CHO descrito con más detalle a continuación (SEQ ID NO. 12, tabla 12); derivado de fXa que carece de los 1-44 residuos de aminoácido de la SEQ ID NO. 3, correspondientes a des-Gla fXa después de digestión quimotróptica de fXa humano (SEQ ID NO. 4, figura 3); y derivado de fXa que carece de todos los residuos

1-45 del dominio Gla de la SEQ ID NO. 3 tal como se describe en Padmanabhan y col., Journal Mol. Biol., 1993, 232: 947-966 (SEQ ID NO 5). Otros ejemplos incluyen des-Gla anhidro fXa (SEQ ID NO. 10, tabla 10) y des-Gla fXa-S379A (SEQ ID NO. 11, tabla 11).

5 En algunas realizaciones, el des-Gla fXa comprende al menos los residuos de aminoácido 40 a 448 de la SEQ ID NO. 3 o un equivalente de la misma. En alguna realización, el des-Gla fXa comprende al menos los residuos de aminoácido 45 a 488 (SEQ ID NO. 4) o 46 a 488 (SEQ ID NO. 5) de la SEQ ID NO. 3 o equivalentes de la misma.

10 En alguna realización, el des-Gla fXa comprende al menos los residuos de aminoácido 40 a 139 y 195 a 448 de la SEQ ID NO. 3 o equivalentes de la misma. En alguna realización, el des-Gla fXa comprende al menos los residuos de aminoácido 45 a 139 y 195 a 448 de la SEQ ID NO. 3 o equivalentes de la misma. En otra realización, el des-Gla fXa comprende al menos residuos de aminoácido 46 a 139 y 195 a 448 de la SEQ ID NO. 3 o equivalentes de la misma.

15 “FXa deficiente en Gla” se refiere a fXa con número reducido de grupos  $\gamma$ -carboxilo de cadena lateral libre en su dominio Gla. Como FXa sin dominio Gla, FXa deficiente en Gla también puede portar otras modificaciones. FXa deficiente en Gla incluye fXa no carboxilado, subcarboxilado y descarboxilado. “fXa no carboxilado” o “fXa descarboxilado” se refiere a derivados de fXa que no tienen los grupos  $\gamma$ -carboxilo de los residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico del dominio Gla, tal como fXa que tiene todos su ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico del dominio Gla sustituido por diferentes aminoácidos, o fXa que tiene todo su  $\gamma$ -carboxilo de cadena lateral eliminado o enmascarado por medios  
20 tales como aminación, esterificación, etc. Para proteína expresada de forma recombinante, fXa no carboxilado se denomina, algunas veces, fXa sin carboxilar. “fXa subcarboxilado” se refiere a derivados de fXa que tienen un número reducido de grupo  $\gamma$ -carboxilo en el dominio Gla en comparación con fXa de tipo silvestre, tal como fXa que tiene uno o más pero no todos de sus ácidos  $\gamma$ -carboxiglutámicos del dominio Gla sustituidos por uno o más aminoácidos diferentes, o fXa que tiene al menos uno pero no todos de sus  $\gamma$ -carboxilos de cadena lateral eliminados o  
25 enmascarados mediante medios tales como aminación y esterificación, etc.

La estructura del dominio de factor Xa sin dominio Gla humano puede encontrarse en Padmanabhan y col., J. Mol. Biol., 1993, 232, 947-966. La numeración de los aminoácidos se basa en equivalencias topológicas con quimotripsina, donde, por ejemplo, Ser195 corresponde a Ser379 en la figura 2 cuando se usa la numeración de fX maduro humano.  
30 Las inserciones se indican con letras, y las deleciones se indican mediante 2 numeraciones sucesivas. Se añade 300 a la numeración de cadena ligera para diferenciarla de la numeración de cadena pesada.  $\beta$ 363 es  $\beta$ -hidroxi aspartato. Las barras diagonales indican escisiones proteolíticas observadas en material cristalino. La secuencia de FXa sin dominio Gla que carece del fX maduro basado en 1-45 residuos de aminoácido (SEQ ID NO. 3) se enumera en la SEQ ID NO. 5.

35 En una realización, el derivado de fXa puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de homología con la SEQ ID NO. 15, y parece de una cadena ligera de fXa pero aún contiene un dominio catalítico de serina proteasa presente en la cadena pesada. Además, pueden usarse quimeras con otro dominio catalítico de serina proteasa para realizar sustituciones en la cadena pesada.

40 “pd-antídoto” o “antídoto derivado de plasma” se refiere al derivado de des-Gla anhidro fXa y tiene los residuos de aminoácido de la SEQ ID NO. 10.

45 “r-antídoto” o “antídoto recombinante” se refiere a un derivado de fXa que carece de los 6-39 residuos de aminoácido de la SEQ ID NO. 3, correspondientes a un mutante de fXa expresado en células CHO descritas con más detalle a continuación (SEQ ID NO. 12, tabla 12).

50 “Agentes anticoagulantes” o “anticoagulantes” son agentes que inhiben la formación de coágulos sanguíneos. Los ejemplos de agentes anticoagulantes incluyen, aunque sin limitarse a, inhibidores específicos de trombina, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa o factor VIIa, heparina y derivados, antagonistas de vitamina K, y anticuerpos anti-factor tisular. Los ejemplos de inhibidores específicos de trombina incluyen hirudina, bivalirudina (Angiomax®), argatroban y lepirudina (Refludan®). Los ejemplos de heparina y derivados incluyen heparina no fraccionada (UFH), heparina de bajo peso molecular (LMWH), tal como enoxaparina (Lovenox®), dalteparina (Fragmin®), y danaparoid (Orgaran®); y pentasacárido sintético, tales como fondaparinux (Arixtra®). Los ejemplos de antagonistas de vitamina  
55 K incluyen warfarina (Coumadin®), fenocumarol, acenocumarol (Sintrom®), clorindiona, dicumarol, difenadiona, biscoumacetato de etilo, fenprocoumon, fenindiona y tiocloamarol. En una realización, el anticoagulante es un inhibidor del factor Xa. En una realización, el anticoagulante es betrixaban.

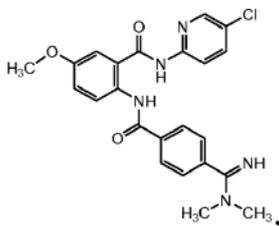
“Terapia anticoagulante” se refiere a un régimen terapéutico que se administra a un paciente para prevenir coágulos sanguíneos o trombosis no deseados. Una terapia anticoagulante comprende administrar uno o una combinación de dos o más agentes anticoagulantes u otros agentes a una dosificación y calendario adecuados para tratar o prevenir los coágulos sanguíneos o trombosis no deseados en el paciente.

5

La expresión “inhibidores del factor Xa” o “inhibidores de factor Xa” se refieren a compuestos que pueden inhibir, directa o indirectamente, la actividad del factor de coagulación Xa de catalizar la conversión de protrombina en trombina *in vitro* y/o *in vivo*. Los ejemplos de inhibidores de fXa conocidos incluyen, sin limitación, fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmina, NAP-5, rNAPc2, inhibidor de la ruta del factor tisular, DX-9065a (tal como se describe en, por ejemplo, Herbert, J.M., y col., *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 276(3): 1030-8), YM-60828 (tal como se describe en, por ejemplo, Taniuchi, Y., y col., *Thromb Haemost.* 1998 79(3): 543-8), YM-150 (tal como se describe en, por ejemplo, Eriksson, B.I. et. al, *Blood* 2005; 106(11), Resumen 1865), apixaban, rivaroxaban, PD-348292 (tal como se describe en, por ejemplo, Pipeline Insight: Antithrombotics - Reaching the Untreated Prophylaxis Market, 2007), otamixaban, razaxaban (DPC906), BAY 59-7939 (tal como se describe en, por ejemplo, Turpie, A.G., y col., *J. Thromb. Haemost.* 2005, 3(11): 2479-86), DU-176b (tal como se describe en, por ejemplo, Hylek EM, *Curr Opin Invest Drugs* 2007 8(9): 778-783), LY517717 (tal como se describe en, por ejemplo, Agnelli, G., y col., *J. Thromb. Haemost.* 2007 5(4): 746-53), GSK913893, betrixaban (tal como se describe a continuación) y derivados de los mismos. La heparina de bajo peso molecular (“LMWH”) también se considera un inhibidor del factor Xa.

20 En una realización, el inhibidor del factor Xa se selecciona de entre betrixaban, rivaroxaban, LMWH, y combinaciones de los mismos.

El término “betrixaban” se refiere al compuesto “[2-({4-[(dimetilamino)iminometil]fenil}carbonilamino)-5-metoxifenil]-N-(5-cloro(2-piridil))carboxamida” o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. “[2-({4-[(dimetilamino)iminometil]fenil}carbonilamino)-5-metoxifenil]-N-(5-cloro(2-piridil))carboxamida” se refiere al compuesto que tiene la siguiente estructura:



30 o un tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El betrixaban se describe en las patentes de Estados Unidos N.º 6.376.515 y 6.835.739 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2007/0112039, presentada el 7 de noviembre de 2006. Se sabe que el betrixaban es un inhibidor específico del factor Xa.

35

Tal como se usa en el presente documento, el término “antídoto” o la expresión “antídoto para un inhibidor del factor Xa” se refiere a moléculas, tales como derivados de fXa, que pueden neutralizar o invertir sustancialmente la actividad inhibidora de la coagulación de un inhibidor de fXa compitiendo con fXa activo para unirse con inhibidores de fXa disponibles. Los ejemplos de los antídotos son derivados de fXa con unión a la membrana fosfolipídica reducida, tal como des-Gla fXa o FXa deficiente en Gla, y derivados de fXa con actividad catalítica reducida, tal como derivados de fXa con el sitio activo modificado, y derivados con interacción reducida con fV/Va, o fVIII/fVIIIa. Los ejemplos de antídotos de la divulgación con unión a membrana reducida y actividad catalítica reducida incluyen, aunque sin limitarse a, des-Gla anhidro-fXa mediante digestión quimotriptica de anhidro-fXa (tal como se describe en el ejemplo 1); des-Gla fXa-S379A (S195A en numeración de quimotripsina) mediante mutagénesis (tal como se describe en el ejemplo 6).

45

Otros ejemplos de antídotos de la divulgación incluyen proteínas o polipéptidos que contienen dominios catalíticos de serina proteasa que poseen suficiente similitud estructural con el dominio catalítico de fXa y son, por lo tanto, capaces de unirse a inhibidores de fXa molécula pequeña. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitarse a, trombina que se une al inhibidor de fXa GSK913893 (Young R., y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17(10): 2927-2930); calicreína plasmática que se une al inhibidor de fXa apixaban (Luetzgen J., y col., *Blood*, 2006, 108(11) resumen 4130); y tripsina (o su homólogo bacteriano subtilisina) que se une al inhibidor de fXa C921-78 con afinidad subnanomolar ( $K_d = 500$

50

pM) (Betz A, y col., Biochem., 1999, 38(44): 14582-14591).

El derivado de la invención se une, directa o indirectamente a un inhibidor del factor Xa. Los términos “unión”, “se une” “reconocimiento” o “reconocer”, tal como se usan en el presente documento, pretenden incluir interacciones entre moléculas que pueden detectarse usando, por ejemplo, un ensayo de hibridación. Los términos también pretenden incluir interacciones “de unión” entre moléculas. Las interacciones pueden ser, por ejemplo, proteína-proteína, proteína-ácido nucleico, proteína-molécula pequeña o molécula pequeña-ácido nucleico en la naturaleza. La unión puede ser “directa” o “indirecta”. Unión “directa” comprende contacto físico directo entre moléculas. Unión “indirecta” entre molécula comprende las moléculas que tienen contacto físico directo con una o más moléculas intermedias simultáneamente. Por ejemplo, se contempla que derivados de la invención se unen indirectamente y neutralizan sustancialmente heparina de bajo peso molecular y otros inhibidores de factor Xa indirectos. Esta unión puede dar como resultado la formación de un “complejo” que comprende las moléculas de interacción. Un “complejo” se refiere a la unión de dos o más moléculas mantenidas juntas mediante enlaces, interacciones o fuerzas covalentes o no covalentes.

15 “Neutralizar” “invertir” o “contrarrestar” la actividad de un inhibidor de fXa o frases similares se refieren a inhibir o bloquear la función inhibidora del factor Xa o anticoagulante de un inhibidor de fXa. Dichas frases se refieren a inhibición o bloqueo parcial de la función, así como a inhibir o bloquear la mayoría o todo de la actividad inhibidora de fXa, *in vitro* y/o *in vivo*.

20 En ciertas realizaciones, el inhibidor del factor Xa es neutralizado sustancialmente, lo que significa que su capacidad de inhibir el factor Xa, directa o indirectamente, se reduce en al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%.

25 La expresión “unión a la membrana fosfolipídica” se refiere a la capacidad un fXa activo de unirse a la membrana fosfolipídica cargada negativamente u otra membrana celular, tal como plaquetas, en presencia de iones  $Ca^{2+}$ . Esta unión está medida por los residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico en el dominio Gla de fXa.

30 La expresión “interacción reducida” se refiere a la capacidad disminuida del derivado de fXa de unirse o formar un complejo con iones u otros cofactores que normalmente se unen a o complejan con fXa silvestre. Los ejemplos de dicha interacción incluyen, aunque sin limitarse a, unión de fXa con iones de  $Ca^{2+}$  y membrana fosfolipídica, interacción con fV/fVa, o fVIII/fVIIIa, etc. Se prefiere que la interacción de un derivado de fXa con los iones u otros cofactores se reduzca al 50% de la de un fXa silvestre. Más preferentemente, la interacción se reduce al 10%, 1%, y 0,1% de la de un fXa de tipo silvestre. Esto se refiere a la capacidad de los derivados de “ensamblarse en el complejo de protrombina”.

“Actividad de unión al inhibidor de fXa” se refiere a la capacidad de una molécula de unirse a un inhibidor de fXa. Un antídoto de la presente invención posee actividad de unión al inhibidor de fXa, ya sea directa o indirectamente.

40 La expresión “semivida en circulación” o “semivida en plasma” se refiere al tiempo requerido para que la concentración plasmática de un antídoto que circula en el plasma se reduzca a la mitad de su concentración inicial después de una única administración.

45 La expresión “resto conjugado” se refiere a un resto que puede añadirse a un derivado de fXa formando un enlace covalente con un residuo del derivado de fXa. El resto puede unirse directamente a un residuo del derivado de fXa o puede formar un enlace covalente con un enlazador que, a su vez, forma un enlace covalente con un residuo del derivado de fXa.

50 Tal como se usa en el presente documento, un “anticuerpo” incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno o una cadena sencilla del mismo. Por lo tanto, el término “anticuerpo” incluye cualquier molécula que contiene proteína o péptido que comprende al menos una parte de una molécula de inmunoglobulina. Los ejemplos de estos incluyen, aunque sin limitarse a una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una parte de unión a ligando del mismo, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región marco (FR), o cualquier parte de las mismas, o al menos una parte de una proteína de unión.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales y pueden estar aislados de cualquier fuente biológica adecuada, por ejemplo, murina, de rata, oveja y canina.

Una "composición" pretende significar una combinación de agente activo y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o etiqueta detectable) o activo, tal como un adyuvante.

Una "composición farmacéutica" pretende incluir la combinación de un agente activo con un transportador, inerte o activo, que hace a la composición adecuada para uso de diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

"Una cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de derivado suficiente para inducir un resultado biológico y/o terapéutico deseado. Ese resultado puede ser alivio de los signos, síntomas, o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En la presente invención, el resultado implicará normalmente uno o más de los siguientes: neutralización de un inhibidor de fXa que ha sido administrado a un paciente, inversión de la actividad anticoagulante del inhibidor de fXa, eliminación del inhibidor de fXa del plasma, restauración de la hemostasia, y reducción o cese de hemorragia. La cantidad efectiva variará dependiendo del agente antídoto específico usado, el inhibidor de fXa específico que ha sido administrado al sujeto, el régimen de dosificación del inhibidor de fXa, la temporización de administración del antídoto, el estado del sujeto y la enfermedad que están siendo tratados, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la patología, la vía de administración y similares, todos los cuales pueden ser determinados fácilmente por un experto en la materia.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "tratar" "tratamiento" y similares se usan en el presente documento para significar obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente un trastorno o signo o síntoma del mismo, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para un trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno.

"Tratar" también cubre cualquier tratamiento de un trastorno en un mamífero, e incluye: (a) prevenir que se produzca un trastorno en un sujeto que puede estar predispuesto a un trastorno, pero al que aún puede no habersele diagnosticado que lo tiene, por ejemplo, prevenir la hemorragia en un paciente con sobredosis de anticoagulante; (b) inhibir un trastorno, es decir, detener su desarrollo, por ejemplo, inhibir la hemorragia; o (c) aliviar o mejorar el trastorno, por ejemplo, reducir la hemorragia.

Tal como se usa en el presente documento, "tratar" incluye además mejora sistémica de los síntomas asociados con la patología y/o un retardo de la aparición de los síntomas. Las evidencias clínicas y subclínicas de "tratamiento" variarán con la patología, el individuo y el tratamiento.

La "administración" puede efectuarse en una dosis, de forma continua o de forma intermitente durante todo el tratamiento. Procedimientos de determinación de los medios y dosificación de administración más eficaces son conocidos por los expertos en la materia y variarán con la composición usada para terapia, el propósito de la terapia, la célula diana que está siendo tratada, y el sujeto que está siendo tratado. Administraciones individuales o múltiples pueden llevarse a cabo con el nivel de dosis y el patrón que es seleccionado por el facultativo encargado del tratamiento. En la técnica se conocen formulaciones de dosificación y procedimientos de administración de los agentes.

Los agentes y composiciones de la presente invención pueden usarse en la fabricación de medicamentos y para el tratamiento de seres humanos y otros animales mediante administración de acuerdo con procedimientos convencionales, tal como un ingrediente activo en composiciones farmacéuticas.

Un agente de la presente invención puede administrarse para terapia mediante cualquier vía adecuada, específicamente mediante administración parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). También se apreciará que la vía preferida variará con el estado y la edad del receptor, y la enfermedad que está siendo tratada.

Se puede determinar si se consigue el procedimiento, es decir, la inhibición o inversión de un inhibidor del factor Xa, mediante un número de ensayos *in vitro*, tales como ensayo de generación de trombina, y ensayos de coagulación clínica tales como aPTT, PT y ACT.

El término "aislado/a", tal como se usa en el presente documento, con respecto a ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas separadas de otros ADN o ARN, respectivamente que están presentes en la fuente natural de la macromolécula. La expresión "ácido nucleico aislado" pretende incluir fragmentos de ácido nucleico que no son de origen natural como fragmentos y no se encontrarían en el estado natural. El término "aislado/a" también se usa en el presente documento para referirse a polipéptidos y proteínas que están aisladas de otras proteínas celulares y pretende abarcar polipéptidos tanto purificados como recombinantes. En otras realizaciones, el término "aislado/a"

significa separado de constituyentes, celulares y otros, en los que la célula, tejido, polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o un fragmento o fragmentos de los mismos, que están normalmente asociados en la naturaleza. Por ejemplo, una célula aislada es una célula que está separada de tejido o células de fenotipo o genotipo distinto. Tal como es evidente para los expertos en la materia, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento o fragmentos de los mismos no de origen natural, no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su contrapartida de origen natural.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "equivalente del mismo/de la misma" cuando se refiere a una proteína, polipéptido o ácido nucleico de referencia, pretende incluir aquellos que tienen homología mínima mientras siguen manteniendo la funcionalidad deseada. Por ejemplo, la homología puede ser al menos el 80%, o como alternativa al menos el 85%, o como alternativa al menos el 90%, o como alternativa al menos el 95%, o como alternativa el 98% de porcentaje de homología y muestran actividad biológica sustancialmente equivalente al polipéptido o proteína de referencia. Que un polinucleótido o región de polinucleótido (o un polipéptido o región de polipéptido) tiene cierto porcentaje (por ejemplo, 80%, 85%, 90% o 95%) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son los mismos al comparar las dos secuencias. Debe observarse que, cuando solamente se usa la cadena pesada de fXa (o una serina proteasa relacionada), la homología global podría ser inferior al 75%, tal como, por ejemplo, 65% o 50% sin embargo, la funcionalidad deseada permanece. Este alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M. Ausubel y col., eds., 1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, se usan parámetros por defecto para el alineamiento. Un programa de alineamiento preferido es BLAST, usando parámetros por defecto. En particular, programas preferidos son BLASTN y BLASTP, usando los siguientes parámetros por defecto: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; límite = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificadas por = PUNTUACIÓN ELEVADA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Detalles de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, marca EST o SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (mARN), ARN transferente, ARN ribosómico, ribozimas, cADN, plinucleótidos recombinantes, plinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas y cebadores de ácido nucleico. Un plinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, modificaciones a la estructura de nucleótidos pueden impartirse antes o después del ensamblaje del plinucleótido. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de etiquetado. El término también se refiere a moléculas tanto bi- como monocatenarias. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier realización de esta invención que es un polinucleótido abarca tanto la forma bicatenaria como cada una de dos formas monocatenarias complementarias que se sabe o se ha predicho que componen la forma bicatenaria.

Un polinucleótido está compuesto por una secuencia específica de cuatro bases de nucleótido: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) para timina cuando el polinucleótido es ARN. Por lo tanto, la expresión "secuencia de polinucleótido" es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Esta representación alfabética puede introducirse en bases de datos en un ordenador que tiene una unidad central de procesamiento y usarse para aplicaciones bioinformáticas tales como genómica funcional y búsqueda de homología.

"Homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología puede determinarse comparando una posición en cada secuencia que pueden ser alineadas para fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias está en función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos del 40% de identidad, o como alternativa menos del 25% de identidad, con una de las de la presente invención.

Que un polinucleótido o región de polinucleótido (o un polipéptido o región de polipéptido) tiene cierto porcentaje (por

ejemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) de “identidad de secuencia” con otra secuencia significa que, cuando están alineadas, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son los mismos al comparar las dos secuencias. Este alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse usando programas software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en Ausubel y col. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology. Preferentemente, se usan parámetros por defecto para el alineamiento. Un programa de alineamiento es BLAST, usando parámetros por defecto. En particular, son programas BLASTN y BLASTP, usando los siguientes parámetros por defecto: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; límite = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificadas por = PUNTUACIÓN ELEVADA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Detalles de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, último acceso el 26 de noviembre de 2007. Polinucleótidos biológicamente equivalentes son aquellos que tienen el porcentaje de homología especificado y que codifican un polipéptido que tiene la misma o similar actividad biológica.

15 La expresión “un homólogo de un ácido nucleico” se refiere a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene cierto grado de homología con la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico o complemento del mismo. Un homólogo de un ácido nucleico bicatenario pretende incluir ácidos nucleicos que tienen una secuencia de nucleótidos que tiene cierto grado de homología con él o con el complemento del mismo. En un aspecto de la divulgación, homólogos de ácidos nucleicos son capaces de hibridar con el ácido nucleico o complemento del mismo.

20 Un “gen” se refiere a un polinucleótido que contiene al menos un marco abierto de lectura (ORF) que es capaz de codificar un polipéptido o proteína particular después de haber sido transcrito y traducido. Cualquiera de las secuencias de polinucleótidos o polipéptidos descritas en el presente documento puede usarse para identificar fragmentos más grandes o secuencias codificantes de longitud completa del gen con el que están asociados. Procedimientos de aislamiento de secuencias de fragmentos más grandes son conocidos por los expertos en la materia.

El término “expresar” se refiere a la producción de un producto génico.

30 Tal como se usa en el presente documento, “expresión” se refiere al proceso mediante cual polinucleótidos se transcriben a mRNA y/o el proceso mediante el cual el mRNA transcrito está siendo posteriormente traducido en péptidos, polipéptidos, o proteínas. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir splicing del mRNA en una célula eucariota.

35 El término “codificar”, tal como se aplica a polinucleótidos, se refiere a un polinucleótido que se dice que “codifica” un polipéptido si, en su estado nativo o cuando se manipula mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, puede transcribirse y/o traducirse para producir el mRNA para el polipéptido y/o un fragmento del mismo. La cadena antisentido es el complemento de dicho ácido nucleico, y la secuencia codificante puede deducirse a partir de ella.

40 Un “conjugado peptídico” se refiere a la asociación mediante unión por enlace covalente o no covalente de uno o más polipéptidos y otro compuesto químico o biológico. En un ejemplo no limitante, la “conjugación” de un polipéptido con un compuesto químico da como resultado estabilidad o eficacia mejoradas del polipéptido para su propósito pretendido. En una realización, un péptido está conjugado a un transportador, donde el transportador es un liposoma, una micela, o un polímero farmacéuticamente aceptable.

45 Los “liposomas” son vesículas microscópicas que consisten en bicapas lipídicas concéntricas. Estructuralmente, los liposomas varían en tamaño y forma desde largos tubos a esferas, con dimensiones desde unos pocos cientos de Angstroms a fracciones de un milímetro. Los lípidos formadores de vesículas se seleccionan para conseguir un grado especificado de fluidez o rigidez del complejo final que proporciona la composición lipídica de la capa externa. Estos son neutros (colesterol) o bipolares e incluyen fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), y esfingomielina (SM) y otros tipos de lípidos bipolares, incluyendo aunque sin limitarse a dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), con una longitud de cadena de hidrocarburo en el intervalo de 14 a 22, y saturados o con uno o más enlaces dobles C = C. Los ejemplos de lípidos capaces de producir un liposoma estable, en solitario, o en combinación con otros componentes lipídicos son fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, cefalina, cardiopina, ácido fosfatídico, cerebrósidos, distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE) y dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1 carboxilato (DOPE-mal). Lípidos que no contienen fósforo adicionales que pueden ser incorporados en liposomas

incluyen estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, miristato de isopropilo, lauril sulfato de trietanolamina, sulfato de alquilo-arilo, palmitato de acetilo, ricinoleato de glicerol, estearato de hexadecilo, polímeros acrílicos anfóteros, amidas de ácidos grasos polietoxilados, y los lípidos catiónicos mencionados anteriormente (DDAB, DODAC, DMRIE, DMTAP, DOGS, DOTAP (DOTMA), DOSPA, DPTAP, DSTAP, DC-Chol). Los lípidos cargados negativamente incluyen

5 ácido fosfatídico (PA), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidilglicerol y (DOPG), dicetilfosfato que son capaces de formar vesículas. Normalmente, los liposomas pueden dividirse en tres categorías basadas en su tamaño global y la naturaleza de la estructura laminar. Las tres clasificaciones, según lo desarrollado por la New York Academy Sciences Meeting, "Liposomes and Their Use in Biology and Medicine", diciembre de 1977, son vesículas multilaminares (MLV), pequeñas vesículas unilaminares (SUV) y grandes vesículas unilaminares (LUV).

10

Una "micela" es un agregado de moléculas de tensioactivo dispersadas en un coloide líquido. Una micela típica en solución acuosa forma un agregado con las regiones de "cabeza" hidrófilas en contacto con disolvente circundante, secuestrando las regiones de cola hidrófobas en el centro de la micela. Este tipo de micela es conocido como una micela en fase normal (micela de aceite en agua). Las micelas inversas tienen los grupos de cabeza en el centro de

15 las colas con las colas extendiéndose fuera (micela de agua en aceite). Las micelas pueden usarse para unir un polinucleótido, polipéptido, anticuerpo o composición descrita en el presente documento para facilitar el suministro eficiente de la célula o tejido diana.

La frase "polímero farmacéuticamente aceptable" se refiere al grupo de compuestos que pueden conjugarse con uno

20 o más polipéptidos descritos en el presente documento. Se contempla que la conjugación de un polímero con el polipéptido es capaz de prolongar la semivida del polipéptido *in vivo* e *in vitro*. Los ejemplos no limitantes incluyen polietilenglicoles, polivinilpirrolidonas, alcoholes polivinílicos, derivados de celulosa, poliácridatos, polimetacrilatos, azúcares, polioles y mezclas de los mismos.

Un "vehículo de suministro de genes" se define como cualquier molécula que puede transportar polinucleótidos insertados a una célula huésped. Los ejemplos de vehículos de suministro de genes son liposomas, micelas polímeros biocompatibles, incluyendo polímeros naturales y polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipéptidos; polisacáridos; lipopolisacáridos; envueltas virales artificiales; partículas de metal; y bacterias, o virus, tales como baculovirus, adenovirus y retrovirus, bacteriófago, cósmido, plásmido, vectores fúngicos y otros vehículos recombinantes usados

30 normalmente en la técnica que se han descrito para expresión en diversos huéspedes eucariotas y procariotas, y pueden usarse para terapia génica así como para simple expresión de proteínas.

Un polinucleótido de esta invención puede suministrarse a una célula o tejido usando un vehículo de suministro de genes. "Suministro de genes", "transferencia de genes", "transducción", y similares tal como se usan en el presente

35 documento, son expresiones que se refieren a la introducción de un polinucleótido exógeno (algunas veces denominado como "transgén") en una célula huésped, independientemente del procedimiento usado para la introducción. Dichos procedimientos incluyen diversas técnicas bien conocidas tales como transferencia de genes mediada por vectores (mediante, por ejemplo, infección vírica/transfección, o diversos otros complejos de suministro de genes basados en proteínas o basados en lípidos) así como técnicas que facilitan el suministro de polinucleótidos

40 "desnudos" (tales como electroporación, suministro con "pistola génica" y diversas otras técnicas usadas para la introducción de polinucleótidos). El polinucleótido introducido puede mantenerse de forma estable o transitoria en la célula huésped. El mantenimiento estable normalmente requiere que el polinucleótido introducido contenga un origen de replicación compatible con la célula huésped o se integre en un replicón de la célula huésped, tal como un replicón extracromosómico (por ejemplo, un plásmido) o un cromosoma nuclear o mitocondrial. Se conocen una serie de

45 vectores que son capaces de mediar la transferencia de genes a células de mamífero, tal como se conoce en la técnica y se describe en el presente documento.

Un "vector viral" se define como un virus o partícula viral producida de forma recombinante que comprende un polinucleótido a suministrar a una célula huésped, *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Los ejemplos de vectores virales incluyen

50 vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de alfavirus y similares. Los vectores de alfavirus, tales como vectores basados en el virus Semliki Forest y vectores basados en el virus Sindbis, también se han desarrollados para uso en terapia génica e inmunoterapia. Véase, Schlesinger y Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5: 434-439 y Ying, y col. (1999) Nat. Med. 5(7): 823-827. En aspectos donde la transferencia de genes está mediada por un vector retroviral, una construcción de vector se refiere al polinucleótido que comprende

55 el genoma retroviral o parte del mismo, y un gen terapéutico. Tal como se usa en el presente documento, "transferencia de genes mediada retroviral" o "transducción retroviral" lleva el mismo significado y se refiere al proceso mediante el cual un gen o secuencias de ácido nucleico son transferidas de forma estable en la célula huésped en virtud del virus que entra en la célula y que integra su genoma en el genoma de la célula huésped. El virus puede entrar en la célula huésped mediante su mecanismo de infección normal o modificarse de modo que se una a un receptor o ligando de

la superficie de la célula huésped diferente para entrar en la célula. Tal como se usa en el presente documento, vector retroviral se refiere a una partícula viral capaz de introducir ácido nucleico exógeno en una célula a través de un mecanismo de entrada viral o de tipo viral.

- 5 Los retrovirus portan su información genética en forma de ARN; sin embargo, una vez que el virus infecta una célula, el ARN es transcrito de forma inversa en forma de ADN que se integra en el ADN genómico de la célula infectada. La forma de ADN integrado se denomina provirus.

En aspectos donde la transferencia de genes es mediada por un vector viral de ADN, tal como un adenovirus (Ad) o virus adenoasociado (AAV), una construcción de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma viral o parte del mismo, y un transgén. Los adenovirus (Ad) son un grupo de virus homogéneo, relativamente bien caracterizado, que incluye más de 50 serotipos. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT internacional N.º WO 95/27071. Los Ad no requieren integración en el genoma de la célula huésped. Vectores derivados de Ad recombinante, particularmente aquellos que reducen el potencial de recombinación y generación de virus de tipo silvestre, también han sido construidos. Véase, las solicitudes PCT internacional N.º WO 95/00655 y WO 95/11984. El AAV de tipo silvestre tiene alta infectividad y especificidad integrándose en el genoma de la célula huésped. Véase, Hermonat and Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 81: 6466-6470 y Lebkowski y col. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 3988-3996.

Los vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación en el que un polinucleótido puede enlazarse de forma operativa se conocen bien en la técnica. Dichos vectores son capaces de transcribir ARN *in vitro* o *in vivo*, y están disponibles en el mercado de fuentes tales como Stratagene (La Jolla, CA) y Promega Biotech (Madison, WI). Para optimizar la expresión y/o la transcripción *in vitro*, puede ser necesario eliminar, añadir o alterar partes no traducidas 5' y/o 3' de los clones para eliminar codones de iniciación extra, de potencial traducción alternativa inapropiada u otras secuencias que pueden interferir en o reducir la expresión, a nivel de la transcripción o la traducción. Como alternativa, sitios de unión al ribosoma consenso pueden insertarse inmediatamente 5' del codón de inicio para mejorar la expresión.

Los vehículos de suministro de genes también incluyen complejos de ADN/liposoma, micelas y complejos proteína-ADN dirigidos. Los liposomas que también comprenden un anticuerpo de dirección o fragmento del mismo pueden usarse en los procedimientos de esta invención. Para mejorar el suministro a una célula, el ácido nucleico o las proteínas de esta invención pueden conjugarse a anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que se unen a antígenos de la superficie celular, por ejemplo, un marcador de la superficie celular descubierto en células madre o cardiomiocitos. Además del suministro de polinucleótidos a una célula o población de células, la introducción directa de las proteínas descritas en el presente documento en la célula o población de células puede realizarse mediante la técnica no limitante de transfección de proteínas, como alternativa condiciones de cultivo que pueden mejorar la expresión y/o promover la actividad de las proteínas de esta invención son otras técnicas no limitantes.

La frase "soporte sólido" se refiere a superficies no acuosas tales como "placas de cultivo" "chips génicos" o "micromatrices" (*microarrays*). Dichos chips génicos o micromatrices pueden usarse para fines de diagnóstico y terapéuticos mediante una serie de técnicas conocidas por un experto en la materia. En una técnica, los oligonucleótidos se distribuyen sobre un chip génico para determinar la secuencia de ADN mediante la estrategia de hibridación, tal como la perfilada en las patentes de Estados Unidos N.º 6.025.136 y 6.018.041. Los polinucleótidos de esta invención pueden modificarse a sondas, que, a su vez, pueden usarse para la detección de una secuencia genética. Dichas técnicas han sido descritas, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 5.968.740 y 5.858.659. Una sonda también puede fijarse a la superficie de un electrodo para la detección electroquímica de secuencias de ácido nucleico tales como las descritas por Kayem y col., patente de Estados Unidos N.º 5.952.172 y por Kelley y col. (1999) Nucleic Acids Res. 27: 4830-4837.

Diversos "chips génicos" o "micromatrices" y tecnologías similares son conocidas en la técnica. Los ejemplos de éstas incluyen, aunque sin limitarse a, LabCard (ACLARA Bio Sciences Inc.); GeneChip (Affymetric, Inc.); LabChip (Caliper Technologies Corp); una matriz de baja densidad con detección electroquímica (Clinical Micro Sensors); LabCD System (Gamera Bioscience Corp.); Omni Grid (Gene Machines); Q Array (Genetix Ltd.); un sistema de espectrometría de masas automatizado de alto rendimiento con tecnología de expresión en fase líquida (Gene Trace Systems, Inc.); un sistema de dispensado de gotas por chorro térmico (Hewlett Packard Company); Hyseq HyChip (Hyseq, Inc.); BeadArray (Illumina, Inc.); GEM (Incyte Microarray Systems); un sistema de formación de micromatrices de alto rendimiento que puede dispensar de 12 a 64 gotas sobre múltiples portaobjetos de vidrio (Intelligent Bio-Instruments); Molecular Biology Workstation y NanoChip (Nanogen, Inc.); un chip de vidrio microfluídico (Orchid biosciences, Inc.); BioChip Arrayer con cuatro puntas piezoeléctricas de goteo a voluntad PiezoTip (Packard Instruments, Inc.); FlexJet (Rosetta Inpharmatic, Inc.); espectrómetro de masas MALDI-TOF (Sequnome); ChipMaker 2 y ChipMaker 3

(TeleChem International, Inc.); y GenoSensor (Vysis, Inc.) tal como se identifican y describen en Heller (2002) Annu. Rev. Biomed. Eng. 4:129-153. Los ejemplos de "chips génicos" o una "micromatriz" también se describen en las publicaciones de patente de Estados Unidos N.º: 2007-0111322, 2007-0099198, 2007-0084997, 2007-0059769 y 2007-0059765 y las patentes de Estados Unidos N.º: 7.138.506, 7.070.740 y 6.989.267.

5

En un aspecto, se preparan "chips génicos" o "micromatrices" que contienen sondas o cebadores homólogos a un polinucleótido, polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento. Se obtiene una muestra adecuada del paciente, se lleva a cabo extracción de ADN, ARN genómico, proteína o cualquier combinación de los mismos y se amplifica en caso necesario. La muestra se pone en contacto con el chip génico o panel de micromatriz en condiciones adecuadas para hibridación de los genes o productos génicos de interés con las sondas o cebadores contenidos en el chip génico o micromatriz. Las sondas o cebadores pueden estar etiquetadas de forma detectable identificando de este modo el uno o más genes de interés. Como alternativa, puede usarse una reacción química o biológica para identificar las sondas o cebadores que hibridaron con el ADN o ARN del uno o más genes) de interés. Los genotipos o el fenotipo del paciente se determinan a continuación con ayuda del aparato y los procedimientos mencionados anteriormente.

Otros ejemplos no limitantes de un soporte en fase sólida incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del transportador puede ser soluble en cierta medida o insoluble. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible, siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un polinucleótido, polipéptido o anticuerpo. Por lo tanto, la configuración del soporte puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interna de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Como alternativa, la superficie puede ser plana tal como una lámina, tira reactiva, etc., o, como alternativa, perlas de poliestireno. Los expertos en la materia conocerán muchos otros transportadores adecuados para unirse al anticuerpo o antígeno, o serán capaces de determinar los mismos mediante el uso de experimentación rutinaria.

Las "células eucariotas" comprenden todos los reinos de la vida, excepto monera. Se pueden distinguir fácilmente a través de un núcleo rodeado por una membrana. Animales, plantas, hongos y protistas son eucariotas u organismos cuyas células están organizadas en estructuras complejas por las membranas internas y un citoesqueleto. La estructura rodeada por una membrana más característica es el núcleo. Un huésped eucariota, incluyendo, por ejemplo, levadura, plantas superiores, insectos y células de mamíferos, o como alternativa a partir de una célula procarionta tal como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos no limitantes incluyen simio, bovino, porcino, murino, ratas, aviar, reptiliano y humano.

Las "células procariontas" que habitualmente carecen de un núcleo o cualesquiera otros orgánulos rodeados por una membrana y se dividen en dos dominios, bacterias y archaea. Además, en lugar de tener el ADN cromosómico, la información genética de estas células está en un bucle circular llamado un plásmido. Las células bacterianas son muy pequeñas, aproximadamente del tamaño de una mitocondria animal (aproximadamente 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro y 10  $\mu\text{m}$  de largo). Las células procariontas presentan tres formas principales: en forma de barra, esférica y en espiral. En vez de someterse a procesos de replicación elaborados como las eucariotas, las células bacterianas se dividen por fisión binaria. Los ejemplos incluyen aunque sin limitarse a bacterias *Bacillus*, bacterias *E. coli* bacterias *Salmonella*.

La expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias marco humanas. Por lo tanto, tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente todas las partes de la proteína (por ejemplo, CDR, marco, dominios C<sub>L</sub>, C<sub>H</sub> (por ejemplo, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>), bisagra, (VL, VH)) son sustancialmente no inmunógenas en seres humanos, con solamente cambios o variaciones de poca importancia en la secuencia. Del mismo modo, los anticuerpos designados de primate (mono, babuino, chimpancé, etc.), roedores (ratón, rata, conejo, cobaya, hámster, y similares) y otros mamíferos designan dichos anticuerpos específico de especie, subgénero, género, subfamilia, familia. Además, los anticuerpos quiméricos incluyen cualquier combinación de los anteriores. Dichos cambios o variaciones opcional y preferentemente retienen o reducen la inmunogenicidad en los seres humanos u otras especies con respecto a los anticuerpos no modificados. Por lo tanto, un anticuerpo humano es distinto de un anticuerpo quimérico o humanizado. Se señala que un anticuerpo humano puede ser producido por una célula animal no humana o procarionta o eucariota que es capaz de expresar los

genes de inmunoglobulina humana funcionalmente reordenados (por ejemplo, la cadena pesada y/o ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo monocatenario, puede comprender un péptido enlazador que no se encuentra en los anticuerpos humanos nativos. Por ejemplo, un Fv que puede comprender un péptido enlazador, tal como de dos a aproximadamente ocho residuos de glicina u otros aminoácidos, que une la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Se considera que dichos péptidos enlazadores son de origen humano.

Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano se “deriva de” una secuencia de línea germinal particular, si se obtiene el anticuerpo a partir de un sistema que usa secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo, mediante la inmunización de un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana o cribando una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humano que se “deriva de” una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede ser identificado como tal mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Un anticuerpo humano seleccionado normalmente es al menos 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de la línea germinal de inmunoglobulina humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como de ser humano, cuando se comparan con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de la línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos el 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98% o 99% idéntica en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular presentará no más de 10 diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede presentar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la línea germinal de inmunoglobulina.

Un “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que presentan una sola especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. La expresión también pretende incluir anticuerpos humanos recombinantes. Procedimientos para fabricar estos anticuerpos se describen en el presente documento.

La expresión “anticuerpo humano recombinante”, tal como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implica splicing de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones de la descripción, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*. Procedimientos para fabricar estos anticuerpos se describen en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por genes de la región constante de cadena pesada.

Las expresiones “anticuerpo policlonal” o “composición de anticuerpo policlonal”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de anticuerpos que se derivan de diferentes líneas de células B. Son una mezcla de moléculas de inmunoglobulina secretadas contra un antígeno específico, que reconoce, cada una, un epítipo diferente.

Las expresiones “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad y afinidad de unión para un epítipo particular.

Tal como se usa en el presente documento, el término “etiqueta” pretende un compuesto o composición directa o indirectamente detectable que está conjugado directa o indirectamente a la composición a detectar, por ejemplo,

polinucleótido o proteína tal como un anticuerpo para generar una composición "etiquetada". El término también incluye secuencias conjugadas al polinucleótido que proporcionarán una señal en el momento de la expresión de las secuencias insertadas, tal como proteína verde fluorescente (GFP) y similares. La etiqueta puede ser detectable por sí misma (por ejemplo etiquetas de radioisótopo o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable. Las etiquetas pueden ser adecuadas para detección a pequeña escala o más adecuadas para cribado de alto rendimiento. Por lo tanto, las etiquetas adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a, radioisótopos, fluoró cromos, compuestos quimioluminiscentes, tintes y proteínas, incluyendo enzimas. La etiqueta puede detectarse simplemente o puede cuantificarse. Una respuesta que es simplemente detectada en general comprende una respuesta cuya existencia meramente es confirmada, mientras que una respuesta que se cuantifica generalmente comprende una respuesta que tiene un valor cuantificable (por ejemplo, numéricamente notificable) tal como una intensidad, polarización, y/u otra propiedad. En ensayos de luminiscencia o fluorescencia, la respuesta detectable puede ser generada directamente a través de un luminóforo o fluoróforo asociado a un componente del ensayo implicado realmente en la unión, o indirectamente usando un luminóforo o fluoróforo asociado con otro componente (por ejemplo, informador o indicador).

Los ejemplos de etiquetas luminiscentes que producen señales incluyen, aunque sin limitarse a, bioluminiscencia y quimioluminiscencia. Una respuesta de luminiscencia detectable comprende generalmente un cambio en, o una aparición de, una señal de luminiscencia. Los procedimientos y luminóforos adecuados para los componentes de ensayo de etiquetado de forma luminiscente son conocidos en la técnica y se describen por ejemplo, en Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6ª ed.). Los ejemplos de sondas luminiscentes incluyen, aunque sin limitarse a, aequorina y luciferasas.

Los ejemplos de etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde malaquita, estilbeno, Lucifer Yellow, Cascade Blue™, y Rojo Texas. Otros colorantes ópticos adecuados se describen en Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6ª ed.).

En otro aspecto, la etiqueta fluorescente se funcionaliza para facilitar unión covalente a un componente celular presente en o sobre la superficie de la célula o tejido tal como un marcador de la superficie celular. Grupos adecuados funcionales, incluyendo, aunque sin limitarse a, grupos isotiocianato, grupos amino, grupos haloacetilo, maleimidas, ésteres de succinimido, y haluros de sulfonilo, todos los cuales pueden ser utilizados para unir la etiqueta fluorescente a una segunda molécula. La elección del grupo funcional de la etiqueta fluorescente dependerá del sitio de unión ya sea a un enlazador, el agente, el marcador o el segundo agente de etiquetado.

## 35 II. Usos de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende un derivado de fXa de la invención para uso en un procedimiento de prevenir o reducir una hemorragia en un sujeto sometido a terapia anticoagulante administrando al sujeto una cantidad efectiva de un derivado proteico de factor Xa. El derivado tiene un sitio activo modificado y un dominio Gla modificado, teniendo de este modo actividad procoagulante reducida o ninguna. El derivado actúa como antídoto y sustancialmente neutraliza la actividad anticoagulante del inhibidor. El derivado es bien deficiente en Gla o sin dominio Gla. El sujeto puede ser un mamífero o, más particularmente, un ser humano.

En otra realización, la invención se refiere a una composición que comprende un derivado de fXa de la invención para uso en un procedimiento para unirse a e inhibir selectivamente un inhibidor del factor Xa administrado de forma exógena en un sujeto. El procedimiento comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un derivado de un derivado de factor Xa tal como se ha descrito anteriormente. El sujeto puede ser una célula o un mamífero, tal como un ser humano.

Los pacientes adecuados para esta terapia se han sometido a terapia anticoagulante anterior, por ejemplo, se les ha administrado uno o más de un anticoagulante, tal como un inhibidor de factor Xa. Los ejemplos de anticoagulantes que son inhibidores del factor Xa, incluyen aunque sin limitarse a, fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmina, NAP-5, rNAPc2, inhibidor de la ruta del factor tisular, DX-9065a, YM-60828, YM-150, apixaban, rivaroxaban, PD-348292, otamixaban, DU-176b, LY517717, GSK913893, heparina de bajo peso molecular y betrixaban, o cualquier combinación de los mismos. La fuente de diversos anticoagulantes se encuentra en toda la descripción.

El derivado tiene un sitio activo modificado y un dominio Gla modificado o eliminado. El derivado del factor Xa no tiene o muestra ninguna actividad procoagulante. En este aspecto, el derivado comprende al menos los residuos de

aminoácido 40 a 448, 45 a 448, o 46 a 448 de la SEQ ID NO. 3 o equivalentes de la misma. En otro aspecto, el derivado comprende al menos los residuos de aminoácido 45 a 139 y 195 a 448 o 46 a 139 y 195-448 de la SEQ ID NO. 3 o equivalentes de la misma.

- 5 El derivado de fXa puede conservar la estructura tridimensional del sitio activo de la proteína fXa. Información respecto a la estructura tridimensional del des-Gla fXa puede encontrarse en Brandstetter, H y col. J. Bio. Chem., 1996, 271: 29988-29992.

En otro aspecto de la invención, los derivados de fXa pueden carecer del dominio Gla así como uno cualquiera de los dos dominios EGF. En otro aspecto de la invención, los derivados de fXa carecen completamente de cadena ligera pero contiene un dominio catalítico de serina proteasa presente en la cadena pesada. Otras modificaciones de la cadena pesada pueden comprender el dominio catalítico de serina proteasas relacionadas que son capaces de unirse a inhibidores. Las serina proteasas relacionadas tienen dominios catalíticos que poseen suficiente similitud estructural con el dominio catalítico fXa y son, por lo tanto, capaces de unirse a inhibidores de fXa de molécula pequeña. Los ejemplos de serina proteasas relacionadas incluyen, aunque sin limitarse a, proteasas de mamífero tales como caliceína plasmática, trombina y tripsina o la proteasa bacteriana subtilisina. Estos derivados incluyen además modificaciones en los residuos de aminoácidos equivalentes a residuos serina (SER379) o ácido aspártico (ASP282) del sitio activo, descritos en el presente documento.

20 En algunas realizaciones, la proteína del factor Xa con actividad procoagulante reducida comprende una cadena ligera modificada, donde la modificación es sustitución, adición o delección del dominio Gla para reducir la unión a la membrana fosfolipídica de fXa. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos principal de fXa no ha cambiado, pero la cadena lateral de ciertos aminoácidos se ha cambiado. Los ejemplos del dominio Gla modificado que reduce la unión a la membrana fosfolipídica de fXa comprenden polipéptidos o proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos primaria de la SEQ ID NO. 3 o un equivalente de la misma, con al menos una sustitución, adición o delección de aminoácidos en comparación con el dominio Gla de una proteína de factor Xa humano de tipo silvestre. En algunas realizaciones, al menos un aminoácido que es sustituido o delecionado es un ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla). Los residuos de Gla se muestran en la SEQ ID NO. 3 en las posiciones de aminoácidos 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 32 y 39. La secuencia de aminoácidos primaria del antídoto puede ser idéntica a la SEQ ID NO. 3 o equivalente de la misma, pero es una proteína de factor Xa no carboxilada, subcarboxilada o descarboxilada. El antídoto puede ser un des-Gla anhidro-fXa o des-Gla fX-S379A. En algunas realizaciones de la divulgación, la proteína del factor Xa con unión a la membrana fosfolipídica reducida comprende, además, modificación o delección de los EGF1 y/o EGF2 (mostrados en la figura 3 como los aminoácidos 46 a 84 y 85 a 128, respectivamente) o una parte, es decir fragmento de los dominios EGF1 y/o EGF2. En algunas realizaciones, toda la cadena ligera o sustancialmente toda la cadena ligera se modifica o elimina pero contiene un dominio catalítico de serina proteasa presente en la cadena pesada. Por ejemplo, la proteína de fXa modificada con unión a la membrana fosfolipídica reducida puede contener solamente la cadena pesada o el fXa modificado puede contener la cadena pesada y un fragmento de la cadena ligera que contiene Cys132, el residuo de aminoácido que forma el único puente disulfuro con Cys302 de la cadena pesada en la SEQ ID NO. 3. En algunas realizaciones, el derivado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 12. En algunas realizaciones, el derivado es el polipéptido bicatenario que comprende la SEQ ID NO. 13. En otras realizaciones, el derivado es el polipéptido de la SEQ ID NO. 15.

En algunas realizaciones, el derivado de la proteína del factor Xa comprende una cadena pesada modificada que contiene el dominio catalítico de dicha proteína del factor Xa. En algunas realizaciones, al menos una sustitución de aminoácidos está presente en una o más posiciones de aminoácido de fXa seleccionadas de entre el grupo que consiste en Glu216, Glu218, Arg332, Arg347, Lys351 y Ser379 en la SEQ ID NO. 3 y 7 (Glu37, Glu39, Arg150, Arg165, Lys169 y Ser195 en numeración de quimotripsina, respectivamente). En algunas realizaciones, el antídoto es una proteína del factor Xa con residuo serina (Ser379 en la SEQ ID NO. 3 y 7, Ser195 en numeración de quimotripsina) en el sitio activo modificado a deshidroalanina o alanina. Dichas modificaciones pueden realizarse a proteína fXa de tipo silvestre o a cualquiera de las proteínas de fXa modificadas o fragmentos descritos anteriormente. Por ejemplo, el des-Gla anhidro-fXa con residuos serina en el sitio activo sustituidos por deshidroalanina descrito en el ejemplo 1 ha mostrado actividad de antídoto.

En otras realizaciones, el derivado tiene interacción reducida con ATIII, cofactores fV/fVa y fVIII/fVIIIa en comparación con factor Xa de tipo silvestre o de origen natural. En algunas realizaciones, al menos una sustitución de aminoácidos está presente en la posición de aminoácido Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 o Arg424 en la SEQ ID NO. 3 y 7 (Arg125, Glu129, Arg165, Lys169, Lys230 o Arg240 en numeración de quimotripsina, respectivamente). Dichas modificaciones pueden realizarse a proteína fXa de tipo silvestre o a cualquiera de las proteínas de fXa modificadas o fragmentos descritos anteriormente.

En otras realizaciones de la divulgación, el antídoto es una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio catalítico de serina proteasa que puede imitar la capacidad de unión al inhibidor de la cadena pesada de fXa. Dichas proteínas pueden incluir proteasas de mamífero tales como calicreína plasmática, trombina, tripsina (o su homólogo bacteriano subtilisina) que han sido modificadas de forma recombinante para carecer de actividad serina proteasa capaz de escindir sustratos de proteína pero aún posee las características estructurales del sitio activo escindido.

También son proporcionadas por esta invención composiciones farmacéuticas que contienen uno o más de los derivados del factor Xa modificados y un transportador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones se administran a un sujeto que lo necesita en una cantidad que proporcionará el beneficio deseado, una reducción o detención de hemorragia. Las composiciones pueden administrarse con cualquier agente o terapia adecuada que complementa o mejora la actividad del derivado del factor Xa. Un ejemplo de estos es un segundo agente capaz de prolongar la semivida en plasma del antídoto. Los ejemplos de segundos agentes adecuados incluyen, aunque sin limitarse a, un anticuerpo anti-fXa que reconoce en exosito de la cadena pesada de fXa o un derivado de fXa unido alfa-2-macroglobulina. La formación del complejo entre el derivado de fXa y un segundo agente (anticuerpo de exosito o alfa-2-macroglobulina) bloquearía interacciones macromoleculares pero conserva la capacidad de activar uniones al inhibidor dependientes del sitio. Los ejemplos de anticuerpos anti-fXa adecuados para coadministración incluyen, aunque sin limitarse a, los descritos en Yang Y.H., y col., *J. Immunol.* 2006, 1; 177(11): 8219-25, Wilkens, M y Krishnaswamy, S., *J. Bio. Chem.*, 2002, 277 (11), 9366-9374, y Church WR, y col., *Blood*, 1988, 72(6), 1911-1921.

En algunas realizaciones, una proteína de factor Xa se modifica mediante medios químicos, enzimáticos o recombinantes. Por ejemplo, el sitio activo Ser379 puede modificarse químicamente a deshidroalanina, y el dominio Gla puede eliminarse enzimáticamente mediante digestión con quimotripsina tal como se describe en el ejemplo 1. Un fXa modificado descrito en el presente documento también puede producirse mediante medios recombinantes modificando la secuencia del cADN que codifica fX de tipo silvestre (SEQ ID NO. 2) descrita con más detalles en el ejemplo 7 para expresión directa de antídoto recombinante (r-antídoto) o como alternativa, una proteína fX con la modificación deseada puede producirse mediante medios recombinantes seguida por activación del fXa modificado por un activador, tal como un veneno de serpiente, por ejemplo veneno de víbora de Russell, y complejos de FVIIa/factor tisular o fIXa/fVIIIa.

Los sujetos que se beneficiarán de la administración de las composiciones descritas en el presente documento y los procedimientos adjuntos incluyen aquellos que están experimentando, o predispuestos a un evento de hemorragia clínica grave o un evento de hemorragia no grave clínicamente significativa. Los ejemplos de eventos de hemorragia clínica grave se seleccionan de entre el grupo que consiste en hemorragia, hemorragia en órganos vitales, hemorragia que requiere reintervención o un nuevo procedimiento terapéutico, y un índice de hemorragia de  $\geq 2,0$  con una hemorragia manifiesta asociada. (Turpie AGG, y col., *NEJM*, 2001, 344: 619-625.) Adicionalmente, el sujeto puede estar experimentando o predispuesto a un evento de hemorragia no grave seleccionado de entre el grupo que consiste en epistaxis que es persistente o recurrente y en cantidad sustancial o no se detendrá sin intervención, hemorragia rectal o del tracto urinario que no se alzan hasta un nivel que requiere un procedimiento terapéutico, hematomas sustanciales en sitios de inyección o en cualquier otro lugar que son espontáneos o se producen con traumatismo trivial, pérdida de sangre sustancial más de habitualmente asociada con un procedimiento quirúrgico que no requiere drenaje, y hemorragia que requiere transfusión no planificada.

En algunas realizaciones, el antídoto se administra después de la administración de una sobredosis de un inhibidor de fXa o antes de una cirugía, que puede exponer a los sujetos al riesgo de hemorragia.

En cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, debe entenderse, incluso aunque no siempre se afirma explícitamente, que una cantidad efectiva del derivado se administra al sujeto. La cantidad puede ser determinada empíricamente por el facultativo encargado del tratamiento y variará con la edad, el género, el peso y la salud del sujeto. Factores adicionales a considerar por el facultativo encargado del tratamiento incluyen, aunque sin limitarse a, la identidad y/o cantidad de inhibidor del factor Xa, que puede haber sido administrado, la vía o el modo en que el antídoto será administrado al sujeto, la formulación del antídoto, y el criterio de valoración terapéutico para el paciente. Con estas variables en mente, un experto en la materia administrará una cantidad terapéuticamente efectiva al sujeto a tratar. Se contempla que una cantidad terapéuticamente efectiva de los antídotos descritos en el presente documento suficiente para contrarrestar, o sustancialmente neutralizar, un anticoagulante en un sujeto puede contener de aproximadamente 0,01 miligramos de antídoto por kilogramo de peso corporal de un sujeto a 1 gramo de antídoto por kilogramo de peso corporal de un sujeto de antídoto. Se contempla, además, que el antídoto puede proporcionarse al sujeto en un intervalo de concentración de aproximadamente 10 nanomolar a aproximadamente 100

micromolar, o de aproximadamente 10 nanomolar a aproximadamente 5 micromolar, o de aproximadamente 100 nanomolar a aproximadamente 2,5 micromolar.

Las composiciones pueden administrarse en cantidades que son eficaces para que el antídoto reconozca selectivamente y se una, directa o indirectamente, al inhibidor del factor Xa en el sujeto. También pueden administrarse en cantidades para inhibir sustancialmente o sustancialmente neutralizar los inhibidores del factor Xa administrados de forma exógena en un sujeto.

En otro aspecto más, la invención se refiere a una composición farmacéutica para invertir o neutralizar la actividad anticoagulante de un inhibidor del factor Xa administrado a un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de un antídoto al inhibidor del factor Xa y un transportador farmacéuticamente aceptable, a condición de que el antídoto no sea factor VIIa derivado de plasma, factor VIIa recombinante, plasma fresco congelado, concentrados del complejo de protrombina y sangre completa.

En algunas realizaciones, el antídoto es uno cualquiera de los antídotos de la invención. En algunas realizaciones, el antídoto está conjugado con un resto capaz de prolongar la semivida en circulación del antídoto. En algunas realizaciones, el resto se selecciona de entre el grupo que consiste en polietilenglicol, un grupo acilo, un liposoma, una proteína transportadora, una membrana fosfolipídica artificial, y una nanopartícula. Por ejemplo, un residuo lisina o cisteína no en el sitio activo de un derivado de fXa descrito en el presente documento puede modificarse químicamente para unirse a una molécula de polietilenglicol. Otros procedimientos proporcionados en Werle, M. & Bernkop-Schnürch, A. Strategies to Improve Plasma Half Life Time of Peptide and Protein Drugs, *Amino Acids* 2006, 30(4): 351-367 pueden usarse para prolongar la semivida en plasma de los antídotos de esta invención.

En otras realizaciones de la invención, la semivida del derivado de fXa mejora acoplado el antídoto a dominios transportadores de Fc. En una realización, el antídoto está acoplado a un fragmento Fc, tal como una parte peptídica de inmunoglobulina o un fragmento de IgG1. En una realización, se contempla una proteína quimérica que comprende el derivado de fXa y la parte peptídica de inmunoglobulina. En otra realización más, el derivado de fXa y el péptido de inmunoglobulina se acoplan mediante una reacción química, tal como un puente disulfuro, con la cadena pesada de IgG humana y regiones constantes de cadena ligera kappa.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un agente capaz de prolongar la semivida plasmática del antídoto. En otro aspecto, la composición farmacéutica ha sido coformulada con un agente capaz de prolongar la semivida plasmática del antídoto. En algunas realizaciones, el agente coadministrado o coformulado es un anticuerpo anti-fXa que reconoce el exosito de fXa o un derivado de fXa unido a alfa-2-macroglobulina.

### III. Antídotos

#### Derivados de factor Xa

Un aspecto de la presente invención es el uso de derivados de fXa como antídotos seguros y eficaces para neutralizar sustancialmente la actividad de un inhibidor de la coagulación fXa para prevenir o detener una hemorragia. Se contempla que los antídotos de la presente invención serán útiles para invertir el efecto anticoagulante de un inhibidor de fXa, especialmente un inhibidor de molécula pequeña dirigido al sitio activo.

Un antídoto para un inhibidor de fXa tiene actividad procoagulante reducida o ninguna pero es capaz de unirse con un inhibidor de fXa. Se contempla que dicha actividad limitada permita dosificar del antídoto a un nivel mayor que el fXa de tipo silvestre circulante. Ciertos derivados de fXa, tales como des-Gla fXa y FXa deficiente en Gla, son antídotos adecuados. Además de tener actividad procoagulante reducida o disminuida, los antídotos de la presente invención deben ser también sustancialmente no inmunógenos para el sujeto. Un antídoto puede contener una combinación de dos o más de las anteriores mutaciones y/o modificaciones. Además, cualquiera de los anteriores derivados de fXa puede administrarse en solitario o en combinación con otro.

El factor Xa es una serina proteasa en la ruta de coagulación sanguínea responsable de convertir protrombina en trombina. Se produce a partir del factor X inactivo tras la activación por la Xasa intrínseca (complejo formado por el factor IXa con su cofactor, factor VIIIa) o la Xasa extrínseca (complejo formado por el factor VIIa con su cofactor, factor tisular). El fX activado (fXa) puede someterse a escisión autocatalítica adicional en el extremo C de su cadena pesada, que convierte fXa $\alpha$  en la subforma fXa $\beta$  (Jesty, J y col. *J. Biol. Chem.* 1975, 250(12): 4497-4504). Tanto fXa $\alpha$  como fXa $\beta$  son materiales adecuados para la presente invención. El propio fXa convierte la protrombina a una velocidad lenta que no es suficiente para apoyar la coagulación. Solamente cuando forma un complejo protrombinasa con

cofactores  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfolípido, y factor Va, fXa puede activar la protrombina a una velocidad suficientemente rápida para apoyar la coagulación (Skogen, W.F., y col., J. Biol. Chem. 1984, 259(4): 2306-10). El complejo requiere unión entre el fosfolípido cargado negativamente y residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico en el dominio Gla de fXa mediante establecimiento de puentes con  $\text{Ca}^{2+}$ .

5 Por lo tanto, aunque el dominio Gla no contiene el sitio activo de fXa, permite a fXa formar el complejo de protrombinasa a través de los residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico. Esto se demuestra mediante eliminación selectiva del dominio Gla de fXa mediante digestión con quimotripsina (véase la figura 7 y el ejemplo 1). Se realizaron ensayos de coagulación en fXa durante la evolución temporal de escisión del dominio Gla mediante digestión con quimotripsina.  
10 Se ha descrito (Skogen y col., J. Biol. Chem. 1984, 259(4): 2306-10) que un complejo protrombinasa reconstituido que comprende fXa sin dominio Gla, fVa, fosfolípidos e iones calcio produce trombina a una velocidad significativamente reducida (0,5% de producto generado en comparación con el complejo de control que contiene fXa nativo). Tal como se muestra en la figura 7, la actividad de fXa en la formación de coágulos se redujo parcialmente después de que fXa fue digerido mediante quimotripsina durante 15 minutos y la actividad se perdió completamente después de 30 minutos  
15 de digestión. Se ha descubierto, por lo tanto, que fXa no carboxilado o descarboxilado, que carecen de los residuos de ácido gamma-carboxiglutámico apropiados requeridos para unión a la membrana dependiente de calcio, son incapaces de ensamblaje del complejo de coagulación dependiente de membrana y no apoyan la coagulación sanguínea (Mann, KG y col., Blood, 1990, 76: 1-16).

20 Se ha establecido también que fXa deficiente en dominio Gla es capaz de unirse a inhibidores de fXa dirigidos al sitio activo. (Brandstetter, H y col., J. Bio. Chem., 1996, 271: 29988-29992). Ha habido informes de cristalografía de inhibidor de fXa de molécula pequeña unido a des-Gla fXa humano, que proporcionaron descripción estructural del sitio activo escindido (Brandstetter, J. Bio. Chem., 1996, 271: 29988-29992 y Roehrig, J. Med. Chem. 2005, 48(19): 5900-8). La figura 8 muestra que un des-Gla anhidro-fXa mostraba una afinidad de unión de 0,319 nM con un inhibidor  
25 de fXa betrixaban, comparable a la de un fXa nativo.

Se ha descubierto ahora que des-Gla fXa, y otros derivados de fXa que tienen actividad procoagulante reducida pero son capaces de unión al inhibidor de fXa, pueden usarse como un antídoto para un inhibidor de fXa. Tal como se muestra en la figura 9, el des-Gla anhidro-fXa mostraba inversión completa de actividad anticoagulante de betrixaban  
30 a una concentración de 680 nM. Tal como se detalla en el ejemplo 2, la generación de trombina se inició añadiendo reactivo que contenía TF (Innovin) y, por lo tanto, indicativa de función de factores de coagulación en la ruta de coagulación extrínseca. También se ha demostrado en los ejemplos 9-13, que el antídoto recombinante es útil para invertir una amplia variedad de anticoagulantes.

35 Ensayos de prolongación de la coagulación con el reactivo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) (Actina FS) que determinan la función del factor de coagulación en la ruta de coagulación intrínseca también indican que el des-Gla anhidro-fXa posee actividad de antídoto. La figura 10 muestra el efecto de antídoto dependiente de la dosis de des-Gla anhidro-fXa contra 250 nM de betrixaban, con inversión completa a 600 nM. La figura 11 muestra que des-Gla anhidro-fXa también fue capaz de invertir la actividad anticoagulante de otro inhibidor de fXa, enoxaparina. La  
40 figura 12 muestra que des-Gla anhidro-fXa no mostraba actividad de antídoto significativa contra un inhibidor de trombina directo, argatroban. Por lo tanto, el des-Gla anhidro-fXa es un antídoto selectivo para inhibidor de fXa y es capaz de restaurar la actividad procoagulante de fXa iniciada por la ruta extrínseca o la intrínseca.

Además, la actividad de antídoto de des-Gla anhidro-fXa se demostró mediante los ensayos de prolongación del aPTT  
45 medido con un temporizador de coagulación tradicional. Tal como se muestra en la figura 13, el propio des-Gla anhidro-fXa no tiene ningún efecto sobre el aPTT de plasma de control a las concentraciones más altas ensayadas (2576 nM). 400 nM de betrixaban prolongaban el aPTT más de dos veces. Este efecto anticoagulante de betrixaban es invertido por des-Gla anhidro-fXa de manera sensible a la dosis, con retorno de aPTT a un nivel cercano al normal de plasma de control a concentraciones de antídoto mayores de 1610 nM.

50 Se contempla que truncamientos adicionales en la cadena ligera de fXa, por ejemplo, delección adicional del dominio EGF1, los dominios EGF1 más EGF2, o fragmentos de los mismos, y fXa inactivo con solamente la cadena pesada pueden ser antídotos útiles de esta invención.

55 FXa deficiente en dominio Gla no apoya coagulación normal por debajo de la concentración fisiológicamente relevante. Sin embargo, la proteína tiene la capacidad de escindir muchos sustratos y causar coagulación a concentraciones más elevadas. Por ejemplo, Skogen y col., (Skogen, W.F., y col., J. Biol. Chem. 1984, 259(4): 2306-10) mostraron que des-Gla fXa bovino tiene aproximadamente un 0,5-1,0% de actividad del complejo de protrombinasa con respecto al fXa de tipo silvestre. Por lo tanto, modificaciones que reducen adicionalmente o eliminan completamente la actividad

procoagulante de un derivado de fXa están contempladas por procedimientos de la invención. Dicha modificación puede ser, por ejemplo, en un dominio catalítico de fXa.

Varias maneras de modificar el dominio catalítico en la cadena pesada de fXa para reducir su actividad procoagulante están contempladas. El residuo del sitio activo S379 de fXa (tal como se muestra en la SEQ ID No. 7), por ejemplo, puede sustituirse selectivamente por deshidroalanina (véase el ejemplo 1) o alanina (véase el ejemplo 6) para reducir o eliminar la actividad procoagulante. También se conoce que la formación de un complejo entre fXa y un reactivo dirigido al exosítio de fXa puede bloquear la afinidad de unión macromolecular de fXa, reduciendo de este modo su actividad procoagulante mientras conserva afinidad de unión a molécula pequeña en el sitio activo. Este reactivo dirigido al exosítio incluye, sin limitación, anticuerpos monoclonales dirigidos a una región eliminada del sitio activo (Wilkins, M y Krishnaswamy, S, J. Bio. Chem., 2002, 277 (11), 9366-9374), o  $\alpha$ -2-macroglobulina. Se ha conocido que el complejo  $\alpha$ -2-macroglobulina-serina proteasa, tal como con tripsina, trombina o fXa, es capaz de unirse a sustrato de molécula pequeña (Kuroiwa, K. y col., Clin. Chem. 1989, 35(11), 2169-2172).

También se conoce que un fXa inactivo con modificaciones únicamente en la cadena pesada, mientras mantiene su cadena ligera sin cambios, actuaría como un inhibidor de protrombinasa (Hollenbach, S. y col., Thromb. Haemost., 1994, 71(3), 357-62) dado que interfiere en la actividad procoagulante de fXa normal, tal como se muestra en la figura 6. Por lo tanto, el derivado de fXa puede presentar modificaciones tanto en la cadena ligera como en la cadena pesada. Se ha descubierto que estas modificaciones reducen o eliminan las actividades tanto procoagulante como anticoagulante, mientras conservan la capacidad de unión a inhibidores del derivado de fXa.

Pueden usarse varios procedimientos para producir derivados de fXa deficiente en dominio Gla u otros derivados de fXa divulgados en el presente documento. Por ejemplo, el dominio Gla puede eliminarse completamente mediante escisión quimotriptica, produciendo fXa sin dominio Gla. Como alternativa, un fX sin dominio Gla puede producirse mediante escisión quimotriptica de fX nativo. El fX sin dominio Gla puede convertirse entonces en fXa sin dominio Gla mediante un activador de fX. fX puede aislarse de plasma de la misma o una especie diferente que el sujeto a tratar. fX bovino, por ejemplo, ha demostrado ser funcional en ensayos en plasma humano. Los ejemplos de un activador de fX incluyen, sin limitación, un veneno de serpiente, tal como veneno de víbora de Russell, y complejos de fVIIa/factor tisular o fIXa/fVIIIa. Dicho medio es conocido para un experto en la materia. Por ejemplo, Rudolph A.E. y col., describieron un fXa recombinante producido a partir de un factor X (fX) recombinante con una única sustitución de Arg347 por Glutamina (fXR347N) (Biochem. 2000, 39 (11): 2861 -2867). En una realización, los derivados de fXa producidos a partir de fuentes no humanas son no inmunógenos o sustancialmente no inmunógenos. El ejemplo 7 también proporciona un procedimiento de producción de un antídoto recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 12.

Los derivados de fXa también pueden purificarse a partir de plasma humano, o pueden producirse mediante un procedimiento de ADN recombinante donde un gen apropiado para el derivado de fXa se expresa en un organismo huésped adecuado. La expresión y purificación de fXa recombinante ha sido descrita por varios grupos, véase, por ejemplo, Larson, P.J., y col., Biochem., 1998, 37: 5029-5038, y Camire, R.M., y col., Biochem., 2000, 39, 14322-14329 para producir fX recombinante; Wolf, D.L. y col., J. Bio. Chem., 1991, 266(21): 13726-13730 para producir fXa recombinante. fXa modificado puede prepararse de acuerdo con estos procedimientos usando un cADN modificado genéricamente que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica el fXa mutante deseado. El ejemplo 6 da más detalles para expresión directa de un fXa sin dominio Gla-S379 mutante con actividad funcional como antídoto.

El fXa mutado o modificado en el sitio activo con dominio Gla deficiente, tal como fXa subcarboxilado, también puede ser útil como antídoto de inhibidor de fXa. El fXa subcarboxilado puede prepararse mediante medios recombinantes reteniendo derivados de vitamina K durante la expresión de proteínas (los derivados de vitamina K son necesarios para modificación postraducciona para formar los residuos de Gla) o añadiendo antagonistas de vitamina K tales como warfarina durante el cultivo tisular. fXa descarboxilado puede prepararse calentando (Bajaj P., J. Biol. Chem., 1982, 257(7): 3726-3731) o mediante digestión proteolítica mediante quimotripsina (Morita T., y col., J. Biol. Chem., 1986, 261(9): 4015-4023). El antídoto también puede generarse en sistemas procariotas seguido por replegamiento o constitución *in vitro* del sitio de unión del inhibidor de fXa.

Los residuos de Gla también pueden modificarse químicamente para eliminar el grupo carboxilo responsable de unión a la membrana dependiente de iones calcio. Por ejemplo, los grupos carboxilo en los residuos de Gla pueden eliminarse selectivamente en condiciones de descarboxilación o pueden estar cubiertos, por ejemplo, mediante esterificación o aminación. Es deseable que dicha esterificación o aminación sea resistente a hidrólisis *in vivo* de modo que el fXa modificado no se convierta fácilmente en fXa activo, lo que puede causar trombosis.

Otros mutantes o derivados de fXa también pueden ser antídotos útiles de esta divulgación. En una realización, esta invención abarca el uso de mutantes descritos en Peter J. Larson y col., *Biochem.*, 1998, 37: 5029-5038 como antídotos de inhibidores de fXa.

- 5 En otra realización, esta divulgación abarca el uso de mutantes de fXa catalíticamente inactivos para preparar antídotos de inhibidores de fXa. Por ejemplo, mutantes descritos en Sinha, U., y col., *Protein Expression and Purif.* 1992, 3: 518-524 rXai, mutantes con modificaciones químicas, tales como deshidroalanina (anhidro fXa), tal como se describe en Nogami, y col., *J. Biol. Chem.* 1999, 274(43): 31000-7. FXa con serina en el sitio activo (Ser379 en numeración de fX tal como se muestra en la SEQ ID NO. 7, y Ser195 en numeración de quimotripsina) sustituida por alanina (fXa-S379A en numeración de fX, o fXa-S195A en numeración de quimotripsina), donde la actividad procoagulante se eliminó, también pueden usarse como antídotos de inhibidores de fXa. La divulgación también prevé derivados de fXa con el residuo serina del sitio activo acilado de forma irreversible que aún es capaz de unirse a inhibidores de molécula pequeña. FXa con la serina del sitio activo acilada de forma reversible ha sido descrita por Wolf, y col., *Blood*, 1995, 86(11): 4153-7. Dicha acilación reversible, sin embargo, es capaz de producción dependiente del tiempo de fXa activo y puede conducir a un exceso de fXa activo durante un periodo de tiempo. La velocidad de desacilación puede reducirse mediante estrategias similares a las descritas en Lin P.H. y col., *Thrombosis Res.*, 1997, 88(4), 365-372. Por ejemplo, moléculas de fXa con Ser379 (Ser195 en numeración de quimotripsina) acilada mediante grupos 4-metoxibencilo y 3-bromo-4-metoxibencilo recuperan menos del 50% de su actividad original cuando se incuban en un tampón que tiene pH 7,5 a 37°C durante 4 horas.

20 Una realización de la divulgación se refiere al uso de derivados de fXa con mutaciones en residuos de fXa que se sabe que son importantes para interacción de fXa con el cofactor fV/fVa. Dichos residuos incluyen, sin limitación, Arg306, Glu310, Arg347, Lys351 o Lys414 (SEQ ID NO. 3 y 7, estos aminoácidos corresponden a Arg125, Glu129, Arg165, Lys169, Lys230 en la numeración de quimotripsina). Los ejemplos de dichos mutantes se describen en Rudolph, A.E. y col., *J. Bio. Chem.*, 2001, 276: 5123-5128. Además, mutaciones en residuos de fXa que se sabe que son importante para la interacción fVIII/fVIIIa, tales como Arg424 en la SEQ ID NO. 3 y 7 (Arg240 en numeración de quimotripsina), también pueden usarse como antídotos de inhibidores de fXa. Los ejemplos de dichos mutantes se describen en Nogami, K. y col., *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(32): 33104-33113.

30 Otra modificación de residuos del sitio activo de fXa o residuos que se sabe que son importantes para interacciones con serina proteasa también pueden conducir a antídotos útiles de esta invención, por ejemplo, sustitución de Glu216, Glu218, y Arg332 en la SEQ ID NO. 3 y 7 (Glu37, Glu39 y Arg150 en numeración de quimotripsina, respectivamente) con otros residuos de aminoácido.

35 En una realización, la actividad procoagulante residual de un antídoto, según lo evaluado mediante ensayo de escisión de sustrato amidolítico, es < 1%, preferentemente < 0,1%, más preferentemente < 0,05 % de fXa nativo derivado de plasma humano. Por ejemplo, no hay ninguna actividad procoagulante medible para fXa-S379A recombinante cuando el sitio activo Ser379 (S195 en numeración de quimotripsina) es sustituido por un residuo de alanina según lo medido mediante ensayos de coagulación.

40 La invención se refiere además a secuencias de ácido nucleico, en particular secuencias de ADN, que codifican los derivados de fXa descritos anteriormente. Éstas pueden determinarse fácilmente traduciendo la secuencia polipeptídica de vuelta a la secuencia de ADN correspondiente de acuerdo con el código genético. Los codones usados preferentemente son aquellos que causan la expresión correcta en el organismo huésped requerido. Las secuencias de ácido nucleico pueden prepararse mediante mutagénesis específica de sitio comenzando a partir de la secuencia génica de fXa natural o incluso mediante síntesis de ADN completo.

### **Polipéptidos de la invención**

50 En ciertos aspectos, la invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 12, 13 o 15. También están abarcados por esta invención polipéptidos adecuados para uso en administración parenteral que tienen al menos el 80% de homología con la SEQ ID NO. 12, 13 o 15, donde el polipéptido:

- 55 (i) tiene actividad catalítica reducida,  
 (ii) es capaz de unirse al inhibidor del factor Xa,  
 (iii) no puede ensamblarse en el complejo de protrombinasa, y  
 (iv) comprende un dominio Gla modificado que carece de residuos de aminoácidos 6-39 de la SEQ ID NO. 3.

Los polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de la invención pueden prepararse expresando polinucleótidos que codifican las secuencias polipeptídicas de esta invención en una célula huésped apropiada. Esto puede conseguirse mediante procedimientos de tecnología de ADN recombinante conocidos por los expertos en la materia. Por consiguiente, esta divulgación también proporciona procedimientos para producir de forma recombinante los polipéptidos de esta invención en una célula huésped eucariota o procarionta. Las proteínas y polipéptidos de esta invención también pueden obtenerse mediante síntesis química usando un sintetizador de péptidos automatizado disponible en el mercado tal como los fabricados por Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc., Modelo 430A o 431A, Foster City, CA, EE. UU. La proteína o polipéptido sintetizado pueden precipitarse y purificarse adicionalmente, por ejemplo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Por consiguiente, esta divulgación también proporciona un proceso para sintetizar químicamente las proteínas de esta invención proporcionando la secuencia de la proteína y reactivos, tales como aminoácidos y enzimas y uniendo entre sí los aminoácidos en la orientación y la secuencia lineal apropiadas.

Es conocido para los expertos en la materia que pueden realizarse modificaciones a cualquier péptido para proporcionarle propiedades alteradas. Los polipéptidos de la invención pueden modificarse para incluir aminoácidos no naturales. Por lo tanto, los péptidos pueden comprender D-aminoácidos, una combinación de D- y L-aminoácidos, y diversos aminoácidos "de diseño" (por ejemplo,  $\beta$ -metil aminoácidos, C- $\alpha$ -metil aminoácidos, y N- $\alpha$ -metil aminoácidos, etc.) para llevar propiedades especiales a péptidos. Adicionalmente, asignando aminoácidos específicos en etapas de acoplamiento específicas, pueden generarse péptidos con hélices  $\alpha$ , giros  $\beta$ , láminas  $\beta$ , giros  $\alpha$ , y péptidos cíclicos. Generalmente, se cree que se prefiere estructura secundaria  $\alpha$ -helicoidal o estructura secundaria aleatoria.

En una realización adicional de la divulgación, se seleccionarán subunidades de polipéptidos que otorgan propiedades químicas y estructurales útiles. Por ejemplo, péptidos que comprenden D-aminoácidos pueden ser resistentes a proteasas específicas de L-aminoácidos *in vivo*. Compuestos modificados con D-aminoácidos pueden sintetizarse con los aminoácidos alineados en orden inverso para producir los péptidos de la invención como péptidos retro-inversos. Además, la presente divulgación prevé preparar péptidos que tienen propiedades estructurales mejor definidas, y el uso de peptidomiméticos, y enlaces peptidomiméticos, tales como enlaces éster, para preparar péptidos con propiedades novedosas. En otra realización, puede generarse un péptido que incorpore un enlace peptídico reducido, es decir,  $R_1-CH_2NH-R_2$ , donde  $R_1$ , y  $R_2$  son residuos o secuencias de aminoácido. Un enlace peptídico reducido puede introducirse como una subunidad dipéptido. Dicha molécula sería resistente a hidrólisis de enlaces peptídicos, por ejemplo, actividad proteasa. Dichas moléculas proporcionarían ligandos con función y actividad únicas, tales como semividas prolongadas *in vivo* debido a resistencia a descomposición metabólica, o actividad proteasa. Además, es bien conocido que, en ciertos sistemas, péptidos constreñidos muestran actividad funcional mejorada (Hruby (1982) Life Sciences 31: 189-199 y Hruby y col., (1990) Biochem J. 268: 249-262); la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un péptido constreñido que incorpora secuencias aleatorias en todas las demás posiciones.

Los siguientes aminoácidos no convencionales pueden incorporarse en los péptidos de la invención para introducir motivos conformacionales particulares: 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato (Kazmierski y col., (1991) J. Am. Chem. Soc. 113: 2275-2283.); (2S, 3S)-metil-fenilalanina, (2S, 3R)-metil-fenilalanina, (2R, 3S)-metil-fenilalanina y (2R, 3R)-metil-fenilalanina (Kazmierski y Hruby (1991) Tetrahedron Lett 32 (41): 5769-5772); ácido 2-aminotetrahidronaftaleno-2-carboxílico (Landis (1989) Tesis Doctoral, Universidad de Arizona); hidroxí-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato (Miyake y col., (1989) J. Takeda Res Labs. 43:53-76) ácido carboxílico de histidina e isoquinolina (Zechel y col., (1991) Int. J. Pep Protein Res 38 (2): 131-138); e HIC (histidina urea cíclica), (Dharanipragada y col., (1993) Int. J. Pep. Protein Res 42 (1): 68-77) y (Dharanipragada y col., (1992) Acta Crystallogr. C. 48: 1239-1241).

Los siguientes análogos de aminoácido y peptidomiméticos pueden incorporarse en un péptido para inducir o favorecer estructuras secundarias específicas: LL-Acp (ácido LL-3-amino-2-propenidona-6-carboxílico), un análogo de dipéptido que induce giros  $\beta$  (Kemp y col., (1985) J. Org. Chem. 50: 5834-5838); análogos que inducen lámina  $\beta$  (Kemp y col., (1988) Tetrahedron Lett. 29: 5081-5082); análogos que inducen giro  $\beta$  (Kemp y col., (1988) Tetrahedron Lett. 29: 5057-5060); análogos que inducen hélice  $\alpha$  (Kemp y col., (1988) Tetrahedron Lett. 29: 4935-4938); análogos que inducen giro  $\alpha$  (Kemp y col., (1989) J. Org. Chem. 54: 109:115); análogos proporcionados por las siguientes referencias: Nagai y Sato (1985) Tetrahedron Lett. 26: 647-650; y DiMaio y col., (1989) J. Chem. Soc. Perkin Trans. p. 1687; un análogo de giro Gly-Ala (Kahn y col., (1989) Tetrahedron Lett. 30: 2317); isómero de enlace amida (Clones y col., (1988) Tetrahedron Lett. 29: 3853-3856); tetrazol (Zabrocki y col., (1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 5875-5880); DTC (Samanen y col., (1990) Int. J. Protein Pep. Res. 35: 501:509); y análogos enseñados en Olson y col., (1990) J. Am. Chem. Soc. 112: 323-333 y Garvey y col., (1990) J. Org. Chem. 56: 436. Miméticos restringidos conformacionalmente de giros

beta y protuberancias beta, y péptidos que los contienen, se describen en la patente de Estados Unidos N.º 5.440.013, expedida el 8 de agosto de 1995 a Kahn.

Es conocido por los expertos en la materia que pueden realizarse modificaciones a cualquier péptido sustituyendo uno o más aminoácidos con uno o más aminoácidos funcionalmente equivalentes que no alteran la función biológica del péptido. En un aspecto, el aminoácido que es sustituido por un aminoácido que posee propiedades intrínsecas similares incluyendo, aunque sin limitación, hidrofobicidad, tamaño o carga. Procedimientos usados para determinar el aminoácido apropiado a sustituir y por qué aminoácido, son conocidos para un experto en la materia. Los ejemplos no limitantes incluyen modelos de sustitución empíricos tal como se describe por Dahoff y col., (1978) en Atlas of Protein Sequence and Structure Vol. 5 supl. 2 (ed. M.O. Dayhoff), págs. 345-352. National Biomedical Research Foundation, Washington DC; Matrices PAM incluyendo matrices de Dayhoff (Dahoff y col., (1978), *supra*, o matrices JTT tal como se describe por Jones y col., (1992) Comput. Appl. Biosci. 8: 275-282 y Gonnet y col., (1992) Science 256: 1443-1145; el modelo empírico descrito por Adach y Hasegawa (1996) J. Mol. Evol. 42: 459-468; las matrices de sustitución de bloques (BLOSUM) según lo descrito por Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89:10915-10919; modelos de Poisson según lo descrito por Nei (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.; y el procedimiento de la Máxima Probabilidad (ML) según lo descrito por Müller y col., (2002) Mol. Biol. Evol. 19: 8-13.

### Conjugados polipeptídicos

Los polipéptidos y complejos polipeptídicos pueden usarse en diversas formulaciones, que pueden variar dependiendo del uso pretendido. Por ejemplo, uno o más pueden estar enlazados (complejados) de forma covalente o no covalente a diversas otras moléculas, cuya naturaleza puede variar dependiendo del fin particular. Por ejemplo, un péptido de la invención puede complejarse de forma covalente o no covalente con un transportador macromolecular, incluyendo, aunque sin limitación, polímeros, proteínas, polisacáridos, polipéptidos (aminoácidos), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, y lípidos naturales y sintéticos. Un péptido puede estar conjugado a un ácido graso, para introducción en un liposoma, véase la patente de Estados Unidos N.º 5.837.249. Un péptido de la invención puede complejarse de forma covalente o no covalente con un soporte sólido, de los cuales se conoce una variedad en la técnica y se describen en el presente documento. Un epítipo de péptido antigénico de la invención puede estar asociado con una matriz de presentación de antígenos tal como un complejo MHC con o sin moléculas coestimuladoras.

Los ejemplos de transportadores de proteína incluyen, aunque sin limitarse a, superantígenos, albúmina de suero, toxoide tetánico, ovoalbúmina, tiroglobulina, mioglobulina e inmunoglobulina.

Polímeros transportadores de péptido-proteína pueden formarse usando agentes de reticulación convencionales tales como carbodiimidias. Son ejemplos de carbodiimidias 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil) carbodiimida (CMC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y 1-etil-3-(4-azonia-44-dimetilpentil) carbodiimida.

Son ejemplos de otros agentes de reticulación adecuados bromuro de cianógeno, glutaraldehído y anhídrido succínico. En general, cualquiera de una serie de agentes homobifuncionales incluyendo un aldehído homobifuncional, un epóxido homobifuncional, un imido-éster homobifuncional, un éster de N-hidroxisuccinimida homobifuncional, una maleimida homobifuncional, un haluro de alquilo homobifuncional, un disulfuro de piridilo homobifuncional, un haluro de arilo homobifuncional, una hidrazida homobifuncional, un derivado de diazonio homobifuncional y un compuesto fotorreactivo homobifuncional pueden utilizarse. También se incluyen compuestos heterobifuncionales, por ejemplo, compuestos que tienen un amina-reactivo y un grupo sulfhidrilo-reactivo, compuestos con un amina-reactivo y un grupo fotorreactivo y compuestos con un carbonilo-reactivo y un grupo sulfhidrilo-reactivo.

Ejemplos específicos de dichos agentes de reticulación homobifuncionales incluyen los ditiobis N-hidroxisuccinimida ésteres (succinimidilpropionato) bifuncionales, suberato de disuccinimidilo, y tartrato de disuccinimidilo; los imido-ésteres de adipimidato de dimetilo bifuncionales, pimelimidato de dimetilo, y suberimidato de dimetilo; los agentes de reticulación sulfhidrilo-reactivo bifuncionales 1,4-di-[3'-(2'-piridilditio)propionamido]butano, bismaleimidohexano, y bis-N-maleimido-1,8-octano; los haluros de arilo bifuncionales 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno y 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenulsulfona; agentes fotorreactivos bifuncionales tales como bis-[b-(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro; los aldehídos bifuncionales formaldehído, malondialdehído, succinaldehído, glutaraldehído y adipaldehído; un epóxido bifuncional tal como 1,4-butanodiol diglicidil éter; la hidrazidas bifuncionales dihidrazida de ácido adipico, carbohidrazida y dihidrazida de ácido succínico; los diazonios bifuncionales o-tolidina, diazotan y bencidina bis-diazotan; los haluros de alquilo bifuncionales N1N'-etilen-bis(yodoacetamida), N1N'-hexameten-bis (yodoacetamida), N1N'-undecameten-bis(yodoacetamida), así como haluros de bencilo y halomostazas, como ácido ala'-diyodo-p-

xileno sulfónico y tri(2-cloroetil)amina, respectivamente.

Los ejemplos de agentes de reticulación heterobifuncionales comunes que pueden usarse para efectuar la conjugación de proteínas a péptidos incluyen, aunque sin limitarse a, SMCC (succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato), MBS (m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster), SIAB (N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato), SMPB (succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato), GMBS (N-( $\gamma$ -maleimidobutiriloxi)succinimida éster), MPBH hidrazida de ácido (4-(4-N-maleimidofenil) butírico), M2C2H (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilo-hidrazida), SMPT (succinimidiloxicarbonil- $\alpha$ -metil- $\alpha$ -(2-piridilditio)tolueno), y SPDP (3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo).

10

La reticulación puede conseguirse acoplado un grupo carbonilo a un grupo amino o un grupo hidrazida mediante aminación reductora.

Los péptidos de la invención también se pueden formular como unión no covalente de monómeros a través de interacciones iónicas, de adsorción o bioespecíficas. Los complejos de péptidos con moléculas altamente cargadas positiva o negativamente se pueden realizar a través de la formación de puentes de sal en ambientes de fuerza iónica baja, tales como en agua desionizada. Pueden crearse complejos grandes usando polímeros cargados tales como ácido poli-(L-glutámico) o poli-(L-lisina) que contienen numerosas cargas negativas y positivas, respectivamente. La adsorción de péptidos se puede realizar a superficies tales como perlas de látex de micropartículas o a otros polímeros hidrófobos, formando complejos de péptido-superantígeno asociados no covalentemente que imitan de manera efectiva la proteína reticulada o polimerizada químicamente. Finalmente, los péptidos pueden estar enlazados no covalentemente a través del uso de interacciones bioespecíficas entre otras moléculas. Por ejemplo, la utilización de la fuerte afinidad de la biotina por proteínas tales como avidina o estreptavidina o sus derivados se podría utilizar para formar complejos peptídicos. Estas proteínas de unión a biotina contienen cuatro sitios de unión que pueden interactuar con biotina en solución o unirse covalentemente a otra molécula. (Véase Wilchek (1988) Anal Biochem 171: 1-32). Los péptidos pueden ser modificados para poseer grupos biotina usando reactivos de biotilación comunes tales como el éster de N-hidroxisuccinimidilo de D-biotina (NHS-biotina) que reacciona con los grupos amino disponibles de la proteína. Péptidos biotilados pueden ser incubados a continuación con avidina o estreptavidina para crear complejos grandes. La masa molecular de dichos polímeros puede ser regulada a través de un control cuidadoso de la relación molar del péptido biotilado con respecto a la avidina o estreptavidina.

También se proporcionan mediante esta solicitud los péptidos y polipéptidos descritos en el presente documento conjugados a una etiqueta, por ejemplo, una etiqueta fluorescente o bioluminiscente, para uso en los procedimientos de diagnóstico. Por ejemplo, péptidos y polipéptidos etiquetados de forma detectable pueden estar unidos a una columna y usarse para la detección y purificación de anticuerpos. Las etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde Malaquita, estilbena, Lucifer Yellow, Cascade Blue™, y Rojo Texas. Otros colorantes ópticos adecuados se describen en Haugland, Richard P. (1996) Molecular Probes Handbook.

Los polipéptidos de esta invención también pueden combinarse con diversos transportadores en fase líquida, tales como soluciones estériles o acuosas, transportadores farmacéuticamente aceptables, suspensiones y emulsiones. Los ejemplos de disolventes no acuosos incluyen propilenglicol, polietilenglicol y aceites vegetales. Cuando se usan para preparar anticuerpos, los transportadores también pueden incluir un adyuvante que es útil para aumentar inespecíficamente una respuesta inmunitaria específica. Un experto en la materia puede determinar fácilmente si se requiere un adyuvante y seleccionar uno. Sin embargo, para fin de ilustración solamente, los adyuvantes adecuados incluyen, aunque sin limitarse a, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund y sales minerales.

### Células huésped

También son proporcionadas por la divulgación células huésped que comprenden uno o más de los polipéptidos de esta invención. En un aspecto, los polipéptidos se expresan y presentan en la superficie celular (de forma extracelular). Células adecuadas que contienen los polipéptidos de la invención incluyen células procariotas y eucariotas, que incluyen, aunque sin limitarse a, células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células animales, células de mamífero, células murinas, células de rata, células de oveja, células de simio y células humanas. Los ejemplos de células bacterianas incluyen *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Streptococcus gordonii*. Las células pueden adquirirse de un proveedor comercial tales como la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville Maryland, EE. UU.) o cultivarse a partir de un aislado usando procedimientos conocidos en la técnica. Los ejemplos de células eucariotas adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a, células 293T HEK, así como la línea celular de hámster CHO, BHK-21; las líneas celulares murinas designadas NIH3T3, NS0, C127, las líneas celulares de simio COS, Vero; y las

líneas celulares humanas HeLa, PER.C6 (disponible en el mercado de Crucell) U-937 y Hep G2. Un ejemplo no limitante de células de insecto incluyen *Spodoptera frugiperda*. Los ejemplos de levaduras útiles para la expresión incluyen, aunque sin limitarse a *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*, *Yarrowia* o *Pichia*. Véase por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 4.812.405; 4.818.700; 4.929.555; 5.736.383; 5.955.349; 5 5.888.768 y 6.258.559.

Además de especificidad de especie, las células pueden ser de cualquier tipo de tejido particular tal como neuronal o como alternativa una célula madre somática o embrionaria tal como una célula madre que puede o no puede diferenciarse en una célula neuronal, por ejemplo, célula madre embrionaria, célula madre adiposa, célula madre neuronal y célula madre hematopoyética. La célula madre puede ser de origen humano o animal, tal como de mamífero.

### Polinucleótidos aislados y composiciones

15 Esta divulgación también proporciona los polinucleótidos complementarios a las secuencias identificadas anteriormente o sus complementos. La complementariedad puede determinarse usando hibridación tradicional en condiciones de astringencia moderada o alta. Tal como se usa en el presente documento, el término polinucleótido pretende ADN y ARN así como nucleótidos modificados. Por ejemplo, esta invención también proporciona la cadena de polinucleótido antisentido, por ejemplo ARN antisentido a estas secuencias o sus complementos.

20 También son proporcionados por la invención polinucleótidos que codifican polipéptidos sustancialmente homólogos y biológicamente equivalentes a los polipéptidos y complejos polipeptídicos de la invención. Sustancialmente homólogos y biológicamente equivalentes pretende incluir aquellos que tienen grados de homología variables, tales como al menos el 65%, o como alternativa, al menos el 70%, o como alternativa, al menos el 75%, o como alternativa al menos el 80%, o como alternativa, al menos el 85%, o como alternativa al menos el 90%, o como alternativa, al menos el 95%, o como alternativa al menos el 97% homólogos, tal como se ha definido anteriormente, y que codifican polipéptidos que tienen la actividad biológica para unirse a inhibidores del factor Xa y no se ensamblan en el complejo de protrombina, tal como se describe en el presente documento. Debe entenderse, aunque no siempre se afirme explícitamente, que realizaciones para polipéptidos y polinucleótidos sustancialmente homólogos están destinadas para cada aspecto de esta invención, por ejemplo, polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos.

Los polinucleótidos de esta invención pueden replicarse usando técnicas recombinantes convencionales. Como alternativa, los polinucleótidos pueden replicarse usando tecnología de PCR. La PCR es el asunto de las patentes de Estados Unidos N.º 4.683.195; 4.800.159; 4.754.065; y 4.683.202 y se describe en PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis y col., eds, Birkhauser Press, Boston (1994)) y referencias citadas en ese documento. Es más, un experto en la materia puede usar las secuencias proporcionadas en el presente documento y un sintetizador de ADN comercial para replicar el ADN. Por consiguiente, esta divulgación también proporciona un proceso para obtener los polinucleótidos de esta invención proporcionando la secuencia lineal del polinucleótido, moléculas de cebador apropiadas, productos químicos tales como enzimas e instrucciones para su replicación y replicar o enlazar químicamente los nucleótidos en la orientación apropiada para obtener los polinucleótidos. En una realización diferente de la divulgación, estos polinucleótidos se aíslan adicionalmente. Es más, un experto en la materia puede enlazar de forma operativa los polinucleótidos a secuencias reguladoras para su expresión en una célula huésped. Los polinucleótidos y las secuencias reguladoras se insertan en la célula huésped (procariota o eucariota) para replicación y amplificación. El ADN amplificado de este modo puede aislarse de la célula mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Un proceso para obtener polinucleótidos mediante este procedimiento se proporciona adicionalmente en el presente documento así como los polinucleótidos obtenidos de este modo.

Puede obtenerse ARN insertando en primer lugar un polinucleótido de ADN en una célula huésped procariota o eucariota adecuada. El ADN puede insertarse mediante cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, mediante el uso de un vehículo de suministro de genes apropiado (*por ejemplo*, liposoma, plásmido o vector) o mediante electroporación. Cuando la célula se replica y el ADN es transcrito a ARN; el ARN puede aislarse a continuación usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, tal como se describe en Sambrook y Russell (2001) *in vitro*. Por ejemplo, puede aislarse mARN usando diversas enzimas líticas o soluciones químicas de acuerdo con los procedimientos descritos en Sambrook y Russell (2001) *supra* o extraerse mediante resinas de unión a ácido nucleico siguiendo las instrucciones adjuntas proporcionadas por los fabricantes.

En un aspecto de la divulgación, el ARN es ARN interferente pequeño, también conocido como siARN. Los procedimientos para preparar y cribar ARN interferente y seleccionarlo por la capacidad de bloquear la expresión de polinucleótidos se conocen en la técnica y ejemplos no limitantes de los mismos se muestran a continuación Estos

ARN interferentes son proporcionados por esta divulgación.

Las secuencias de siARN pueden diseñarse obteniendo la secuencia de mRNA diana y determinando una secuencia complementaria de siARN apropiada. Los siARN de la divulgación están diseñados para interactuar con una secuencia diana, lo que significa que complementan una secuencia diana suficientemente para hibridar con esa secuencia. Un siARN puede ser el 100% idéntico a la secuencia diana. Sin embargo, la homología de la secuencia de siARN con la secuencia diana puede ser menor del 100% siempre que el siARN pueda hibridar con la secuencia diana. Por lo tanto, por ejemplo, la molécula de siARN puede ser al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia diana o el complemento de la secuencia diana. Por lo tanto, también pueden usarse moléculas de siARN con inserciones, deleciones o mutaciones puntuales individuales con respecto a una diana. La generación de varias secuencias de siARN diferentes por mRNA diana se recomienda para permitir el cribado para la secuencia diana óptima. Una búsqueda de homología, tal como una búsqueda BLAST, debe realizarse para garantizar que la secuencia de siARN no contiene homología a ningún gen de mamífero conocido.

15 En general, es preferible que la secuencia diana esté ubicada a al menos 100-200 nucleótidos del codón de inicio AUG y al menos a 50-100 nucleótidos del codón de terminación del mRNA diana (Duxbury (2004) J. Surgical Res. 117: 339-344).

20 Los investigadores han determinado que ciertas características son comunes en moléculas de siARN que silencian eficazmente su gen diana (Duxbury (2004) J. Surgical Res. 117: 339-344; Ui-Tei y col., (2004) Nucl. Acids Res. 32: 936-48). Como guía general, siARN que incluyen una o más de las siguientes condiciones son particularmente útiles en silenciación de genes en células de mamífero: proporción GC de entre 45-55%, sin series de más de 9 residuos G/C, G/C en el extremo 5' de la cadena sentido; A/U en el extremo 5' de la cadena antisentido; y al menos 5 residuos A/U en las primeras 7 bases del extremo 5' de la cadena antisentido.

25 Los siARN son, en general, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, el siARN puede ser de 10-30 nucleótidos de largo, 12-28 nucleótidos de largo, 15-25 nucleótidos de largo, 19-23 nucleótidos de largo o 21-23 nucleótidos de largo. Cuando un siARN contiene dos cadenas de diferentes longitudes, la más larga de las cadenas designa la longitud del siARN. En esta situación, los nucleótidos no emparejados de la cadena más larga formarían un saliente.

35 El término siARN incluye ARN de horquilla corto (shARN). Los shARN comprenden una única cadena de ARN que forma una estructura tallo-bucle, donde el tallo consiste en las cadenas sentido y antisentido complementarias que comprenden un siARN bicatenario, y el bucle es un enlazador de tamaño variable. La estructura del tallo de los shARN generalmente es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de largo. Por ejemplo, el tallo puede ser de 10-30 nucleótidos de largo, 12-28 nucleótidos de largo, 15-25 nucleótidos de largo, 19-23 nucleótidos de largo o 21-23 nucleótidos de largo.

40 Herramientas para ayudar al diseño de siARN están fácilmente disponibles para el público. Por ejemplo, una herramienta de diseño de siARN basado en ordenador está disponible en internet en [www.dharmacon.com](http://www.dharmacon.com), último acceso el 26 de noviembre de 2007.

### Síntesis de dsARN y siARN

45 dsARN y siARN pueden sintetizarse química o enzimáticamente *in vitro* tal como se describe en Micura (2002) Agnes Chem. Int. Ed. Emgl. 41: 2265-2269; Betz (2003) Promega Notes 85: 15-18; y Paddison y Hannon (2002) Cancer Cell. 2: 17-23. La síntesis química puede realizarse mediante procedimientos manuales o automatizados, ambos de los cuales se conocen bien en la técnica, tal como se describe en Micura (2002), *supra*. El siARN también puede expresarse de forma endógena dentro de las células en forma de shARN tal como se describe en Yu y col., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 99: 6047-6052; y McManus y col., (2002) RNA 8: 842-850. La expresión endógena se ha conseguido usando sistemas de expresión basados en plásmido usando pequeños promotores de ARN nuclear, tales como ARN polimerasa III U6 o H1, o ARN polimerasa II U1 tal como se describe en Brummelkamp y col., (2002) Science 296: 550-553 (2002); y Novarino y col., (2004) J. Neurosci. 24: 5322-5330.

55 La síntesis enzimática *in vitro* de dsARN y siARN puede realizarse usando un proceso mediado por ARN polimerasa para producir cadenas sentido y antisentido individuales que se hibridan *in vitro* antes del suministro al interior de las células elegidas, tal como se describe en Fire y col., (1998) Nature 391: 806-811; Donze y Picard (2002) Nucl. Acids Res. 30(10): e46; Yu y col., (2002); y Shim y col., (2002) J. Biol. Chem. 277: 30413-30416. Varios fabricantes (Promega, Ambion, New England Biolabs, y Stragene) producen kits de transcripción útiles para realizar la síntesis *in*

*vitro*.

La síntesis *in vitro* de siARN puede conseguirse, por ejemplo, usando un par de oligonucleótidos dobles cortos que contienen promotores de T7 ARN polimerasa cadena arriba de las secuencias de ARN sentido y antisentido como plantilla de ADN. Cada oligonucleótido del dúplex es una plantilla diferente para la síntesis de una cadena del siARN. Las cadenas de ARN cortas diferentes que se sintetizan se hibridan a continuación para formar siARN tal como se describe en Protocols and Applications, Chapter 2: RNA interference, Promega Corporation, (2005).

La síntesis *in vitro* de dsARN puede conseguirse, por ejemplo, usando un promotor de T7 ARN polimerasa en los extremos 5' de ambas cadenas de la secuencia diana de ADN. Esto se consigue usando plantillas de ADN diferentes, que contienen, cada una, la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor T7, transcritas en dos reacciones diferentes. Los transcritos resultantes se mezclan e hibridan de forma posttranscripcional. Plantillas de ADN usadas en esta reacción pueden crearse mediante PCR o usando dos plantillas de plásmido linealizadas, que contienen, cada una, el promotor de T7 polimerasa en un extremo diferente de la secuencia diana. Protocols and Applications, Chapter 2: RNA interference, Promega Corporation, (2005).

Para expresar las proteínas descritas en el presente documento, el suministro de secuencias de ácido nucleico que codifican el gen de interés pueden suministrarse mediante varias técnicas. Ejemplos de los cuales incluyen tecnologías virales (por ejemplo vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de alfavirus y similares) y tecnologías no virales (por ejemplo complejos ADN/liposoma, micelas y complejos de proteína-ADN viral dirigidos) tal como se describe en el presente documento. Una vez dentro de la célula de interés, la expresión del transgén puede estar bajo el control de promotores ubicuos (por ejemplo EF-1 $\alpha$ ) o promotores específicos de tejido (por ejemplo el promotor de calcio calmodulina quinasa 2 (CaMKI), promotor NSE y promotor Thy-1 humano). Como alternativa, los niveles de expresión pueden controlarse mediante el uso de un sistema promotor inducible (por ejemplo promotor Tet on/off) tal como se describe en Wiznerowicz y col., (2005) Stem Cells 77: 8957-8961.

Los ejemplos no limitantes de promotores incluyen, aunque sin limitarse a, el promotor de citomegalovirus (CMV) (Kaplitt y col., (1994) Nat. Genet. 8: 148-154), promotor CMV/humano  $\beta$ 3-globina (Mandel y col., (1998) J. Neurosci. 18: 4271-4284), promotor NCX1, promotor  $\alpha$ MHC, promotor MLC2v, promotor GFAP (Xu y col., (2001) Gene Ther., 8: 1323-1332), el promotor de enolasa específica de neuronas de 1,8-kb (NSE) (Klein y col., (1998) Exp. Neurol. 150: 183-194), el promotor de beta actina de pollo (CBA) (Miyazaki (1989) Gene 79: 269-277) y el promotor de  $\beta$ -glucuronidasa (GUSB) (Shiple y col., (1991) Genetics 10: 1009-1018), el promotor de albúmina de suero humano, el promotor de alfa-1-antitripsina. Para mejorar la expresión, otros elementos reguladores pueden unirse adicionalmente de forma operativa al transgén, tales como, por ejemplo, el elemento post-regulador del virus de la Hepatitis de marmota (WPRE) (Donello y col., (1998) J. Virol. 72: 5085-5092) o el sitio de poliadenilación de hormona del crecimiento bovina (BGH).

También se proporciona por la divulgación una sonda o cebador de polinucleótidos que comprende al menos 10, o como alternativa, al menos 17 o como alternativa al menos 20, o como alternativa, al menos 50, o como alternativa, al menos 75 polinucleótidos, o como alternativa al menos 100 polinucleótidos que codifican las SEQ ID NO: 12 a 15 o sus complementos. Sondas y cebadores adecuados se han descrito *supra*. En la técnica se conoce que una sonda "perfectamente emparejada" no es necesaria para una hibridación específica. Cambios secundarios en la secuencia de la sonda conseguidos mediante sustitución, delección o inserción de un pequeño número de bases no afectan a la especificidad de hibridación. En general, puede tolerarse hasta el 20% de emparejamiento erróneo de pares de bases (cuando están alineadas de forma óptima). Una sonda útil para detectar el mARN mencionado anteriormente es al menos aproximadamente el 80% idéntica a la región homóloga de tamaño comparable contenida en las secuencias identificadas previamente (identificadas anteriormente) que corresponden a polinucleótidos caracterizados previamente de esta invención. Como alternativa, la sonda es el 85% idéntica a la secuencia génica correspondiente después del alineamiento de la segundo homóloga; y es más, muestra un 90% de identidad, o aún más, al menos el 95% idéntica.

Estas sondas pueden usarse en radioensayos (por ejemplo análisis por transferencia de Southern y Northern) para detectar o monitorizar la expresión de los polinucleótidos o polipéptidos de esta invención. Las sondas también pueden unirse a un soporte sólido o una matriz tal como un chip para uso en ensayos de cribado de alto rendimiento para la detección de la expresión del gen correspondiente a uno o más polinucleótidos de esta invención.

Los polinucleótidos y fragmentos de los polinucleótidos de la presente invención también pueden servir como cebadores para la detección de genes o transcritos de genes que se expresan en células neuronales, por ejemplo, para confirmar la transducción de los polinucleótidos en células huésped. En este contexto, amplificación significa

cualquier procedimiento que emplea una polimerasa dependiente de cebador capaz de replicar una secuencia diana con fidelidad razonable. La amplificación puede llevarse a cabo mediante ADN polimerasas naturales o recombinantes tales como T7 ADN polimerasa, fragmento de Klenow de ADN polimerasa de *E. coli*, y transcriptasa inversa. La longitud del cebador es la misma que la identificada para sondas, anteriormente.

5

Los polinucleótidos aislados de esta invención pueden estar enlazados de forma operativa a un promotor de la transcripción de ARN, así como otras secuencias reguladoras para replicación y/o expresión transitoria o estable del ADN o ARN. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "enlazado de forma operativa" significa posicionado de tal manera que el promotor dirigirá la transcripción de ARN de la molécula de ADN. Los ejemplos de dichos promotores son SP6, T4 y T7. En ciertas realizaciones, se usan promotores específicos de células para expresión específica de células del polinucleótido insertado. Vectores que contienen un promotor o un promotor/potenciador, con codones de terminación y secuencias marcadoras seleccionables, así como un sitio de clonación en el que un trozo insertado de ADN puede estar enlazado de forma operativa a ese promotor, se conocen bien en la técnica y están disponibles en el mercado. Para estrategias de metodología y clonación generales, véase Gene Expression Technology (Goeddel ed., Academic Press, Inc. (1991)) y referencias citadas en ese documento y Vectors: Essential Data Series (Gacesa and Ramji, eds., John Wiley & Sons, N.Y. (1994)), que contiene mapas, propiedades funcionales, proveedores comerciales y una referencia a los números de entrada de GenEMBL para diversos vectores adecuados. Preferentemente, estos vectores son capaces de transcribir ARN *in vitro* o *in vivo*.

10

15

20

25

30

35

40

Los vectores de expresión que contienen estos ácidos nucleicos son útiles para obtener sistemas de vectores huésped para producir proteínas y polipéptidos. Se da a entender que estos vectores de expresión deben ser replicables en los organismos huésped ya sea como episomas o como una parte integrante del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen plásmidos, vectores virales, incluyendo adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos, etc. Los vectores adenovirales son particularmente útiles para introducir genes en los tejidos *in vivo* debido a sus altos niveles de expresión y la transformación eficiente de células tanto *in vitro* como *in vivo*. Cuando se inserta un ácido nucleico en una célula huésped adecuada, por ejemplo, una célula procariota o una eucariota y la célula huésped se replica, la proteína puede producirse de forma recombinante. Las células huésped adecuadas dependerán del vector y pueden incluir células de mamífero, células animales, células humanas, células de simio, células de insecto, células de levadura y células bacterianas, tal como se ha descrito anteriormente y construirse usando procedimientos bien conocidos. Véase Sambrook y Russell (2001), *supra*. Además del uso de un vector viral para la inserción de un ácido nucleico exógeno en las células, el ácido nucleico se puede insertar en la célula huésped mediante procedimientos bien conocidos en la técnica tales como la transformación de células bacterianas; transfección usando precipitación con fosfato cálcico para células de mamífero; DEAE-dextrano; electroporación; o microinyección. Véase Sambrook y Russell (2001), *supra* para esta metodología.

La presente divulgación también proporciona vehículos de suministro adecuados para el suministro de un polinucleótido de la invención al interior de células (ya sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*). Un polinucleótido de la invención puede estar contenido dentro de un vehículo de suministro de genes, un vector de clonación o un vector de expresión. Estos vectores (especialmente vectores de expresión) pueden ser manipulados, a su vez, para asumir cualquiera de una serie de formas que pueden, por ejemplo, facilitar el suministro a y/o la entrada en una célula.

Estas células huésped aisladas que contienen los polinucleótidos son útiles para la replicación recombinante de los polinucleótidos y para la producción recombinante de péptidos y para cribado de alto rendimiento.

45

Los polinucleótidos pueden conjugarse a una etiqueta detectable o combinarse con un transportador tal como un soporte sólido o transportador farmacéuticamente aceptable. Los soportes sólidos adecuados se han descrito anteriormente al igual que las etiquetas adecuadas. Procedimientos para unir una etiqueta a un polinucleótido son conocidos por los expertos en la materia. Véase Sambrook y Russell (2001), *supra*.

## 50 Composiciones de anticuerpos terapéuticas

Esta divulgación también proporciona un anticuerpo capaz de formar específicamente un complejo con una proteína o polipéptido de esta invención, que son útiles en los procedimientos terapéuticos. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, así como derivados de los mismos (descritos anteriormente). Los anticuerpos incluyen, aunque no se limitan a, anticuerpos de ratón, rata, y conejo o humanos. Los anticuerpos pueden ser producidos en cultivo celular, en un fago, o en diversos animales, incluyendo aunque sin limitarse a, vacas, conejos, cabras, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, ovejas, perros, gatos, monos, chimpancés, simios, etc. los anticuerpos también son útiles para identificar y purificar polipéptidos terapéuticos.

55

- Esta divulgación también proporciona un complejo anticuerpo-péptido que comprende los anticuerpos descritos anteriormente y un polipéptido que se une específicamente al anticuerpo. En un aspecto de la divulgación, el polipéptido es el polipéptido contra el cual se generó el anticuerpo. En un aspecto de la divulgación, el complejo anticuerpo-péptido es un complejo aislado. En un aspecto adicional de la divulgación, el anticuerpo del complejo es, aunque sin limitarse a, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o un derivado de anticuerpo descritos en el presente documento. Cualquiera o ambos del anticuerpo o el péptido del complejo anticuerpo-péptido puede ser etiquetado de forma detectable. En un aspecto, el complejo anticuerpo-péptido de la divulgación se puede usar como una muestra de control o de referencia en los ensayos de diagnóstico o cribado.
- 10 Los anticuerpos policlonales de la divulgación se pueden generar usando técnicas convencionales conocidas en la técnica y que están bien descritas en la literatura. Existen varias metodologías para la producción de anticuerpos policlonales. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales se producen normalmente mediante inmunización de un mamífero adecuado, tal como, aunque sin limitarse a, pollos, cabras, cobayas, hámsteres, caballos, ratones, ratas y conejos. Un antígeno se inyecta en el mamífero, que induce a los linfocitos B a producir inmunoglobulinas IgG
- 15 específicas para el antígeno. Esta IgG se purifica a partir del suero de mamíferos. Las variaciones de esta metodología incluyen la modificación de adyuvantes, vías y punto de administración, los volúmenes de inyección por sitio y el número de sitios por animal para la producción óptima y el trato humano de los animales. Por ejemplo, los adyuvantes normalmente se usan para mejorar o potenciar una respuesta inmunitaria a los antígenos. La mayoría de los adyuvantes posibilitan un depósito de antígeno en el sitio de inyección, lo que permite una liberación lenta del antígeno
- 20 en ganglios linfáticos de drenaje. Otros adyuvantes incluyen tensioactivos que promueven la concentración de moléculas de antígeno de proteína sobre una gran área superficial y moléculas inmunoestimulantes. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes para la generación de anticuerpos policlonales incluyen adyuvantes de Freund, sistema adyuvante de Ribi, y Titermax. Los anticuerpos policlonales se pueden generar utilizando procedimientos descritos en las patentes de Estados Unidos N.º 7.279.559; 7.119.179; 7.060.800; 6.709.659; 6.656.746; 6.322.788; 5.686.073; y
- 25 5.670.153.

Los anticuerpos monoclonales de la divulgación pueden generarse usando técnicas de hibridoma convencionales conocidas en la técnica y bien descritas en la literatura. Por ejemplo, un hibridoma se produce fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, aunque sin limitación, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U397, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, CHO, PerC.6, YB2/O) o similar, o heteromielomas, productos de fusión de los mismos, o cualquier célula o célula de fusión derivada de ellos, o cualquier otra línea celular adecuada tal como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, [www.atcc.org](http://www.atcc.org), [www.lifetech.com](http://www.lifetech.com)., último acceso el 26 de noviembre de 2007, y similares), con células productoras de anticuerpos, tales como, aunque sin limitarse a, células de bazo aisladas o clonadas, sangre periférica, linfa, amígdala, u otras células inmunitarias o que contienen células B, o cualquier otro tipo de células que expresan secuencias constante o variable o marco o CDR de cadena pesada o ligera, ya sea como ácido nucleico endógeno o heterólogo, como recombinante o endógeno, viral, bacteriano, de algas, procarionta, anfibio, insecto, reptil, pez, de mamífero, roedor, equina, ovina, cabra, oveja, ADN de primate, eucariota, genómico, cADN, rADN, ADN o ARN mitocondrial, ADN o ARN de cloroplasto, hnARN, mARN, tARN, de cadena sencilla, doble o triple, hibridada, y similares, o cualquier combinación de los mismos. Células productoras de anticuerpos también pueden obtenerse a partir de sangre periférica o, preferentemente del bazo o los ganglios linfáticos, de seres humanos u otros animales adecuados que han sido inmunizados con el antígeno de interés. Cualquier otra célula huésped adecuada también puede usarse para expresar el ácido nucleico heterólogo o endógeno que codifica un anticuerpo, fragmento especificado o variante del mismo, de la presente divulgación. Las células fusionadas (hibridomas) o células recombinantes se pueden aislar usando condiciones de cultivo selectivas u otros procedimientos conocidos adecuados, y se clonaron por dilución limitante o la clasificación de células, u otros procedimientos conocidos.

En una realización de la divulgación, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser generados utilizando un sistema de péptido antigénico múltiple (MAP). El sistema de MAP utiliza un núcleo de peptidilo de tres o siete residuos de lisina ramificados radialmente, sobre el que los péptidos antigénicos de interés pueden construirse usando química en fase sólida estándar. El núcleo de lisina produce el MAP que porta alrededor de 4 a 8 copias del epítipo peptídico dependiendo del núcleo interno que generalmente representa menos de 10% del peso molecular total. El sistema MAP no requiere una proteína portadora para conjugación. Se ha demostrado que la alta relación molar y denso empaquetamiento de múltiples copias del epítipo antigénico en un MAP producen una fuerte respuesta inmunógena. Este procedimiento se describe en la patente de Estados Unidos N.º 5.229.490.

Pueden usarse otros procedimientos adecuados de producción o aislamiento de anticuerpos de la especificidad requerida, incluyendo, aunque sin limitación, procedimientos que seleccionan un anticuerpo recombinante a partir de

una biblioteca de péptidos o proteínas (por ejemplo, aunque sin limitación, un bacteriófago, ribosoma, oligonucleótido, ARN, cADN, so similares, biblioteca de presentación; por ejemplo, como están disponibles de diversos proveedores comerciales tales como Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, RU), MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), Biovation (Aberdeen, Scotland, RU) BioInvent (Lund, Suecia), usando procedimientos conocidos en la técnica.

- 5 Véase las patentes de Estados Unidos N.º 4.704.692; 5.723.323; 5.763.192; 5.814.476; 5.817.483; 5.824.514; 5.976.862. Procedimientos alternativos dependen de la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones SCID, Nguyen y col., (1977) *Microbiol. Immunol.* 41: 901-907 (1997); Sandhu y col., (1996) *Crit. Rev. Biotechnol.* 16: 95-118; Eren y col., (1998) *Immunol.* 93: 154-161 que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, tal como se conoce en la técnica y/o tal como se describe en el presente documento. Dichas técnicas, incluyen, aunque
- 10 sin limitarse a, presentación en ribosomas (Hanes y col., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 94: 4937-4942; Hanes y col., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 95: 14130-14135); tecnologías que producen anticuerpos de una sola célula (por ejemplo, el procedimiento de anticuerpo de linfocito seleccionado ("SLAM") (patente de Estados Unidos N.º 5.627.052, Wen y col., (1987) *J. Immunol.* 17: 887-892; Babcook y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* (1996) 93: 7843-7848); microgota de gel y citometría de flujo (Powell y col., (1990) *Biotechnol.* 8:333-337; One Cell Systems,
- 15 (Cambridge, Mass); Gray y col., (1995) *J. Imm. Meth.* 182: 155-163; y Kenny y col., (1995) *Bio. Technol.* 13: 787-790); selección de células B (Steenbakkers y col., (1994) *Molec. Biol. Reports* 19: 125-134.

- Derivados de anticuerpos de la presente divulgación también pueden prepararse suministrando un polinucleótido que codifica un anticuerpo de esta divulgación a un huésped adecuado para proporcionar animales transgénicos o
- 20 mamíferos, tales como cabras, vacas, caballos, ovejas, y similares, que producen dichos anticuerpos en su leche. Estos procedimientos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 5.827.690; 5.849.992; 4.873.316; 5.849.992; 5.994.616; 5.565.362; y 5.304.489.

- La expresión "derivado de anticuerpo" incluye modificación posttraduccional a la secuencia polipeptídica lineal del
- 25 anticuerpo o fragmento. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 6.602.684 B1 describe un procedimiento para la generación de formas modificadas con glicol de anticuerpos, incluyendo moléculas de anticuerpo completas, fragmentos de anticuerpo, o proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, que tiene toxicidad celular mediada por Fc mejorada, y glucoproteínas generadas de este modo.

- 30 También pueden prepararse derivados de anticuerpos mediante suministrando un polinucleótido de esta invención para proporcionar plantas transgénicas y células vegetales cultivadas (por ejemplo, aunque sin limitarse a tabaco, maíz, y lenteja de agua) que producen dichos anticuerpos, partes o variantes especificadas en las partes de la planta o en células cultivadas de las mismas. Por ejemplo, Cramer y col., (1999) *Curr. Top. Microbol. Immunol.* 240: 95-118 y las referencias citadas en ese documento, describen la producción de hojas de tabaco transgénico que expresan
- 35 grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, usando un promotor inducible. El maíz transgénico se han usado para expresar proteínas de mamífero a niveles de producción comercial, con actividades biológicas equivalentes a las producidas en otros sistemas recombinantes o purificadas de fuentes naturales. Véase, por ejemplo, Hood y col., (1999) *Adv. Exp. Med. Biol.* 464: 127-147 y las referencias citadas en ese documento. Derivados de anticuerpos también se han producido en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas, incluyendo
- 40 fragmentos de anticuerpos, tales como anticuerpos monocatenarios (scFv), incluyendo de semillas de tabaco y tubérculos de patata. Véase, por ejemplo, Conrad y col., (1998) *Plant Mol. Biol.* 38: 101-109 y referencia citadas en este documento. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden producir usando plantas transgénicas, de acuerdo con procedimientos conocidos.

- 45 Los derivados de anticuerpos también pueden producirse, por ejemplo, añadiendo secuencias exógenas para modificar la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, tasa de asociación, tasa de disociación, avidez, especificidad, semivida, o cualquier otra característica adecuada. Generalmente parte o la totalidad de las secuencias de CDR no humanas o humanas se mantienen, mientras que las secuencias no humanas de las regiones variables y constantes se sustituyen con aminoácidos humanos o de otro tipo.

- 50 En general, los residuos de CDR están directamente y de la manera sustancial implicados en influir en la unión al antígeno. La humanización o genomanipulación de anticuerpos de la presente invención puede realizarse usando cualquier procedimiento conocido tal como, aunque sin limitación, los descritos en las patentes de Estados Unidos N.º 5.723.323; 5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023;
- 55 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539; y 4.816.567.

Las técnicas para fabricar anticuerpos de parcial a completamente humanos son conocidas en la técnica y puede usarse cualquiera de dichas técnicas. De acuerdo con una realización de la divulgación, las secuencias de anticuerpos humanos completos se fabrican en un ratón transgénico que ha sido diseñado para expresar genes de anticuerpo de

cadena pesada y ligera humanos. Se han preparado múltiples estirpes de dichos ratones transgénicos que puede producir diferentes clases de anticuerpos. Células B de ratones transgénicos que producen un anticuerpo deseable se pueden fusionar para preparar líneas celulares de hibridoma para la producción continua del anticuerpo deseado. (Véase por ejemplo, Russel y col., (2000) *Infection and Immunity* abril de 2000: 1820-1826; Gallo y col., (2000) *European J. of Immun.* 30: 534-540; Green (1999) *J. of Immun. Methods* 231: 11-23; Yang y col., (1999A) *J. of Leukocyte Biology* 66: 401-410; Yang (1999B) *Cancer Research* 59(6): 1236-1243; Jakobovits. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 31: 33-42; Green y Jakobovits (1998) *J. Exp. Med.* 188(3): 483-495; Jakobovits (1998) *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7(4): 607-614; Tsuda y col., (1997) *Genomics* 42: 413-421; Sherman-Gold (1997) *Genetic Engineering News* 17(14); Mendez y col., (1997) *Nature Genetics* 15: 146-156; Jakobovits (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System Vol. IV*, 194. 1-194.7; Jakobovits (1995) *Current Opinion in Biotechnology* 6: 561-566; Mendez y col., (1995) *Genomics* 26: 294-307; Jakobovits (1994) *Current Biology* 4(8): 761-763; Arbones y col., (1994) *Immunity* 1(4): 247-260; Jakobovits (1993) *Nature* 362(6417): 255-258; Jakobovits y col. (1993); y la patente de Estados Unidos N.º 6.075.181.)

15 Los anticuerpos de esta divulgación también pueden modificarse para crear anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos quiméricos son aquellos en los que los diversos dominios de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos están codificados por el ADN de más de una especie. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 4.816.567.

Como alternativa, los anticuerpos de esta divulgación también se pueden modificar para crear anticuerpos remodelados en superficie. Los anticuerpos remodelados en superficie son aquellos en los que los residuos de aminoácidos exteriores del anticuerpo de una especie se sustituyen juiciosamente o "remodelan" con los de una segunda especie de manera que los anticuerpos de la primera especie no serán inmunógenos en la segunda especie reduciendo de ese modo la inmunogenicidad del anticuerpo. Dado que la antigenicidad de una proteína depende principalmente de la naturaleza de su superficie, la inmunogenicidad de un anticuerpo podría reducirse mediante la sustitución de los residuos expuestos que difieren de las que normalmente se encuentran en otros anticuerpos de especies de mamíferos. Esta sustitución juiciosa de residuos exteriores debe tener poco o ningún efecto sobre los dominios interiores, o sobre los contactos entre dominios. Por lo tanto, las propiedades de unión a ligando no deben modificarse como consecuencia de alteraciones que se limitan a los residuos marco de región variable. El proceso se conoce como "remodelación en superficie", ya que se altera sólo la superficie exterior o "piel" del anticuerpo, los residuos de soporte permanecen inalterados.

El procedimiento de "remodelación en superficie" hace uso de los datos de secuencia disponibles para dominios variables de anticuerpos humanos compilados por Kabat y col., (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4ª ed., Bethesda, Md., National Institutes of Health, actualizaciones de esta base de datos, y otras bases de datos accesibles estadounidenses y extranjeras (tanto de ácidos nucleicos y proteínas). Los ejemplos de los procedimientos utilizados para generar anticuerpos remodelados en superficie incluyen EP 519596; patente de Estados Unidos N.º 6.797.492; y se describen en Padlan y col., (1991) *Mol. Immunol.* 28(4-5): 489-498.

La expresión "derivado de anticuerpo" también incluye "diacuerpos", que son pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, donde los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica. (Véase por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y col., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 90: 6444-6448). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. (Véase también, la patente de Estados Unidos N.º 6.632.926 de Chen y col., que describe variantes de anticuerpo que tienen uno o más aminoácidos insertados en una región hipervariable del anticuerpo parental y una afinidad de unión para un antígeno diana que es al menos aproximadamente dos veces más potente que la afinidad de unión del anticuerpo parental por el antígeno).

50 La expresión "derivado de anticuerpo" incluye, además, "anticuerpos lineales". El procedimiento para la fabricación de anticuerpos lineales se conoce en la técnica y se describe en Zapata y col., (1995) *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062. En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

55 Los anticuerpos de esta divulgación se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos conocidos que incluyen, aunque sin limitarse a, purificación de la proteína A, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxapatita y cromatografía de lectina. También puede usarse cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación.

Los anticuerpos de la presente divulgación productos purificados, productos de procedimientos sintéticos químicos, y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped eucariota, incluyendo, por ejemplo, levaduras, plantas superiores, células de insecto y de mamífero, o como alternativa a partir de una célula procariota tal como se ha descrito anteriormente.

Si un anticuerpo monoclonal que está siendo ensayado se une a una proteína o polipéptido, entonces el anticuerpo que está siendo ensayado y los anticuerpos proporcionados por los hibridomas de esta divulgación son equivalentes. También es posible determinar sin experimentación excesiva, si un anticuerpo tiene la misma especificidad que el anticuerpo monoclonal de esta divulgación determinando si el anticuerpo que está siendo ensayado impide que un anticuerpo monoclonal de esta divulgación se una a la proteína o polipéptido con el que el anticuerpo monoclonal es reactivo normalmente. Si el anticuerpo que está siendo ensayado compite con el anticuerpo monoclonal de la divulgación, tal como se muestra mediante una disminución de la unión por el anticuerpo monoclonal de esta divulgación, entonces es probable que los dos anticuerpos se unan al mismo epítipo o a uno estrechamente relacionado. Como alternativa, se puede preincubar el anticuerpo monoclonal de esta divulgación con una proteína con la que es reactivo normalmente, y determinar si el anticuerpo monoclonal que está siendo ensayado es inhibido en su capacidad de unirse al antígeno. Si el anticuerpo monoclonal que está siendo ensayado es inhibido entonces, con toda probabilidad, tiene la misma, o una relacionada estrechamente, especificidad epitópica que el anticuerpo monoclonal de esta divulgación.

El término "anticuerpo" también pretende incluir anticuerpos de todos los isotipos. Isotipos particulares de un anticuerpo monoclonal se pueden preparar ya sea directamente mediante la selección de la fusión inicial, o se pueden preparar de forma secundaria, a partir de un hibridoma parental que secreta un anticuerpo monoclonal de diferente isotipo utilizando la técnica de selección *sib* para aislar variantes de cambio de clase usando el procedimiento descrito en Steplewski, y col., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 82: 8653 o Spira, y col., (1984) J. Immunol. Methods 74: 307.

El aislamiento de otros hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales con la especificidad de los anticuerpos monoclonales de la divulgación también se puede conseguir por un experto en la materia mediante la producción de anticuerpos antiidiotípicos. Herlyn, y col., (1986) Science 232: 100. Un anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos presentes en el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma de interés.

La identidad idiotípica entre los anticuerpos monoclonales de dos hibridomas demuestra que los dos anticuerpos monoclonales son iguales con respecto a su reconocimiento del mismo determinante epitópico. Por lo tanto, usando anticuerpos para los determinantes epitópicos en un anticuerpo monoclonal, es posible identificar otros hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales de la misma especificidad epitópica.

También es posible usar tecnología de anti-idiotipo para producir anticuerpos monoclonales que imitan un epítipo. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal antiidiotípico preparado para un primer anticuerpo monoclonal tendrá un dominio de unión en la región hipervariable que es la imagen especular del epítipo al que se une el primer anticuerpo monoclonal. De este modo, en este ejemplo, el anticuerpo monoclonal antiidiotípico podría usarse para inmunización para la producción de estos anticuerpos.

En algunos aspectos de esta divulgación, será útil etiquetar de forma detectable o terapéutica el anticuerpo. Las etiquetas adecuadas se han descrito *supra*. Los procedimientos para conjugar anticuerpos a estos agentes son conocidos en la técnica. Para propósito de ilustración solamente, los anticuerpos se pueden etiquetar con un resto detectable tal como un átomo radioactivo, un cromóforo, un fluoróforo, o similares. Dichos anticuerpos etiquetados se pueden usar para técnicas de diagnóstico, ya sea *in vivo*, o en una muestra de ensayo aislada.

El acoplamiento de anticuerpos a haptenos de bajo peso molecular puede aumentar la sensibilidad del anticuerpo en un ensayo. Los haptenos pueden detectarse a continuación específicamente por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es habitual usar haptenos tales como biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenol, piridoxal y fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos antihapteno específicos. Véase, Harlow y Lane (1988) *supra*.

Los anticuerpos pueden etiquetarse con un resto detectable tal como un átomo radioactivo, un cromóforo, un fluoróforo, o similares. Dichos anticuerpos etiquetados pueden usarse para técnicas de diagnóstico, ya sea *in vivo*, o en una muestra de ensayo aislada. Los anticuerpos también pueden conjugarse, por ejemplo, a un agente farmacéutico, tal como fármaco quimioterapéutico o una toxina. Estos se pueden enlazar a una citoquina, a un ligando, a otro anticuerpo. Los agentes adecuados para el acoplamiento a anticuerpos para conseguir un efecto anti-tumoral

incluyen citoquinas, tales como interleuquina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral (TNF); fotosensibilizadores, para uso en terapia fotodinámica, incluyendo ftalocianina tetrasulfonato de aluminio (III), hematoporfirina, y ftalocianina; radionucleidos, tales como yodo-131 (<sup>131</sup>I), itrio-90 (<sup>90</sup>Y), bismuto-212 (<sup>212</sup>Bi), bismuto-213 (<sup>213</sup>Bi), tecnecio-99m (<sup>99m</sup>Tc), renio-186 (<sup>186</sup>Re), y renio-188 (<sup>188</sup>Re); antibióticos, tales como doxorubicina, adriamicina, daunorrubicina, metotrexato, 5 daunomicina, neocarzinostatina, y carboplatino; toxinas bacterianas, vegetales, y otras, tales como toxina de la difteria, exotoxina de *Pseudomonas A*, enterotoxina A estafilocócica, toxina abrina-A, ricina A (ricina A desglicosilada y ricina natural A), toxina TGF-alfa, citotoxina de cobra China (naja naja atra), y gelonina (una toxina vegetal); proteínas inactivadoras del ribosoma de plantas, bacterias y hongos, tales como restrictocina (una proteína inactivadora del ribosoma producida por *Aspergillus restrictus*), saporina (una proteínas inactivadora del ribosoma de *Saponaria* 10 *officinalis*), y RNasa; inhibidores de la tirosina quinasa; ly207702 (un nucleósido de purina difluorado); liposomas que contienen agentes anti-quísticos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, plásmidos que codifican toxinas, metotrexato, etc.); y otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, tales como F(ab).

Los anticuerpos de la divulgación también se pueden unir a muchos transportadores diferentes. Por lo tanto, esta 15 divulgación también proporciona composiciones que contienen los anticuerpos y otra sustancia, activa o inerte. Los ejemplos de transportadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del transportador puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Los expertos en la materia conocerán otros transportadores adecuados para la unión de anticuerpos monoclonales, o serán capaces de determinarlos, usando experimentación 20 rutinaria.

#### IV. Terapias

La presente invención se refiere a una composición que comprende un derivado de fXa de la invención para uso en 25 un procedimiento terapéutico de prevención o reducción de hemorragias en un sujeto sometido a terapia anticoagulante. Se contempla que los antídotos o derivados de la presente invención pueden ser fármacos de corta duración para usarlos en situaciones de elección o de emergencia que pueden neutralizar de forma segura y específica propiedades anticoagulantes convencionales de un inhibidor de fXa sin causar efectos secundarios o hemodinámicos perjudiciales o exacerbación de la respuesta vascular proliferativa a la lesión.

30 En una realización, la cantidad terapéuticamente efectiva de un antídoto muestra un índice terapéutico elevado. El índice terapéutico es la relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos que pueden expresarse como la relación entre DL<sub>50</sub> y DE<sub>50</sub>. La DL<sub>50</sub> es la dosis letal para el 50% de la población y la DE<sub>50</sub> es la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población. La DL<sub>50</sub> y la DE<sub>50</sub> se determinan mediante procedimientos farmacéuticos estándar en 35 cultivos celulares animales o animales experimentales. Los antídotos o derivados de esta invención pueden administrarse una o varias veces cuando se necesitan para neutralizar el efecto de un inhibidor de fXa presente en el plasma de un sujeto. Preferentemente, los antídotos de esta invención son suficientes cuando se administran en una única dosis.

40 Se contempla que una dosis típica de los antídotos de la invención dependerá del entorno clínico real y de la concentración del inhibidor en el plasma. En ensayos *in vitro*, tales como generación de trombina, ensayos clínicos de coagulación tales como aPTT, PT y ACT, se espera que una cantidad terapéuticamente efectiva de un antídoto produzca produce una corrección de la actividad de coagulación *ex vivo* del 10% o más. Los ensayos *in vitro* indican que una relación de antídoto/inhibidor > 1,0 debe mostrar un efecto de inversión. Se espera que la concentración 45 plasmática máxima para antídoto esté en el intervalo micromolar, probablemente entre 10 micromolar o por debajo.

En un entorno clínico, uno de los criterios en la determinación de la eficacia de un antídoto es que produzca cualquier cambio de las medidas reales de hemorragia. En los ensayos clínicos, las categorías de hemorragias graves son la 50 hemorragia fatal, las hemorragias en órganos vitales (intracraneal, intraocular, retroperitoneal, medular, pericárdica), cualquier hemorragia que requiere reintervención o un nuevo procedimiento terapéutico (por ejemplo, aspiración de una rodilla operada, inserción de un tubo de toracotomía para hemotórax, electrocoagulación endoscópica, etc.) o un índice de hemorragia de  $\geq 2,0$  si se asocia con una hemorragia manifiesta. El índice de hemorragia se define como el número de unidades de glóbulos rojos empaquetados o sangre completa transfundida, además de los valores de hemoglobina antes del episodio de hemorragia menos los valores de hemoglobina después de que la hemorragia se 55 ha estabilizado (en gramos por decilitro).

Otro criterio para la eficacia de antídoto en un entorno clínico es que reduzca hemorragia no grave clínicamente significativa. Esta categoría de hemorragias incluyen hemorragia que no es importante, pero es mayor de lo habitual y justifica la atención clínica, incluyendo epistaxis que es persistente o recurrente y en cantidad sustancial o no se

detendrá sin la intervención; hemorragia rectal o del tracto urinario que no llega a un nivel que requiere un procedimiento terapéutico (por ejemplo, la nueva inserción de un catéter Foley o inspección cistoscopia), hematomas sustancial en los sitios de inyección o en otros lugares que son espontáneos o se producen con traumatismo trivial; pérdida considerable de sangre; hemorragia que requiere transfusión no planificada. Tal como se usa en el presente documento, "pérdida de sangre sustancial" se refiere a la cantidad de pérdida de sangre que es mayor de esa cantidad por lo general asociada con el procedimiento quirúrgico. Pérdida de sangre sustancial conduce a la hinchazón que se gestiona de forma conservadora, ya que se queda corta para requerir drenaje.

En una realización, los derivados de esta invención tienen suficiente semivida en plasma circulante para neutralizar sustancialmente el inhibidor de fXa presente en el plasma. El fXa activado esencialmente no tiene semivida en circulación en seres humanos, ya que es inhibido eficazmente por ATIII, TFPI y otros inhibidores de plasma (Fuchs, H.E. y Pizzo, S.V., J. Clin. Invest., 1983, 72: 2041-2049). Se ha demostrado que el fXa inactivo tiene una semivida en circulación de 2-3 horas en seres humanos. En un modelo de babuino, la semivida de un fXa bloqueado en el sitio activo por DEGR ([5-(dimetilamino)1-naftalenosulfonilo]-glutamilglicilarginil clorometil cetona) fue de aproximadamente 10 horas o 2 horas, tal como se determina mediante ensayos isotópicos o inmunoabsorbentes ligados a enzima, respectivamente (Taylor, F.B. y col., Blood, 1991, 78(2): 364-368).

Puede ser deseable prolongar la semivida de un derivado de antídoto fXa a 24-48 horas. Se contempla que la conjugación o adición de uno o más de los siguientes restos incrementará la semivida en plasma de un antídoto:

- a) polietilenglicol;
- b) un grupo acilo;
- c) liposomas y agentes de encapsulación;
- d) proteínas transportadoras;
- e) membrana fosfolipídica artificial;
- f) inmunoglobulina; y
- g) nanopartícula.

El sitio de conjugación puede no estar limitado a la cadena o residuo especial, siempre que la conjugación no enmascare el sitio o sitios de unión al del antídoto. Los antídotos descritos en el presente documento se pueden administrar en combinación con uno cualquiera o más de uno de los compuestos descritos anteriormente.

En general, los anticuerpos administrados tienen una semivida mucho más larga que las proteínas circulantes de coagulación sanguínea. Es posible usar un complejo que consiste en fXa deficiente en dominio Gla y un anticuerpo unido al exosito de fXa como antídoto de semivida en circulación prolongada. La formación de un complejo entre fXa y el anticuerpo dirigido el exosito puede reducir la interacción de un fXa deficiente en dominio Gla con sustratos e inhibidores macromoleculares, tales como protrombina y la antitrombina III, mientras que deja el sitio activo escindido inalterado, de modo que el complejo puede actuar como un antídoto para unirse al inhibidor de molécula pequeña dirigido al sitio activo. La formación de complejo de  $\alpha$ -2-macroglobulina-fXa también puede ser de utilidad como antídoto para los inhibidores de molécula pequeña de fXa.

La eficacia de los antídotos en la inversión de la actividad anticoagulante de los inhibidores de fXa, así como su actividad procoagulante puede determinarse mediante ensayos *in vitro* y modelos animales por los expertos en la materia. Son ejemplos de ensayos *in vitro* la generación de trombina, los ensayos clínicos de coagulación tales como aPTT, PT y ACT. Se contempla que un antídoto de esta invención sea capaz de producir el 10% o más de corrección de la actividad de coagulación *ex vivo*. Varios modelos animales *in vivo* de tiempo de hemorragia y/o pérdida de sangre en, por ejemplo, roedores, tales como ratones, perros y primates, tales como monos, se pueden usar para medir la eficacia.

## 50 V. Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona, además, composiciones que comprenden un derivado de fXa y un transportador farmacéuticamente aceptable.

"Transportadores farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualesquiera diluyentes, excipientes o transportadores que pueden usarse en las composiciones de la invención. Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tamponantes, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina,

hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, copolímeros de bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de lana. Los transportadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, un texto de referencia estándar en este campo. Se seleccionan preferentemente con respecto a la forma pretendida de administración, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes y similares, y consecuentes con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden fabricarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica tales como procesos de granulación convencional, mezcla, disolución, encapsulación, liofilización, emulsión, entre otros. Las composiciones pueden producirse de diversas formas, incluyendo gránulos, precipitados o partículas, polvos, incluyendo secado por congelación, secado rotatorio o polvos secados por pulverización, polvos amorfos, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o soluciones. Las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizantes, modificadores de pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de éstos.

Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse como suspensiones o soluciones líquidas usando un líquido estéril, tal como aceite, agua, alcohol, y combinaciones de los mismos. Tensioactivos, agentes de suspensión o agentes emulsionantes farmacéuticamente adecuados, se pueden añadir para administración oral o parenteral. Las suspensiones pueden incluir aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva. La preparación en suspensión también puede contener ésteres de ácidos grasos, tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácidos grasos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. Las formulaciones en suspensión pueden incluir alcoholes, tales como etanol, alcohol isopropílico, alcohol hexadecílico, glicerol y propilenglicol. Éteres, tales como poli(etilenglicol), hidrocarburos de petróleo, tales como aceite mineral y vaselina, y agua también se pueden usar en formulaciones en suspensión.

Las composiciones de esta invención están formadas para administración farmacéutica a un mamífero, preferentemente un ser humano. Dichas composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse de diversas maneras, preferentemente por vía parenteral.

Se contempla que para invertir rápidamente la actividad anticoagulante de un inhibidor de fXa presente en el plasma de un paciente en una situación de emergencia, el antídoto de esta invención puede o pueda ser administrado a la circulación sistémica mediante administración parenteral. El término "parenteral", tal como se usa en el presente documento, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasínovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Sin embargo, en casos en que el inhibidor de fXa que está siendo neutralizado tiene una larga semivida en plasma, una infusión continua o una formulación de liberación sostenida puede ser necesaria para unirse al inhibidor de fXa y de este modo liberar el fXa activo antes de la eliminación del inhibidor de fXa del cuerpo.

Las formas inyectables estériles de las composiciones de esta invención pueden ser suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como medio disolvente o de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo suave incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones en aceite también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables incluyendo emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos usados comúnmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquida, u farmacéuticamente aceptables también pueden usarse para fines de formulación. Los compuestos pueden formularse para administración parenteral por inyección tal como por inyección en embolada o infusión continua. Una forma de dosificación unitaria para inyección puede ser en ampollas o en recipientes de múltiples dosis.

Además de las formas de dosificación descritas anteriormente, excipientes y transportadores y formas de dosificación farmacéuticamente aceptables son conocidos generalmente por los expertos en la materia y están incluidos en la

invención. Debe entenderse que un régimen de dosificación y tratamiento específico para cualquier paciente particular dependerá de diversos factores, incluyendo la actividad del antídoto específico empleado, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta, la función renal y hepática del paciente, y el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, criterio del facultativo o el veterinario a cargo del tratamiento y la gravedad de la enfermedad particular que está siendo tratada.

## VI. Kits

- La divulgación proporciona además kits o paquetes. El kit puede comprender: (a) un primer recipiente que contiene un inhibidor de fXa para la administración regular para el tratamiento de la trombosis, y (b) un segundo recipiente que contiene un antídoto de esta invención para usarlo en los casos en que hay una sobredosis del inhibidor de fXa en (a) o cuando la hemostasia normal necesita ser restaurada para detener o prevenir la hemorragia. El kit puede comprender además una etiqueta que explica cuándo deben usarse estos dos agentes en (a) y (b).
- El primer y segundo recipiente puede ser un frasco, tarro, vial, matraz, jeringa, tubo, bolsa, o cualquier otro recipiente usado en la fabricación, el almacenamiento o la distribución de un producto farmacéutico. El prospecto puede ser una etiqueta, marca, marcador, o similares, que recita información relativa a la composición farmacéutica del kit. La información recitada por lo general es determinada por la agencia reguladora que regula la zona en la que se va a comercializar la composición farmacéutica, tal como la Food and Drug Administration. Preferiblemente, en el prospecto recita específicamente las indicaciones para las que la composición farmacéutica se ha aprobado. El prospecto puede estar hecho de cualquier material sobre el que una persona pueda leer la información contenida en el mismo o sobre el mismo. Preferiblemente, el prospecto es un material imprimible, tal como papel, cartón con reverso adhesivo, papel de aluminio, o plástico, y similares, en el que se ha impreso o aplicado la información deseada.

## 25 EJEMPLOS

La invención se entenderá adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que pretenden ser puramente ejemplares de la invención. La presente invención no está limitada en alcance por las realizaciones ejemplificadas, que pretenden ser ilustraciones de aspectos individuales de la invención solamente. Cualesquiera procedimientos que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Dichas modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se indique otra cosa, todas las temperaturas están en grados Celsius. Además, en estos ejemplos y en cualquier otra parte, las abreviaturas tienen los siguientes significados:

- aa = aminoácido  
ab = anticuerpo
- ACT = Tiempo de coagulación activado  
aPTT= tiempo de tromboplastina parcial activada  
célula CHO = célula de ovario de hámster chino  
células CHO dhfr (-)= células CHO que carecen de gen dhfr  
hr= hora
- INR= Relación normalizada internacional  
IV = intravenosa  
kg = kilogramo  
M = molar  
mg = miligramo
- mg / kg = Miligramo/kilogramo  
mg/ml= Miligramo/mililitro  
min = minuto  
ml = mililitro  
mM = milimolar
- nm = nanómetros  
nM = nanomolar  
PO= oral  
PRP= Plasma rico en plaquetas  
PT = Tiempo de protrombina

RFU = Unidad de fluorescencia relativa

s = segundo

TF = Factor tisular

U/ml= Unidades/mililitro

5  $\mu$ l o  $\mu$ l= microlitro

$\mu$ M= micromol

$\mu$ g= microgramo

### Ejemplo 1. Preparación de des-Gla anhidro-fXa mediante digestión con quimotripsina

10

Se preparó des-Gla anhidro-fXa de acuerdo con el procedimiento de Morita, T. y col., J. Bio. Chem., 1986, 261(9): 4015-4023 mediante la incubación de anhidro-fXa, en el que deshidroalanina sustituye a la serina del sitio activo, con quimotripsina en Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, a pH 7,5 y 22°C durante 60 minutos. En un entorno de experimento típico, 0,5 miligramos/mililitro (mg/ml) de anhidro-fXa se incubaron con perlas de 5 unidades/mililitro (U/ml) de  $\alpha$ -quimotripsina-agarosa con agitación suave. Al final de la reacción, las perlas de  $\alpha$ -quimotripsina-agarosa se eliminaron por centrifugación o filtración. A esto le siguió incubación con cantidad en exceso de inhibidores fluoruro de 4-amidino-fenil-metanosulfonilo (APMSF), tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK), y tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) para inactivar la actividad fXa residual o cualquier actividad de la quimotripsina posiblemente lixiviada a partir de las perlas. El fragmento de dominio Gla y los inhibidores se eliminaron del producto final, des-Gla anhidro-fXa, por un dispositivo de filtro Amicon Ultra Centrifugal (membrana YM10) o mediante diálisis convencional. La concentración o el intercambio de tampón, en caso necesario, también se logró al mismo tiempo. El anhidro-fXa que contiene dominio Gla se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito por Nogami, y col., J. Biol. Chem. 1999, 274 (43): 31000-7. La perla de  $\alpha$ -quimotripsina-agarosa se adquirió de Sigma y la actividad específica (U/ml) se basaba en los datos del fabricante para el número de lote específico usado.

25

La digestión con quimotripsina de fXa activo puede llevarse a cabo de acuerdo con el procedimiento anterior sin usar APMSF. La actividad de coagulación de fXa activo se determinó antes de la digestión con quimotripsina, y después de 15, 30 y 60 minutos de la digestión con quimotripsina de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 3 a continuación. La figura 7 muestra una pérdida completa de la actividad de coagulación después de 30 minutos de digestión con quimotripsina. El tiempo de incubación se prolongó a 60 minutos para asegurar la eliminación completa del dominio Gla.

30

### Ejemplo 2. Ensayo de generación de trombina en plasma pobre en plaquetas (PPP) o plasma rico en plaquetas (PRP)

35

En este ejemplo, las muestras de plasma rico en plaquetas o pobre en plaquetas humanas se prepararon a partir de sangre de donantes sanos extraída en el 0,32% de citrato. PRP y PPP se prepararon centrifugando la sangre anticoagulada a ~100 gravedades o 1000 gravedades durante 20 minutos, respectivamente, a temperatura ambiente. 75-100 microlitros de plasma ( $\mu$ l) se mezclaron con  $\text{CaCl}_2$  y Z-Gly-Gly-Arg-aminometilcumarina (Z-GGR-AMC, un sustrato fluorógeno de trombina). Se añadió el factor tisular (Innovin, Dade Behring) para iniciar la generación de trombina. Para un experimento típico, la mezcla de reacción contenía  $\text{Ca}^{2+}$  15 milimolar (mM), Z-GGR-AMC 100 micromolar ( $\mu$ M), y el factor tisular (TF) (Innovin) 0,1 nanomolar (nM). La formación de trombina se monitorizó de forma continua a 37°C mediante un lector de placas fluorométrico (Molecular Devices) midiendo las unidades de fluorescencia relativa (RFU). Inhibidor y antídoto, cuando están presentes, se preincubaron con plasma durante 20 minutos a temperatura ambiente antes del inicio de la generación de trombina.

45

Los resultados de diversos experimentos usando este ensayo pueden encontrarse en las figuras 4, 6 y 9.

### Ejemplo 3. Ensayos de prolongación de la coagulación

50

Se usaron dos formatos de ensayo de coagulación para poner a prueba los efectos de los inhibidores del factor Xa y el antídoto sobre la prolongación de la coagulación. En el primer formato, se usó una placa de 96 pocillos para medir varias muestras al mismo tiempo. En el segundo formato de ensayo, se midió aPTT con un instrumento de coagulación convencional (temporizador de coagulación automático MLA Electra 800).

55

En el procedimiento de formato de placa de 96 pocillos, plasma pobre en plaquetas o plasma rico en plaquetas humano se preparó de manera similar a los procedimientos en el ejemplo 2. De 75 a 100  $\mu$ l de plasma se recalcificaron con  $\text{CaCl}_2$ , se incubaron a 37°C durante 3 minutos y la formación de coágulos se inició añadiendo factor tisular (Innovin,

Dade Behring) o un reactivo de aPTT (Actin FS, Dade Behring). El cambio de DO405 se monitorizó continuamente mediante un lector de placas (Molecular Devices). El tiempo de coagulación se definió como el tiempo (segundos) cuando se alcanzó la mitad del valor máximo de cambio de absorbancia (DO405nm). El inhibidor del Factor Xa y el antídoto, cuando estaban presentes, se preincubaron con plasma a temperatura ambiente durante 20 minutos antes del inicio de la reacción.

Quando un fXa activo se ensayó para su actividad de coagulación tal como se muestra en la figura 7, 75-100  $\mu$ l de plasma deficiente en fX (George King Bio-Medical, Inc.) se recalcificaron con  $\text{CaCl}_2$ , se incubaron a 37°C durante 3 minutos y productos de fXa después de la digestión con quimotripsina se añadieron al plasma para iniciar la formación de coágulos. El cambio de DO405 se monitorizó continuamente mediante un lector de placas, tal como se ha descrito anteriormente.

En la figura 13, el efecto de betrixaban 400 nM sobre la prolongación del aPTT de plasma humano normal y la inversión del efecto inhibidor de betrixaban por antídoto des-Gla anhidro-fXa se midió con un temporizador de coagulación automático MLA Electra 800. 100  $\mu$ l de plasma humano combinado se mezclaron con betrixaban 400 nM y diferentes concentraciones de antídoto. Se añadieron reactivo de aPTT (Actin FS, Dade Behring) y  $\text{CaCl}_2$  según las instrucciones del fabricante para la medición de los tiempos de coagulación.

Los resultados de experimentos adicionales usando este ensayo pueden encontrarse en la figuras 10 y 11.

#### **Ejemplo 4. Inversión de la inhibición de fXa por betrixaban mediante des-Gla anhidro-fXa**

Para medir la inhibición de la actividad fXa por betrixaban y la inversión de su efecto inhibidor, se purificó fXa activo, diferentes concentraciones de betrixaban y antídoto des-Gla anhidro-fXa se añadieron a Tris 20 mM, NaCl 150 mM,  $\text{Ca}^{2+}$  5 mM, y albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1%. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos, se añadieron 100  $\mu$ M de Spectrozyme FXa (un sustrato cromógeno del factor Xa, Chromogenix) a la mezcla y la velocidad de escisión de sustrato se monitorizó continuamente durante 5 minutos a 405 nanómetros (nm) mediante un lector de placas. En la figura 5, la actividad cromógena se normalizó respecto a fXa activo en ausencia de cualquier inhibidor. La velocidad inicial de formación de producto en función de la concentración de inhibidor y antídoto se analizó por regresión no lineal para estimar la afinidad de betrixaban por el antídoto (figura 8).

El efecto del antídoto des-Gla anhidro-fXa sobre la actividad de trombina hacia un sustrato cromógeno S2288 (200  $\mu$ M) se midió de manera similar como anteriormente, con o sin Argatroban, un inhibidor de IIa de molécula pequeña específico. Como se esperaba, el antídoto (538 nM) no afecta a la actividad amidolítica de IIa (5 nM) o su inhibición por Argatroban 50 nM.

#### **Ejemplo 5. Preparación de fXa con residuos de ácido $\gamma$ -carboxiglutámico descarboxilados**

Un derivado de fXa con residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico descarboxilados puede prepararse tratando proteína fXa, por ejemplo, basándose en el procedimiento descrito por Bajaj, y col., J. Biol. Chem., 1982, 257(7): 3726-3731. De 2 a 5 mg de fXa purificado o recombinante en 2 ml de bicarbonato de amonio 0,1 molar a pH 8,0 se liofilizan. El polvo resultante se selló a un vacío de menos de 20  $\mu$ M y se calentó a 110°C durante diversos periodos de tiempo para obtener fXa descarboxilado.

#### **Ejemplo 6. Preparación de des-Gla fXa-S379A recombinante**

Los derivados de fXa pueden producirse mediante procedimiento de ADN recombinante con uno de los siguientes procedimientos basados en cADN de fX (SEQ ID NO. 2) para expresar fX (SEQ ID NO. 1, 3) o derivados de fXa (SEQ ID NO. 4, 5, 9 y 11) en un organismo huésped adecuado de acuerdo con procedimientos generales de mutagénesis y biología molecular.

fX recombinante y derivados de fX pueden expresarse en, por ejemplo, células de riñón embrionario humano HEK293 basándose en procedimientos descritos en Larson, P.J., y col., Biochem., 1998, 37: 5029-5038, y Camire, R.M., y col., Biochem., 2000, 39, 14322-14329. fX recombinante puede activarse a rfXa mediante el activador del factor X veneno de víbora de Russell (RVV). rfXa puede procesarse adicionalmente a des-Gla anhidro-fXa basándose en procedimientos descritos en el ejemplo 1.

fX-S379A recombinante (S195A en numeración de quimotripsina) con el residuo serina del sitio activo siendo sustituido por alanina, y preferentemente el mutante de fXa activado, rfXa-S379A, puede expresarse, por ejemplo, en células de

ovario de hámster chino (CHO) basándose en procedimientos descritos por Sinha y col., *Protein Expression and Purif.* 1992, 3: 518-524; Wolf, D.L. y col., *J. Biol. Chem.*, 1991, 266(21): 13726-13730.

Des-Gla fXa-S379A puede prepararse mediante digestión con quimotripsina de fXa-S379A de acuerdo con  
5 procedimiento descritos en el ejemplo 1.

Más preferentemente, Des-Gla fXa-S379A puede expresarse directamente de acuerdo con procedimientos previos con  
deleción del fragmento del dominio Gla mediante procedimientos de mutagénesis. Por ejemplo, puede usarse  
expresión de proteínas recombinantes para expresar: des-Gla(1-39)-fXa-S379A, después de la eliminación del  
10 fragmento de dominio Gla 1-39 de la SEQ ID NO. 3; des-Gla(1-44)-fXa-S379A, equivalente a la SEQ ID NO. 10 con  
deshidroalanina siendo sustituida por alanina; y des-Gla(1-45)-fXa-S379A con todo el dominio Gla siendo eliminado  
(SEQ ID NO. 11).

También pueden realizarse truncamientos adicionales en el dominio EGF1 o EGF1 *más* EGF2 (figura 2) para expresar  
15 derivados des(1-84)-fXa-S379A o des(1-128)-fXa-S379A.

### Ejemplo 7. Expresión de mutante de fXa recombinante en células CHO

Este ejemplo describe la construcción de expresión de proteína recombinante y la línea celular para la expresión  
20 directa de una variante de fXa-S379A sin dominio Gla (S195A en la numeración de quimotripsina). El antídoto  
recombinante no requiere las etapas de activación o modificación química necesarias para producir el pd-antídoto y  
tiene una afinidad comparable a la proteína derivada de plasma en los ensayos *in vitro* descritos en el presente  
documento.

25 En este ejemplo, un mutante de fXa (SEQ ID NO. 13, tabla 12a) se expresó directamente en una célula CHO (véase  
la figura 14 para vector de expresión) y la proteína funcional se purificó a partir de medio acondicionado como se  
describe a continuación. La actividad funcional del antídoto recombinante (r-antídoto) se ensayó *in vitro* y en un modelo  
animal (ejemplo 8).

30 Se usó PCR para mutar la secuencia de cADN de fX (SEQ ID NO. 2) en tres regiones. La primera mutación fue la  
deleción de 6 a 39 aa en el dominio Gla de FX (SEQ ID NO. 3, figura 3). La segunda mutación fue sustituir la secuencia  
del péptido de activación de 143-194 aa con -RKR-. Esto produjo un enlazador -RKRRKR- que conecta la cadena  
ligera y la cadena pesada. Tras la secreción, este enlazador se elimina en CHO dando como resultado una molécula  
de fXa bicatenaria. La tercera mutación es la mutación del residuo del sitio activo S379 a un residuo de Ala.

35 El polipéptido producido mediante el cADN (SEQ ID NO. 16) que se acaba de describir, se describe en la tabla 12  
(SEQ ID NO. 12). El alineamiento del cADN con el polipéptido se muestra en la tabla 20. La molécula de fXa bicatenaria  
producida después de la secreción es un fragmento de cadena ligera descrito en la tabla 12b (SEQ ID NO. 14) y un  
fragmento de cadena pesada descrito en la tabla 12c (SEQ ID NO. 15).

40 Los primeros 1-5 aa en la secuencia de fX se reservaron y se usaron para conectar el polipéptido de mutante de fXa  
con el prepropéptido de fX (SEQ ID NO. 1, figura 1), garantizando el apropiado procesamiento del prepropéptido en el  
mutante de fXa.

45 La secuencia de ADN que codifica el polipéptido de mutante de fXa descrito anteriormente se secuenció y se insertó  
en el vector de expresión mostrado en la Figura 14. El polinucleótido del vector de expresión se muestra en la SEQ ID  
NO. 18. El ADN del plásmido se linealizó y se transfectó a células CHO dhfr(-). Las células se seleccionaron usando  
medios deficientes en tetrahidrofolato (HT) más metotrexato (MTX). Se cribaron clones estables para expresión  
elevada de proteínas usando un kit de ELISA de fX (Enzyme Research Laboratories, número de catálogo FX-EIA). La  
50 proteína mutante de fXa se expresó en medio libre de suero y el medio acondicionado se recogió y se procesó para  
purificación.

La proteína diana en el medio se puede aislar mediante cromatografía de intercambio iónico y purificarse  
posteriormente mediante cromatografía de afinidad de etapa única (tal como un anticuerpo anti-fXa acoplado a una  
55 matriz) o mediante una combinación de varias etapas de cromatografía, tales como matrices hidrófobas. Las  
purificaciones por afinidad pueden incluir material cromatográfico que se une selectivamente al sitio activo escindido  
de fXa, tal como benzamidina-sefarosa o inhibidor de tripsina de soja-agarosa (STI-agarosa).

La figura 15 muestra las transferencias de Western de mutante de fXa purificado por afinidad (STI-Agarosa, nº de

catálogo de Sigma T0637) usando anticuerpos monoclonales (Enzyme Research Laboratories, FX-EIA) que reconoce la cadena pesada y ligera de fX, respectivamente. Tras la reducción del puente disulfuro que conecta la cadena ligera y pesada, el r-Antídoto muestra la banda de cadena pesada esperada similar a fXa derivado de plasma en la transferencia de Western. La delección de 6-39 aa en el dominio Gla del mutante de fXa da como resultado una banda de peso molecular más bajo para la cadena ligera de r-Antídoto en comparación con fXa derivado del plasma. Las marcas de peso molecular también pueden verse en la transferencia.

#### **Ejemplo 8. Modelo en ratón *in vivo***

10 Se ensayaron el perfil farmacocinético y farmacodinámico (PK-PD) de betrixaban en ratones macho C57B1/6 con o sin la administración de antídoto. La administración oral única de betrixaban se dosificó a 0, 15, 25 y 75 mg/kg para los grupos de control. Se usaron 15 mg/kg para el grupo tratado con antídoto. Una única inyección intravenosa (IV) de antídoto (300 ug/200 µl) o vehículo (solución salina normal, 200 µl) se administró 5 minutos antes del punto temporal de 1,5 h.

15

A las 1,5, 2,0, y 4,0 horas después de la administración oral de betrixaban, los ratones fueron anestesiados con un cóctel de ketamina (SC) y se desangraron por punción cardiaca. Se obtuvieron muestras de sangre (0,5 ml) en 50 µl de citrato trisódico. La INR de sangre total se midió usando cartuchos de HEMOCHRON Jr. (International Technidyne Corporation) según las instrucciones del fabricante. Se preparó plasma pobre en plaquetas de ratón por centrifugación para determinaciones de la concentración plasmática de betrixaban y antídoto (ELISA).

20

Para experimento con antídoto recombinante (r-antídoto), a los ratones se les administró por vía oral betrixaban a 0, 15, 25 y 75 mg/kg para grupos de control. Se usaron 15 mg/kg para el grupo tratado con antídoto (300 µg/200 µl). Se tomaron muestras a 1,5 h después de la administración oral de betrixaban (5 min. después de la inyección de antídoto).

25

Tal como se muestra en la figuras 16 y 17 y las tablas 13 y 14, una única inyección (300 µg, IV) de antídoto derivado de plasma (pd-antídoto) o mutante de fXa recombinante (r-antídoto) a ratones después de la administración de betrixaban (15 mg/kg, PO) capturaba eficazmente el inhibidor *in vivo*. La correlación PK-PD de INR de sangre completa y la concentración plasmática de antídoto (tablas 13-14) indicaba una reducción >50% de betrixaban funcional basándose en mediciones de INR, y justificaron la neutralización eficaz de inhibidores de fXa mediante el antídoto mediante múltiples inyecciones u otros regímenes. Se contempla que estos resultados demuestran que los derivados de fXa de esta invención tienen potencial para actuar como antídotos universales para invertir el efecto anticoagulante de inhibidores de fXa en pacientes con hemorragia u otras urgencias médicas.

30

35 La figura 22 muestra un experimento en ratón con una sola inyección IV (1 inyección) o dos inyecciones (2 inyecciones) del r-antídoto (n = 5 por grupo, 312 ug/200 ul de r-antídoto) después de la administración oral de betrixaban (15 mg/kg). Para el grupo de inyección única, se tomaron muestras de sangre de ratón a 1 h después de la administración oral de betrixaban. Vehículo (control\_1) o r-Antídoto (1 inyección) se administró 5 min antes del punto temporal de 1 h. Para el grupo de doble inyección, se inyectó vehículo o r-antídoto a los 55 min y se repitieron al 115 min después de la administración oral de betrixaban. Se tomaron muestras de sangre de ratón a las 2 h para los ratones tratados con vehículo (control\_2) y r-antídoto (2 inyecciones). La INR se midió en función de la relación de antídoto/betrixaban en plasma de ratón después de las inyecciones individuales o dobles del antídoto, tal como se muestra en la figura 22B.

40

#### **Ejemplo 9. Inversión *in vitro* de rivaroxaban y apixaban mediante antídoto**

45

Como se esperaba, los antídotos contemplados por esta invención también fueron capaces de unirse a y neutralizar otros inhibidores de fXa dirigidos al sitio activo. Las tablas 15 y 16 muestran corrección *in vitro* de la inhibición por betrixaban, rivaroxaban y apixaban mediante pd-antídoto y r-antídoto. FXa purificado (3,0 nM), inhibidor (7,5 nM), y diferentes concentraciones de antídoto se incubaron durante 10 min a 22°C en un tampón con Tris 20 mM, NaCl 150 mM, BSA al 0,1%, pH 7,4. La actividad de fXa se ensayó similar al ejemplo 4.

50

Tal como se muestra en la tabla 15, pd-antídoto 204 nM produce al menos el 60% de corrección de los efectos inhibidores de inhibidores de la prueba, mientras que, en la tabla 16 se consigue >95% de corrección de inhibición mediante el r-antídoto (186 nM) para betrixaban y rivaroxaban y > 70% inversión de apixaban.

55

#### **Ejemplo 10. Inversión *in vitro* de betrixaban mediante r-antídoto**

En la tabla 17, se ensayó el efecto de la proteína antídoto recombinante sobre la inversión de la anticoagulación por betrixaban en un ensayo de coagulación en plasma humano. El efecto de betrixaban 300 nM y 400 nM sobre una

prolongación del aPTT de plasma y la inversión del efecto inhibitor se midió mediante un temporizador de coagulación automático MLA Electra 800. 100 µl de plasma humano anticoagulado combinado se mezclaron con betrixaban 300 nM o 400 nM y diferentes concentraciones de antídoto. Se añadieron reactivo de aPTT (Actin FS, Dade Behring) y CaCl<sub>2</sub> según las instrucciones del fabricante.

5

#### **Ejemplo 11. Inversión *in vitro* de heparina de bajo peso molecular (“LMWH”) mediante r-antídoto**

En la figura 18, se ensayó el efecto de r-antídoto para invertir el efecto inhibitor de la LMWH enoxaparina (Sanofi-Aventis) mediante cambios de turbidez en plasma humano. Se incubó enoxaparina (0-1,25 U/ml) a 22°C durante 20 min con o sin r-antídoto 508 nM. Se midieron cambios de turbidez de acuerdo con procedimiento descritos en el ejemplo 3. El r-antídoto 508 nM sustancialmente corregía (>75%) el efecto inhibitor de 0,3125-1,25 U/ml de enoxaparina.

En la figura 19, se ensayó el efecto de r-antídoto sobre la inversión de anticoagulación mediante una heparina de bajo peso molecular (LMWH enoxaparina, Sanofi-Aventis) en un ensayo de coagulación en plasma humano. El efecto de 1 unidad de antiXa/ml de LMWH sobre una prolongación del aPTT de plasma y la inversión del efecto inhibitor se midió mediante un temporizador de coagulación automático MLA Electra 800. 100 µl de plasma humano anticoagulado con citrato combinado se mezclaron con enoxaparina y diferentes concentraciones de antídoto. Antes de la medición del tiempo de coagulación, se añadieron reactivo de aPTT (Actin FS, Dade Behring) y CaCl<sub>2</sub> según las instrucciones del fabricante. La adición de antídoto recombinante 1,14 µM producía una corrección del 52% de anticoagulación producida por 1 unidad/ml de enoxaparina.

#### **Ejemplo 12. Inversión *in vitro* de rivaroxaban mediante r-antídoto**

En la figura 20, se ensayó el efecto de proteína de antídoto recombinante sobre la inversión de anticoagulación mediante un inhibidor del factor Xa de molécula pequeña (rivaroxaban, Bay 59-7939) en un ensayo de coagulación en plasma humano. Según lo descrito por Perzborn y col., J. Thromb. Haemost. 3: 514-521, 2005; las mediciones del tiempo de protrombina son un procedimiento preciso para evaluar el efecto anticoagulante de rivaroxaban. El efecto de rivaroxaban 1 µM sobre la prolongación del tiempo de protrombina (PT) de plasma humano combinado y la inversión del efecto inhibitor se midió mediante un temporizador de coagulación automático MLA Electra 800. 100 µl de plasma humano anticoagulado con citrato combinado se mezclaron con rivaroxaban y diferentes concentraciones de antídoto. Antes de la medición del tiempo de coagulación, se añadió reactivo Thromboplastin C Plus de cerebro de conejo (Dade Behring) a muestras de plasma según las instrucciones del fabricante. La adición de anticuerpo recombinante 1,9 µM produjo una corrección del 100% de la anticoagulación producida por rivaroxaban 1 µM.

35

#### **Ejemplo 13. Inversión *in vitro* de apixaban mediante r-antídoto**

En la tabla 18, se ensayó el efecto de proteína de antídoto recombinante sobre la inversión de anticoagulación mediante apixaban en un ensayo de coagulación en plasma humano. Según lo descrito por Pinto y col., J. Med. Chem. 55(22): 5339-5356, 2007; las mediciones del tiempo protrombina (PT) son un procedimiento preciso de evaluar los efectos anticoagulantes *ex vivo* de apixaban. El efecto de apixaban 1 µM y 1,5 µM sobre la prolongación del tiempo de protrombina (PT) de plasma humano combinado y la inversión del efecto inhibitor se midió mediante un temporizador de coagulación automático MLA Electra 800. 100 µl de plasma humano anticoagulado con citrato combinado se mezclaron con apixaban y diferentes concentraciones de antídoto. Antes de la medición del tiempo de coagulación, se añadió reactivo Thromboplastin C Plus de cerebro de conejo (Dade Behring) a muestras de plasma según las instrucciones del fabricante. La adición de antídoto recombinante 1,9 µM produjo una corrección del 97% de la anticoagulación producida por apixaban 1,5 µM.

#### **Ejemplo 14. Inhibición *in vitro* de argatroban mediante des-Gla anhidro-fXa**

50

Para medir la inhibición de la actividad de trombina mediante argatroban y la inversión de su efecto inhibitor, se añadieron trombina humana purificada (5 nM), argatroban (50 nM) y diferentes concentraciones de antídoto des-Gla anhidro fXa a un tampón que contenía Tris 20 mM, NaCl 0,15 M, cloruro cálcico 5 mM, albúmina de suero bovino al 0,1%, pH 7,4. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 20 min, se añadió un sustrato amidolítico S2288 (200 µM) a la mezcla y la velocidad de escisión de sustrato de p-nitroanilida se monitorizó mediante absorbancia a 405 nm. Los resultados se presentan en la figura 12.

55

Debe entenderse que, aunque la invención se ha descrito junto con las realizaciones anteriores, la descripción y los

ejemplos anteriores pretenden ilustrar y no limitar el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a la que pertenece la invención.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5  
<110> PORTOLA PHARMACEUTICALS, INC.  
<120> ANTÍDOTOS PARA INHIBIDORES DEL FACTOR XA Y PROCEDIMIENTOS DE USO DE LOS MISMOS
- 10 <130> N110263D-EP  
<140> 14197779.3  
<141> 26-09-2008
- 15 <150> 61/090,574 <151> 20-08-2008  
<150> 60/976,343 <151> 28-09-2007  
<160> 19
- 20  
<170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
<211> 488
- 25 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 1

ES 2 796 623 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 796 623 T3

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

Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr  
 165 170 175

Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly  
 180 185 190

Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu  
 195 200 205

Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln  
 210 215 220

Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu  
 225 230 235 240

Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu  
 245 250 255

Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu  
 260 265 270

Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val  
 275 280 285

Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu  
 290 295 300

Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp  
 305 310 315 320

Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met  
 325 330 335

Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr  
 340 345 350

Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His  
 355 360 365

Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr  
 370 375 380

Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln  
 385 390 395 400

ES 2 796 623 T3

Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln  
 405 410 415

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

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

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

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

Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys  
 485

<210> 2  
 <211> 1560  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

gactttgctc cagcagcctg tcccagtgag gacagggaca cagtactcgg ccacaccatg 60  
 gggcgcccac tgcacctcgt cctgctcagt gcctccctgg ctggcctcct gctgctcggg 120  
 gaaagtctgt tcatccgcag ggagcaggcc aacaacatcc tggcgagggt cagcagggcc 180  
 aattcctttc ttgaagagat gaagaaagga cacctcgaaa gagagtgcac ggaagagacc 240  
 tgctcatacg aagaggcccg cgaggctctt gaggacagcg acaagacgaa tgaattctgg 300  
 aataaataca aagatggcga ccagtgtgag accagtcctt gccagaacca gggcaaatgt 360  
 aaagacggcc tcggggaata cacctgcacc tgtttagaag gattcgaagg caaaaactgt 420  
 gaattattca cacggaagct ctgcagcctg gacaacgggg actgtgacca gttctgccac 480  
 gaggaacaga actctgtggt gtgctcctgc gcccgcggtt acaccctggc tgacaacggc 540  
 aaggcctgca ttcccacagg gccctacccc tgtgggaaac agaccctgga acgcaggaag 600  
 aggtcagtgg cccaggccac cagcagcagc ggggaggccc ctgacagcat cacatggaag 660  
 ccatatgatg cagccgacct ggaccccacc gagaaccctt tcgacctgct tgacttcaac 720  
 cagacgcagc ctgagagggg cgacaacaac ctcaccagga tcgtgggagg ccaggaatgc 780  
 aaggacgggg agtgtccctg gcaggccctg ctcacatgagg aggaaaacga gggtttctgt 840  
 ggtggaacca ttctgagcga gttctacatc ctaacggcag cccactgtct ctaccaagcc 900  
 aagagattca aggtgagggt aggggaccgg aacacggagc aggaggaggg cggtgaggcg 960

10

ES 2 796 623 T3

```

gtgcaogagg tggaggtggt catcaagcac aaccggttca caaaggagac ctatgacttc      1020
gacategccg tgctccgct caagaccccc atcaccttcc gcatgaacgt ggcgcctgcc      1080
tgctccccg agcgtgactg ggccgagtcc acgctgatga cgcagaagac ggggattgtg      1140
agcggcttcg ggcgcaccca cgagaagggc cggcagtcca ccaggctcaa gatgctggag      1200
gtgccctacg tggaccgcaa cagctgcaag ctgtccagca gcttcatcat caccagaac      1260
atgttctgtg ccggctacga caccaagcag gaggatgcct gccaggggga cagcgggggc      1320
ccgcacgtca cccgctcaa ggacacctac ttcgtgacag gcatcgtcag ctggggagag      1380
ggctgtgccc gtaaggggaa gtacgggatc tacaccaagg tcaccgcctt cctcaagtgg      1440
atcgacaggt ccatgaaaac caggggcttg cccaaggcca agagccatgc cccggaggtc      1500
ataacgtcct ctccataaa gtgagatccc actcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      1560

```

<210> 3

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu
 1          5          10          15

Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
          20          25          30

Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp
          35          40          45

Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly
 50          55          60

Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn
 65          70          75          80

Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys
          85          90          95

Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
          100          105          110

Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly
          115          120          125

Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val
          130          135          140

```

10

ES 2 796 623 T3

Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp  
145 150 155 160

Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp  
165 170 175

Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu  
180 185 190

Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp  
195 200 205

Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr  
210 215 220

Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln  
225 230 235 240

Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu  
245 250 255

Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn  
260 265 270

Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu  
275 280 285

Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro  
290 295 300

Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile  
305 310 315 320

Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg  
325 330 335

Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu  
340 345 350

Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp  
355 360 365

Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val  
370 375 380

Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly



ES 2 796 623 T3

Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr  
 165 170 175

Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro  
 180 185 190

Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp  
 195 200 205

Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly  
 210 215 220

Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met  
 225 230 235 240

Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser  
 245 250 255

Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln  
 260 265 270

Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe  
 275 280 285

Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys  
 290 295 300

Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu  
 305 310 315 320

Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys  
 325 330 335

Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys  
 340 345

<210> 5

<211> 348

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 5

Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys  
 1 5 10 15

ES 2 796 623 T3

Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu  
 20 25 30  
 Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn  
 35 40 45  
 Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys  
 50 55 60  
 Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile  
 65 70 75 80  
 Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Ile Val  
 85 90 95  
 Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu  
 100 105 110  
 Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu  
 115 120 125  
 Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe  
 130 135 140  
 Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Gly Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys  
 165 170 175  
 Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile  
 180 185 190  
 Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp  
 195 200 205  
 Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe  
 210 215 220  
 Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu  
 225 230 235 240  
 Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe  
 245 250 255  
 Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu  
 260 265 270

ES 2 796 623 T3

Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys  
275 280 285

Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala  
290 295 300

Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys  
305 310 315 320

Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser  
325 330 335

His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys  
340 345

<210> 6

<211> 393

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 6

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15

Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu  
20 25 30

Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp  
35 40 45

Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly  
50 55 60

Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn  
65 70 75 80

Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys  
85 90 95

Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala  
100 105 110

Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly  
115 120 125

ES 2 796 623 T3

Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Ile Val Gly Gly Gln  
130 135 140

Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu  
145 150 155 160

Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile  
165 170 175

Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg  
180 185 190

Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His  
195 200 205

Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr  
210 215 220

Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg  
225 230 235 240

Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser  
245 250 255

Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr  
260 265 270

His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro  
275 280 285

Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr  
290 295 300

Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys  
305 310 315 320

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr  
325 330 335

Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly  
340 345 350

Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp  
355 360 365

Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro  
370 375 380  
Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys  
385 390

<210> 7  
<211> 393

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(7)  
 10 <223> Ácido gamma-carboxiglutámico

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)..(14)  
 15 <223> Ácido gamma-carboxiglutámico

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 20 <223> Ácido gamma-carboxiglutámico

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)..(20)  
 25 <223> Ácido gamma-carboxiglutámico

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (25)..(26)  
 30 <223> Ácido gamma-carboxiglutámico

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (29)..(29)  
 35 <223> Ácido gamma-carboxiglutámico

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (32)..(32)  
 40 <223> Ácido gamma-carboxiglutámico

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (39)..(39)  
 45 <223> Ácido gamma-carboxiglutámico

<400> 7

Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Met Lys Lys Gly His Leu Xaa Arg Xaa  
 1 5 10 15

Cys Met Xaa Xaa Thr Cys Ser Tyr Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe Xaa  
 20 25 30

ES 2 796 623 T3

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

ES 2 796 623 T3

		275						280							285		
	Tyr	Val	Asp	Arg	Asn	Ser	Cys	Lys	Leu	Ser	Ser	Ser	Phe	Ile	Ile	Thr	
		290					295					300					
	Gln	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Asp	Thr	Lys	Gln	Glu	Asp	Ala	Cys	
	305					310					315					320	
	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Val	Thr	Arg	Phe	Lys	Asp	Thr	Tyr	
					325					330					335		
	Phe	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	Ala	Arg	Lys	Gly	
				340					345					350			
	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Ala	Phe	Leu	Lys	Trp	Ile	Asp	
			355					360						365			
	Arg	Ser	Met	Lys	Thr	Arg	Gly	Leu	Pro	Lys	Ala	Lys	Ser	His	Ala	Pro	
		370					375						380				
	Glu	Val	Ile	Thr	Ser	Ser	Pro	Leu	Lys								
	385					390											

- <210> 8
- <211> 139
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Polipéptido sintético
- 10
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (6)..(7)
- <223> Ácido gamma-carboxiglutámico
- 15
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (14)..(14)
- <223> Ácido gamma-carboxiglutámico
- 20
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (16)..(16)
- <223> Ácido gamma-carboxiglutámico
- 25
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (19)..(20)
- <223> Ácido gamma-carboxiglutámico
- 30
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (25)..(26)

<223> Ácido gamma-carboxiglutámico

<220>

<221> MOD\_RES

5 <222> (29)..(29)

<223> Ácido gamma-carboxiglutámico

<220>

<221> MOD\_RES

10 <222> (32)..(32)

<223> Ácido gamma-carboxiglutámico

<220>

<221> MOD\_RES

15 <222> (39)..(39)

<223> Ácido gamma-carboxiglutámico

<400> 8

20

Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Met Lys Lys Gly His Leu Xaa Arg Xaa  
1 5 10 15

Cys Met Xaa Xaa Thr Cys Ser Tyr Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe Xaa  
20 25 30

Asp Ser Asp Lys Thr Asn Xaa Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp  
35 40 45

Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly  
50 55 60

Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn  
65 70 75 80

Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys  
85 90 95

Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala  
100 105 110

Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly  
115 120 125

Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg  
130 135

<210> 9

<211> 254

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala



ES 2 796 623 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (280)..(280)  
 10 <223> Deshidroalanina

<400> 10

```

Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys
1          5          10          15

Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe
20          25          30

Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp
35          40          45

Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val
50          55          60

Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys
65          70          75          80

Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Ile
85          90          95

Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu
100         105         110

Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser
115         120         125

Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg
130         135         140

Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly
145         150         155         160

Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr
165         170         175

Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro
180         185         190
    
```

15

ES 2 796 623 T3

Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp  
 195 200 205

Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly  
 210 215 220

Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met  
 225 230 235 240

Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser  
 245 250 255

Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln  
 260 265 270

Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe  
 275 280 285

Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys  
 290 295 300

Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu  
 305 310 315 320

Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys  
 325 330 335

Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys  
 340 345

<210> 11

<211> 348

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 11

Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys  
 1 5 10 15

Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu  
 20 25 30

Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn  
 35 40 45

ES 2 796 623 T3

Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys  
50 55 60

Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Ile Val  
85 90 95

Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu  
100 105 110

Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu  
115 120 125

Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe  
130 135 140

Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu  
145 150 155 160

Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys  
165 170 175

Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile  
180 185 190

Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp  
195 200 205

Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe  
210 215 220

Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu  
225 230 235 240

Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe  
245 250 255

Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu  
260 265 270

Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys  
275 280 285

Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala  
290 295 300

ES 2 796 623 T3

Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys  
305 310 315 320

Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser  
325 330 335

His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys  
340 345

<210> 12

<211> 365

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 12

Ala Asn Ser Phe Leu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys  
1 5 10 15

Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly  
20 25 30

Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu  
35 40 45

Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln  
50 55 60

Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly  
65 70 75 80

Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr  
85 90 95

Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Arg Lys Arg Ile  
100 105 110

Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu  
115 120 125

Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser  
130 135 140

Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg  
145 150 155 160

ES 2 796 623 T3

Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly  
 165 170 175

Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr  
 180 185 190

Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro  
 195 200 205

Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp  
 210 215 220

Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly  
 225 230 235 240

Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met  
 245 250 255

Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser  
 260 265 270

Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln  
 275 280 285

Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe  
 290 295 300

Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys  
 305 310 315 320

Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu  
 325 330 335

Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys  
 340 345 350

Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys  
 355 360 365

<210> 13

5 <211> 359

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 13

Ala Asn Ser Phe Leu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys



ES 2 796 623 T3

Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn  
 260 265 270

Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly  
 275 280 285

Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val  
 290 295 300

Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr  
 305 310 315 320

Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser  
 325 330 335

Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val  
 340 345 350

Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys  
 355

- <210> 14
- <211> 105
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Polipéptido sintético
- 10
- <400> 14

Ala Asn Ser Phe Leu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys  
 1 5 10 15

Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly  
 20 25 30

Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu  
 35 40 45

Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln  
 50 55 60

Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly  
 65 70 75 80

Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr  
 85 90 95

Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg

ES 2 796 623 T3

100

105

<210> 15  
 5 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> Polipéptido sintético

<400> 15

```

Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
1          5          10          15

Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu
          20          25          30

Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys
          35          40          45

Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly
          50          55          60

Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe
65          70          75          80

Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr
          85          90          95

Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg
          100          105          110

Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser
          115          120          125

Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys
          130          135          140

Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser
145          150          155          160

Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys
          165          170          175

Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg
          180          185          190

Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly
          195          200          205
    
```

ES 2 796 623 T3

Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe  
 210 215 220

Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala  
 225 230 235 240

Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys  
 245 250

<210> 16

<211> 1218

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1215)

15 <400> 16

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

ES 2 796 623 T3

cgc agg aag agg agg aag agg atc gtg gga ggc cag gaa tgc aag gac Arg Arg Lys Arg Arg Lys Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp 145 150 155 160	480
ggg gag tgt ccc tgg cag gcc ctg ctc atc aat gag gaa aac gag ggt Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly 165 170 175	528
ttc tgt ggt gga acc att ctg agc gag ttc tac atc cta acg gca gcc Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala 180 185 190	576
cac tgt ctc tac caa gcc aag aga ttc aag gtg agg gta ggg gac cgg His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg 195 200 205	624
aac acg gag cag gag gag gcc ggt gag gcg gtg cac gag gtg gag gtg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val 210 215 220	672
gtc atc aag cac aac cgg ttc aca aag gag acc tat gac ttc gac atc Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile 225 230 235 240	720
gcc gtg ctc cgg ctc aag acc ccc atc acc ttc cgc atg aac gtg gcg Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala 245 250 255	768
cct gcc tgc ctc ccc gag cgt gac tgg gcc gag tcc acg ctg atg acg Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr 260 265 270	816
cag aag acg ggg att gtg agc gcc ttc ggg cgc acc cac gag aag gcc Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly 275 280 285	864
cgg cag tcc acc agg ctc aag atg ctg gag gtg ccc tac gtg gac cgc Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg 290 295 300	912
aac agc tgc aag ctg tcc agc agc ttc atc atc acc cag aac atg ttc Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe 305 310 315 320	960
tgt gcc gcc tac gac acc aag cag gag gat gcc tgc cag ggg gac gca Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala 325 330 335	1008
ggg gcc ccg cac gtc acc cgc ttc aag gac acc tac ttc gtg aca gcc Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly 340 345 350	1056
atc gtc agc tgg gga gag gcc tgt gcc cgt aag ggg aag tac ggg atc Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile 355 360 365	1104
tac acc aag gtc acc gcc ttc ctc aag tgg atc gac agg tcc atg aaa Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys 370 375 380	1152
acc agg gcc ttg ccc aag gcc aag agc cat gcc ccg gag gtc ata acg Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr	1200

ES 2 796 623 T3

	385		390		395		400	
	tcc tct cca tta aag tga							1218
	Ser Ser Pro Leu Lys							
			405					
	<210> 17							
	<211> 6							
	<212> PRT							
5	<213> Secuencia artificial							
	<220>							
	<223> Polipéptido sintético							
10	<400> 17							
			Arg Lys Arg Arg Lys Arg					
			1 5					
	<210> 18							
15	<211> 7303							
	<212> ADN							
	<213> Secuencia artificial							
	<220>							
20	<223> Polipéptido sintético							
	<400> 18							
	tctagacaca gtactcggcc acaccatggg gcgcccactg cacctcgtcc tgctcagtgc							60
	ctccctggct ggcctcctgc tgctcgggga aagtctgttc atccgcaggg agcaggccaa							120
	caacatcctg gcgaggggtca cgagggccaa ttcctttctt ttctggaata aatacaaga							180
	tggcgaccag tgtgagacca gtccttgcca gaaccagggc aatgtaaag acggcctcgg							240
	ggaatacacc tgcacctgtt tagaaggatt cgaaggcaaa aactgtgaat tattcacacg							300
	gaagctctgc agcctggaca acggggactg tgaccagttc tgccacgagg aacagaactc							360
	tgtggtgtgc tcctgcgccc gcggttacac cctggctgac aacggcaagg cctgcattcc							420
	cacagggccc taccctgtg ggaaacagac cctggaacgc aggaagagga ggaagaggat							480
	cgtgggaggc caggaatgca aggacgggga gtgtccctgg caggccctgc tcatcaatga							540
	ggaaaacgag ggtttctgtg gtggaacct tctgagcgag ttctacatcc taacgcagc							600
	ccactgtctc taccaagcca agagattcaa ggtgagggta ggggaccgga acacggagca							660
	ggaggagggc ggtgaggcgg tgcacgaggt ggaggtggtc atcaagcaca accggttcac							720
	aaaggagacc tatgacttcg acatcgccgt gctccggctc aagacccca tcaccttcg							780
	catgaacgtg ggcctgcct gcctccccga gcgtgactgg gccgagtcca cgctgatgac							840
	gcagaagacg gggattgtga gcggttcgg gcgcaccac gagaagggcc ggcagtccac							900
	caggctcaag atgctggagg tgcctacgt ggaccgcaac agctgcaagc tgtccagcag							960
	cttcatcatc acccagaaca tgttctgtgc cggctacgac accaagcagg aggatgctg							1020

ES 2 796 623 T3

ccagggggac gcagggggcc cgcacgtcac ccgcttcaag gacacctact tegtgcaggg 1080  
 catcgtcagc tggggagagg gctgtgcccg taaggggaag tacgggatct acaccaaggt 1140  
 caccgccttc ctcaagtgga tgcacaggtc catgaaaacc aggggcttgc ccaaggccaa 1200  
 gagccatgcc ccggagggtca taacgtcctc tccattaaag tgagatccca ctcggatccc 1260  
 tattctatag tgtcacctaa atgctagagc tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag 1320  
 ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgccac 1380  
 tcccactgtc ctttctaata aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca 1440  
 ttctattctg ggggggtggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag 1500  
 caggcatgct ggggatgctg tgggctctat ggcttctgag gcggaagaa ccagctgggg 1560  
 ctcgagcggc cgcccttct gaggcgaaa gaaccagctg tggaatgtgt gtcagttagg 1620  
 gtgtggaag tccccaggct cccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta 1680  
 gtcagcaacc aggtgtgaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaacat 1740  
 gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc gccctaact ccgcccattc cgccctaac 1800  
 tccgccagt tccgccatt ctccgcccc tgggtgacta atttttttta tttatgcaga 1860  
 ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg 1920  
 cctaggcttt tgcaaaaaag ctagcttccc gctgccatca tggttcgacc attgaactgc 1980  
 atcgtcgcg tgtcccaaaa tatggggatt ggcaagaacg gagacctacc ctggcctccg 2040  
 ctcaagaaag agttcaagta cttccaaaga atgaccacaa cctcttcagt ggaaggtaaa 2100  
 cagaatctgg tgattatgg taggaaaacc tggttctcca ttcctgagaa gaatcgacct 2160  
 ttaaaggaca gaattaatat agttctcagt agagaactca aagaaccacc acgaggagct 2220  
 cattttcttg ccaaaagttt ggatgatgcc ttaagactta ttgaacaacc ggaattggca 2280  
 agtaaagtag acatggtttg gatagtcgga ggcagttctg tttaccagga agccatgaat 2340  
 caaccaggcc accttagact ctttgtgaca aggatcatgc aggaatttga aagtgcacg 2400  
 tttttcccag aaattgattt ggggaaatat aaacttctcc cagaataccc aggcgtcctc 2460  
 tctgaggtcc aggaggaaaa aggcatacaag tataagtttg aagtctacga gaagaaagac 2520  
 taacaggaag atgctttcaa gttctctgct cccctcctaa agctatgcat tttataaga 2580  
 ccatgggact tttgctggct ttagatcccg cggagatcca gacatgataa gatacattga 2640  
 tgagtttgg caaacacaa ctagaatgca gtgaaaaaaa tgctttattt gtgaaatttg 2700  
 tgatgctatt gctttatttg taaccattat aagctgcaat aaacaagtta acaacaacaa 2760  
 ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg ggaggtgtgg gaggtttttt aaagcaagta 2820  
 aaacctctac aaatgtggtg tggctgatta tgagctccag cttttgttcc ctttagtgag 2880

ES 2 796 623 T3

ggtaattgc gcgcttggcg taatcatggt catagctggt tcctgtgtga aattggtatc 2940  
 cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct 3000  
 aatgagtgag ctaactcaca ttaattgctg tgcgctcact gcccgctttc cagtccggaa 3060  
 acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta 3120  
 ttggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc 3180  
 gagcgtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg 3240  
 caggaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaa aaggccgcgt 3300  
 tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa 3360  
 gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct 3420  
 ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc 3480  
 cttcgggaag cgtggcgtt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg 3540  
 tcgctcgtc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgtgcgcct 3600  
 tatccgtaa ctatcgtctt gagtccaacc cgtaagaca cgacttatcg cactggcag 3660  
 cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gattcttga 3720  
 agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatctgc gctcgtcga 3780  
 agccagttac cttcgaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg 3840  
 gtagcggtag ttttttgggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggtctcaag 3900  
 aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagt gaacgaaaac tcacgttaag 3960  
 ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaat 4020  
 gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct 4080  
 taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatctcg ttcacataa gttgcctgac 4140  
 tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtctgcaa 4200  
 tgataccgcg agaccacgc tcaccgctc cagatttate agcaataaac cagccagccg 4260  
 gaagggcga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt 4320  
 gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca 4380  
 ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt 4440  
 cccaacgatac aaggcgagtt acatgatccc ccatggttg caaaaagcg gttagctcct 4500  
 tcggtcctcc gatcgttgc agaagtaagt tggccgagc gttatcactc atggttatgg 4560  
 cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg 4620  
 agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg 4680  
 cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa 4740  
 aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttogatgt 4800

ES 2 796 623 T3

aaccactcg tgcaccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt 4860  
gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggaat aagggcgaca cggaaatgtt 4920  
gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca 4980  
tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat 5040  
ttccccgaaa agtgccacct gggaaattgt aaacgttaat attttgtaa aattcgcgtt 5100  
aaatthttgt taaatcagct cattthttta ccaataggcc gaaatcggca aatccctta 5160  
taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt gagtgttgtt ccagtttga acaagagtcc 5220  
actattaag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg 5280  
cccactacgt gaaccatcac cctaatacaag ttttttgggy tcgaggtgcc gtaaagcact 5340  
aatcggaac ctaaaggga gccccgatt tagagcttga cgggaaagc cggcgaacgt 5400  
ggcgagaaag gaaggaaga aagcgaagg agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc 5460  
ggtcacgctg cgcgtaacca ccacaccgc cgcgcttaat gcgccgtac agggcgctc 5520  
gogccattcg ccattcaggc tgcgcaactg ttgggaagg cgatcgggtgc gggcctctc 5580  
gctattacgc cagctggcga aaggggatg tgctgcaagg cgattaagtt ggtaacgcc 5640  
agggthttcc cagtacgac gttgtaaac gacggccagt gagcgcgct aatacgactc 5700  
actatagggc gaattggaat taattcgctg ggtgagacc cgcagaggaa gacgctctag 5760  
ggatthgtcc cggactagcg agatggcaag gctgaggacg ggaggctgat tgagaggcga 5820  
aggtacaccc taatctcaat acaacccttg gagctaagcc agcaatggtg gaggggaagat 5880  
tctgcacgtc ccttccaggc ggcctccccg tcaccacca ccccaaccg ccccgaccg 5940  
agctgagagt aattcataca aaaggactcg ccctgcctt ggggaatccc agggaccgtc 6000  
gttaaactcc cactaacgta gaaccagag atcgctgctg tcccgcctcc tcaccgcctc 6060  
gctctcgtca tcaactgaggt ggagaagagc atgctgagc ctccggtgcc cgtcagtggg 6120  
cagagcgcac atcgcccaca gtccccgaga agttggggg aggggtcggc aattgaaccg 6180  
gtgcctagag aaggtggcg ggggtaact gggaaagtga tgtcgtgtac tggctccgcc 6240  
tttttcccga ggggtgggga gaaccgtata taagtgcagt agtcgcctg aacgttcttt 6300  
ttcgcaacgg gthttgccgc agaacacagg taagtgcctg gtgtggttcc cgcgggcctg 6360  
gcctctttac gggttatggc ccttgcgtgc cttgaattac ttccacgccc ctggctgcag 6420  
tacgtgattc ttgatcccga gcttcgggtt gaaagtgggt gggagagttc gaggccttgc 6480  
gcttaaggag ccccttcgcc tcgtgcttga gttgaggcct ggcttgggag ctggggccgc 6540  
cgcgtgcgaa tctggtggca ccttcgcgcc tatctcgtg ctttcgataa gtctctagcc 6600  
atthaaaatt thtgatgacc tgctgcgacg cthththtct ggcaagatag tcttgtaaat 6660

ES 2 796 623 T3

```

cgggccaag atctgcacac tggatattcg gtttttgggg ccgcgggcgg cgacggggcc      6720
cgtgcgtccc agcgcacatg ttcggcgagg cggggcctgc gagcgcggcc accgagaatc      6780
ggacgggggt agtctcaagc tggccggcct gctctggtgc ctggcctcgc gccgccgtgt      6840
atgccccgc cctgggcggc aaggctggcc cgttcggcac cagttgcgtg agcggaaaga      6900
tggccgcttc ccggccctgc tgcagggagc tcaaaatgga ggacgcggcg ctccggagag      6960
cgggcgggtg agtcaccac acaaaggaaa agggcctttc cgtcctcagc cgtcgttca      7020
tgtgactcca cggagtaccg ggcgccgtcc aggcacctcg attagtctc gagcttttg      7080
agtagctcgt ctttaggtg gggggagggg ttttatgcga tggagtttcc ccacactgag      7140
tgggtggaga ctgaagttag gccagcttg cacttgatgt aattctcctt ggaatttgcc      7200
ctttttgagt ttgatcttg gttcattctc aagcctcaga cagtggttca aagtttttt      7260
cttccatttc aggtgctcgtg aaaactaccc ctaaaagcca aat                          7303

```

<210> 19

<211> 405

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 19

```

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

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

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

Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln
 50 55 60

Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu
 65 70 75 80

Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser
 85 90 95

Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser
 100 105 110

Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys
 115 120 125

```

ES 2 796 623 T3

Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu  
130 135 140

Arg Arg Lys Arg Arg Lys Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp  
145 150 155 160

Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly  
165 170 175

Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala  
180 185 190

His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg  
195 200 205

Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val  
210 215 220

Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile  
225 230 235 240

Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala  
245 250 255

Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr  
260 265 270

Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly  
275 280 285

Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg  
290 295 300

Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe  
305 310 315 320

Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala  
325 330 335

Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly  
340 345 350

Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile  
355 360 365

Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys

ES 2 796 623 T3

370

375

380

Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr  
385 390 395 400

Ser Ser Pro Leu Lys  
405

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un transportador y un polipéptido para uso en terapia donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de homología con la SEQ ID NO. 12, donde el polipéptido:
- (i) tiene actividad catalítica reducida;
  - (ii) es capaz de unirse a un inhibidor del factor Xa; y
  - (iii) no puede ensamblarse en el complejo de protrombinasa.
2. Una composición farmacéutica que comprende un transportador y un polipéptido bicatenario para uso en terapia donde el polipéptido bicatenario comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de homología con la SEQ ID NO.13, donde el polipéptido:
- (i) tiene actividad catalítica reducida;
  - (ii) es capaz de unirse a un inhibidor del factor Xa; y
  - (iii) no puede ensamblarse en el complejo de protrombinasa.
3. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 2, donde el polipéptido bicatenario comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de homología con la SEQ ID NO: 13.
4. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 2, donde el polipéptido bicatenario comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95% de homología con la SEQ ID NO: 13.
5. Una composición farmacéutica que comprende un transportador y un polipéptido para uso en terapia donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de homología con la SEQ ID NO. 15, y que no incluye una cadena ligera de factor Xa pero contiene un dominio catalítico de serina proteasa presente en la cadena pesada, donde el polipéptido (i) tiene actividad catalítica reducida; y (ii) es capaz de unirse a un inhibidor del factor Xa.
6. Una composición farmacéutica que comprende un transportador y un polipéptido para uso en terapia donde el polipéptido comprende un fragmento de cadena ligera de fXa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.14 y un fragmento de cadena pesada de fXa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 15.
7. Un polipéptido adecuado para uso en administración parenteral que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de homología con la SEQ ID NO. 12, donde el polipéptido:
- (i) tiene actividad catalítica reducida;
  - (ii) es capaz de unirse a un inhibidor del factor Xa;
  - (iii) no puede ensamblarse en el complejo de protrombinasa; y
  - (iv) comprende un dominio Gla modificado que carece de los residuos de aminoácidos 6-39 de la SEQ ID NO. 3.
8. Un polipéptido bicatenario adecuado para uso en administración parenteral que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de homología con la SEQ ID NO. 13, donde el polipéptido:
- (i) tiene actividad catalítica reducida;
  - (ii) es capaz de unirse a un inhibidor del factor Xa;
  - (iii) no puede ensamblarse en el complejo de protrombinasa; y
  - (iv) comprende un dominio Gla modificado que carece de los residuos de aminoácidos 6-39 de la SEQ ID NO. 3.
9. El polipéptido de la reivindicación 8, donde el polipéptido bicatenario comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de homología con la SEQ ID NO: 13.
10. El polipéptido de la reivindicación 8, donde el polipéptido bicatenario comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95% de homología con la SEQ ID NO: 13.
11. Un polipéptido adecuado para uso en administración parenteral que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de homología con la SEQ ID NO. 15, y que no incluye una cadena ligera de

factor Xa pero contiene un dominio catalítico de serina proteasa presente en la cadena pesada, donde el polipéptido (i) tiene actividad catalítica reducida; y (ii) es capaz de unirse a un inhibidor del factor Xa.

12. Un polipéptido bicatenario que comprende un fragmento de cadena ligera de fXa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.14 y un fragmento de cadena pesada de fXa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 15.
13. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 7-12, para uso en un procedimiento de prevención o reducción de hemorragia en un sujeto sometido a una terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa.
14. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 7-12 para uso en un procedimiento de unión selectivamente e inhibición de un inhibidor del factor Xa administrado de forma exógena en un sujeto sometido a terapia anticoagulante.
15. La composición para uso o el polipéptido de la reivindicación 13 o 14, donde el inhibidor del factor Xa es un inhibidor del factor Xa directo.
16. La composición para uso o el polipéptido de la reivindicación 13 o 14, donde el inhibidor del factor Xa es un inhibidor del factor Xa indirecto.
17. La composición para uso o el polipéptido de la reivindicación 15 o 16, donde el inhibidor del factor Xa se selecciona de entre el grupo que consiste en fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmina, NAP-5, rNAPc2, inhibidor de la ruta del factor tisular, DX-9065a, YM-60828, YM-150, apixaban, rivaroxaban, PD-348292, otamixaban, DU-176b, LY517717, GSK913893, razaxaban, heparina de bajo peso molecular, betrixaban o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y combinaciones de los mismos.
18. La composición para uso o el polipéptido de la reivindicación 17, donde el inhibidor del factor Xa es apixaban, rivaroxaban o betrixaban.

30



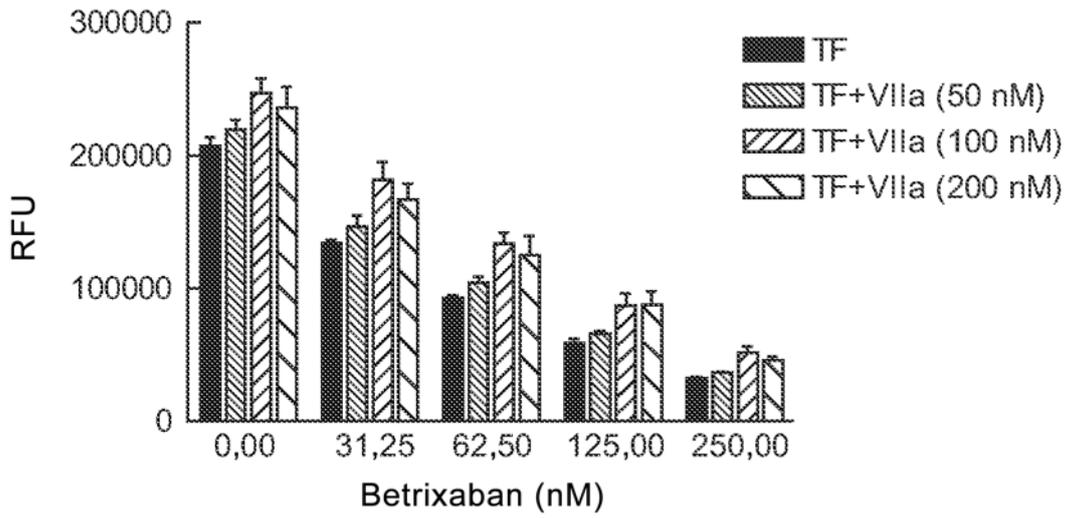


FIG. 4

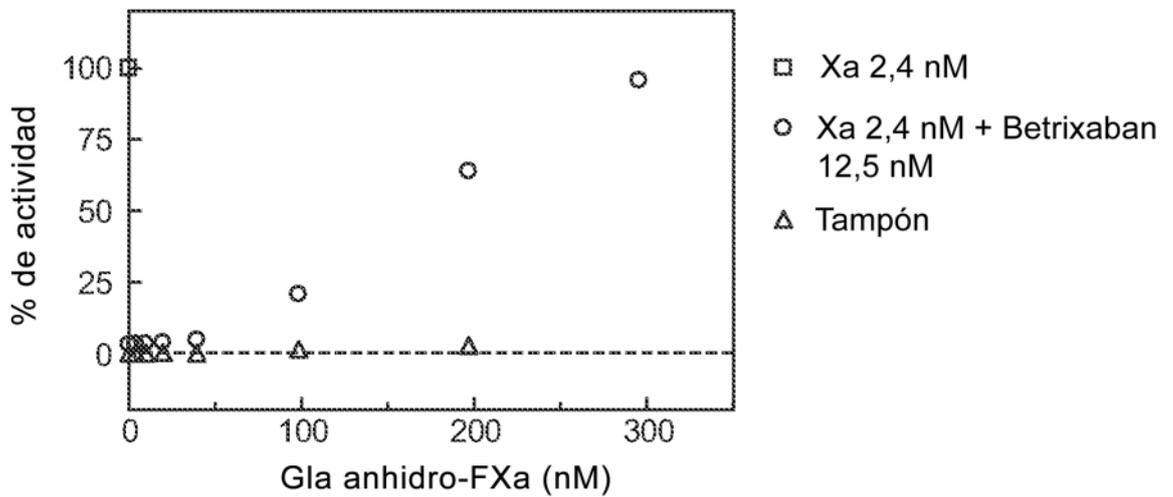


FIG. 5

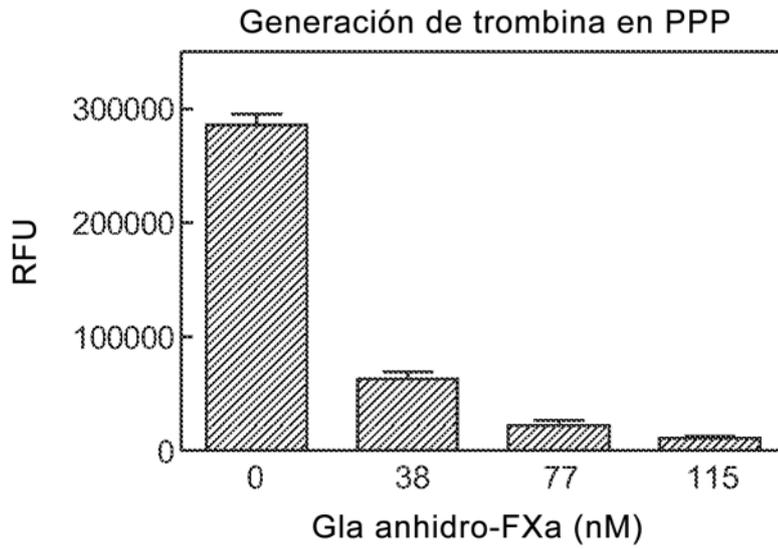


FIG. 6

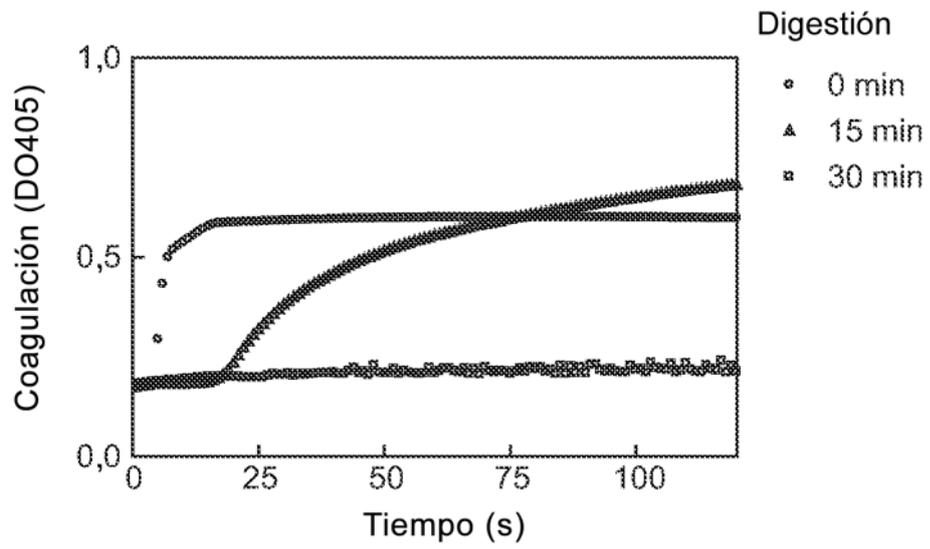


FIG. 7

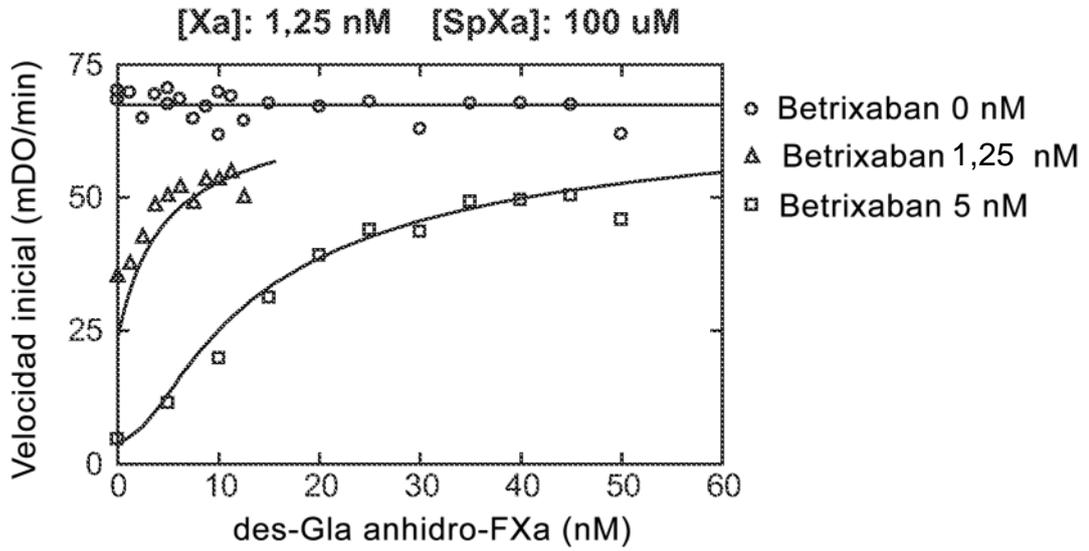


FIG. 8

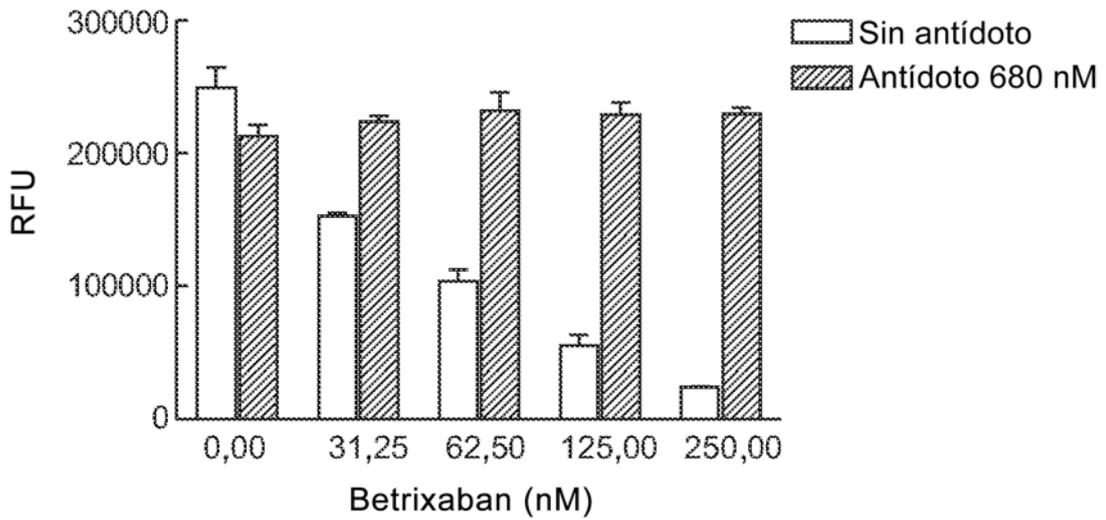


FIG. 9

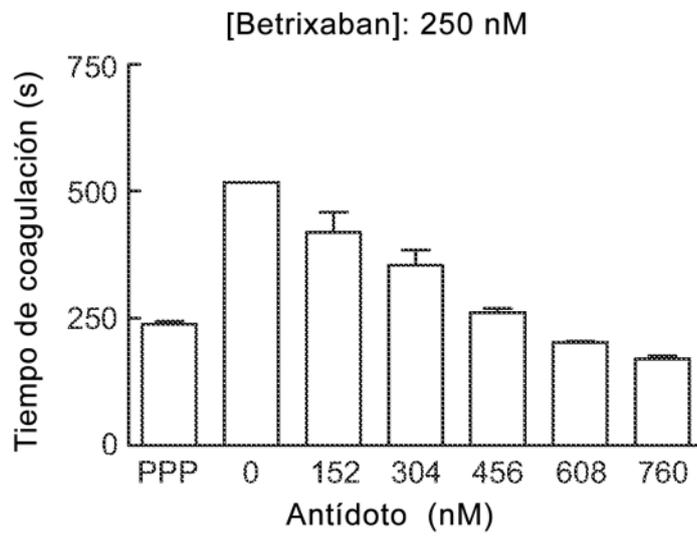


FIG. 10

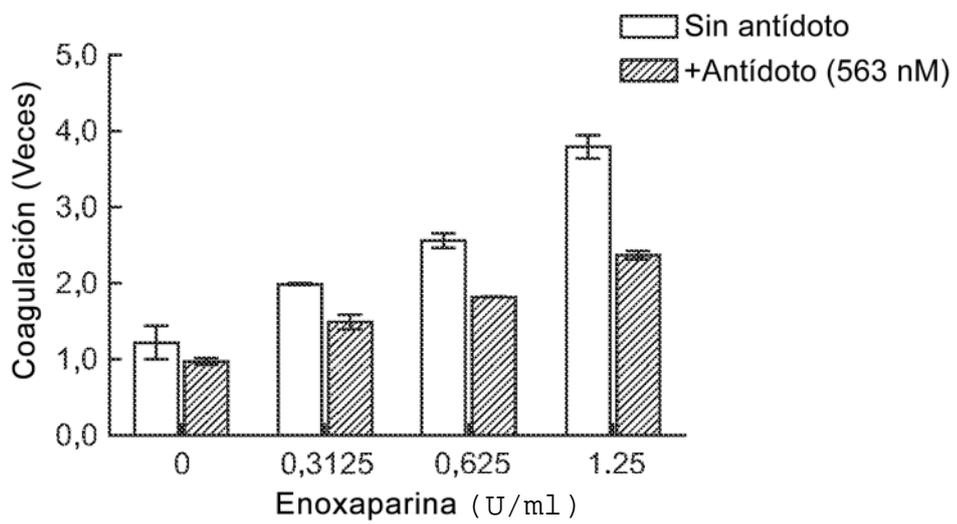


FIG. 11

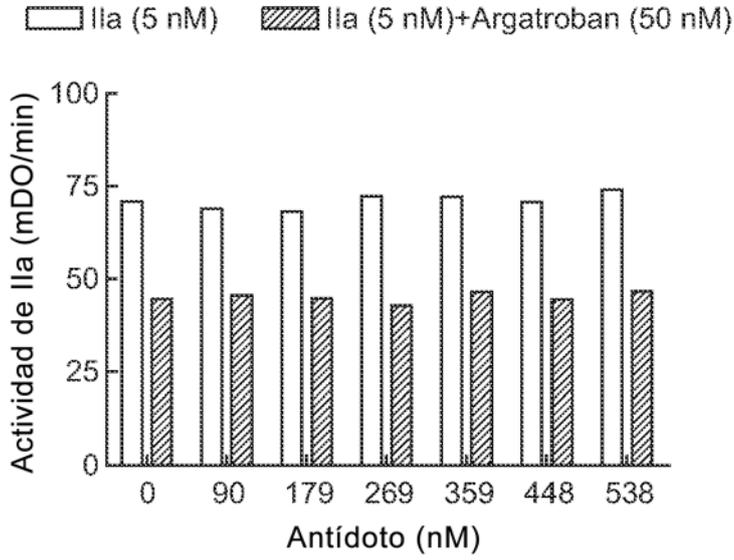


FIG. 12

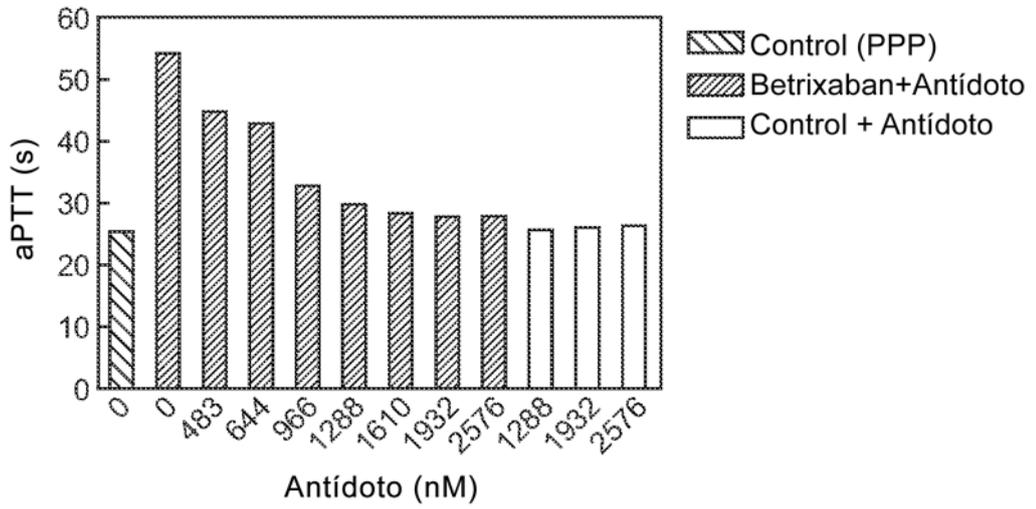


FIG. 13

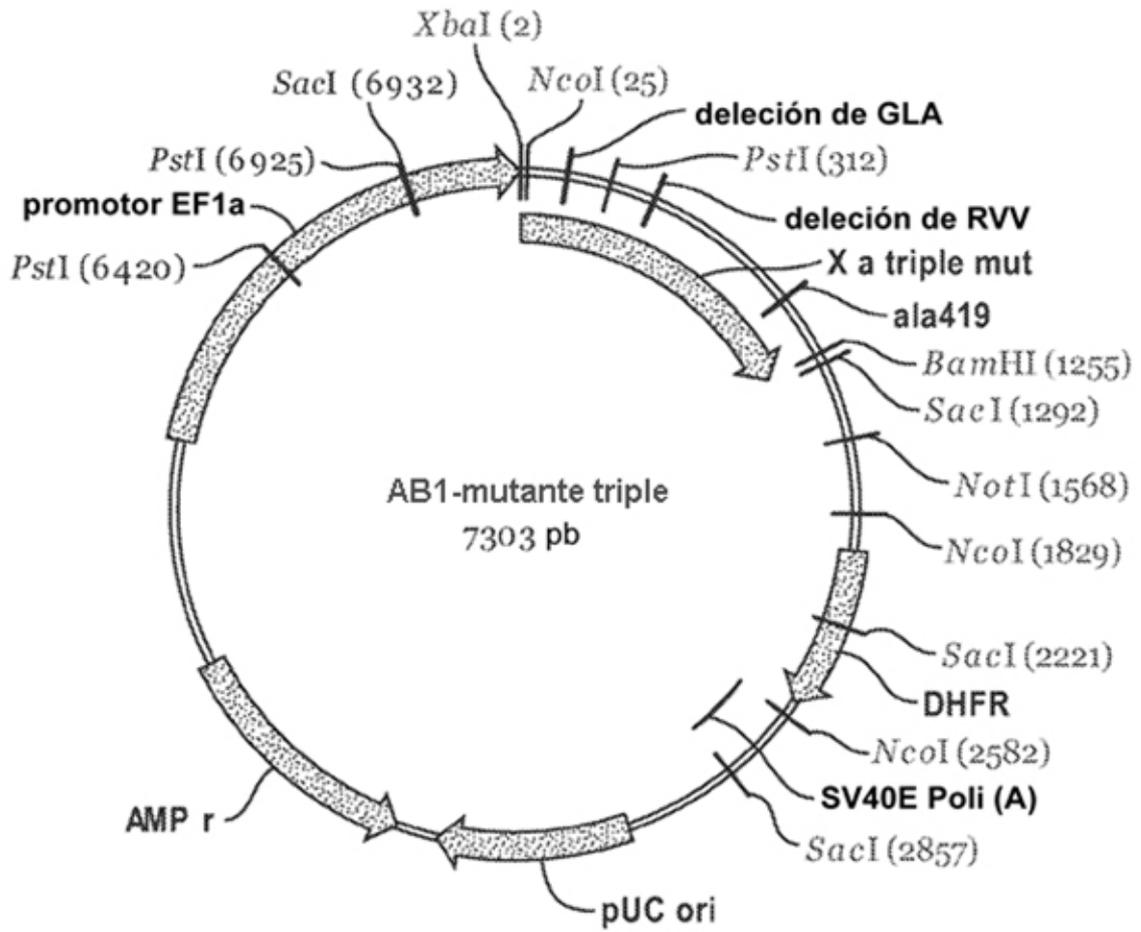


FIG. 14

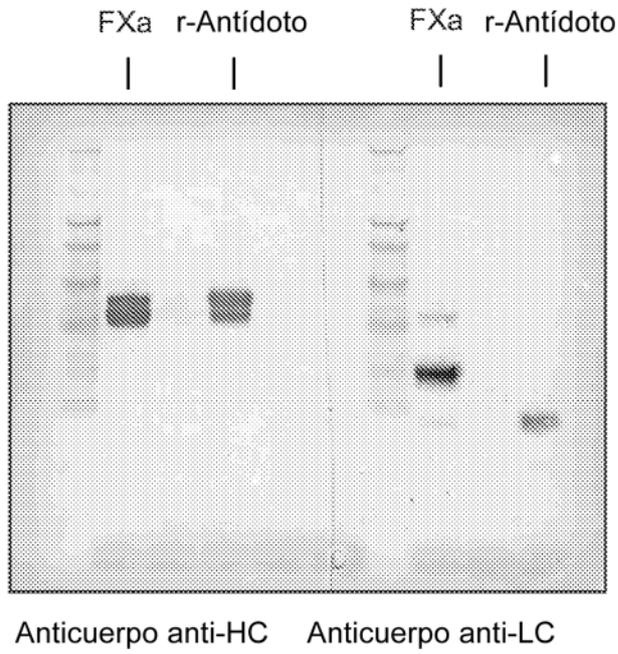


FIG. 15

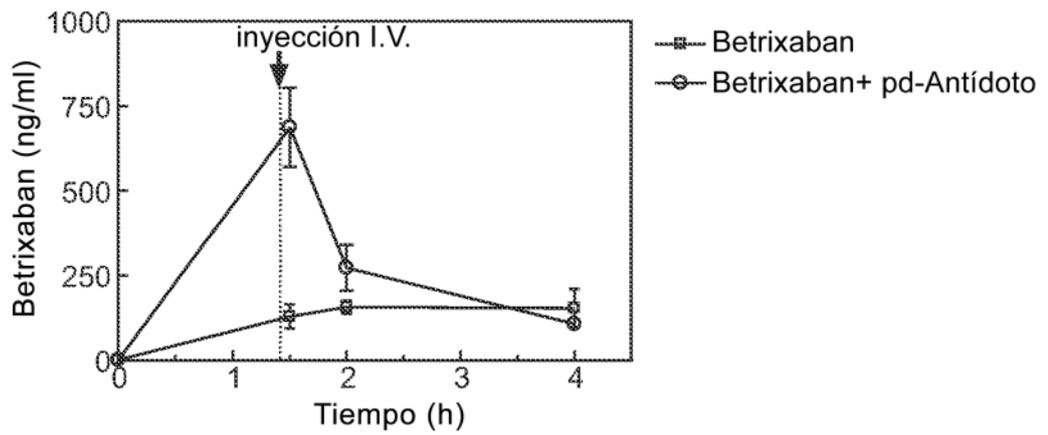


FIG. 16

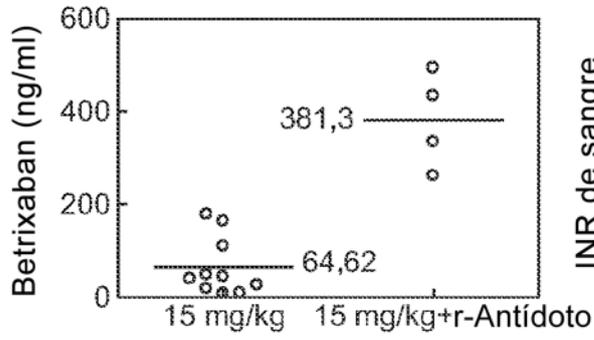


FIG. 17A

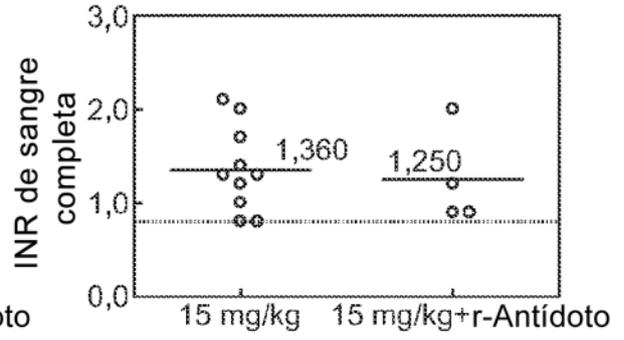


FIG. 17B

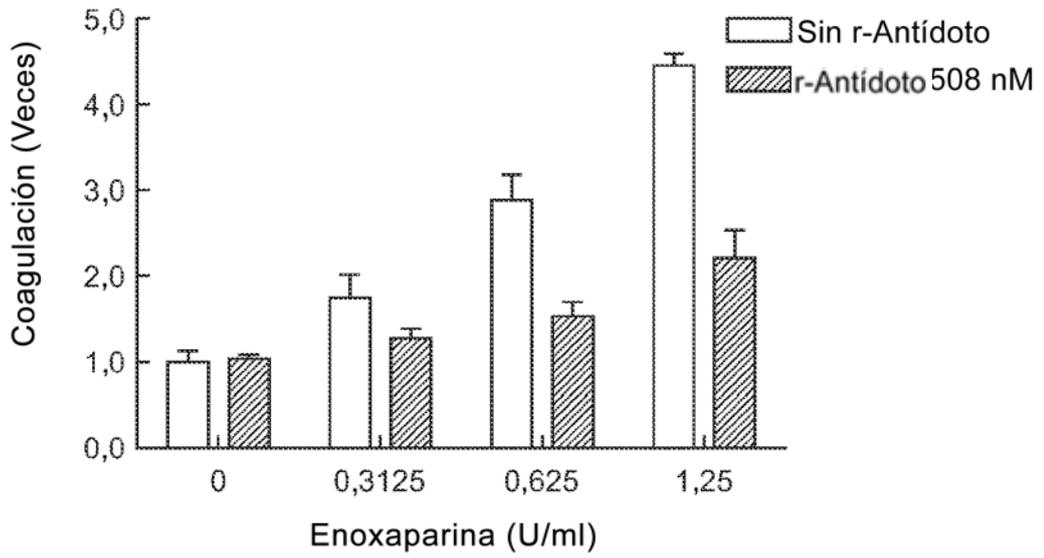


FIG. 18

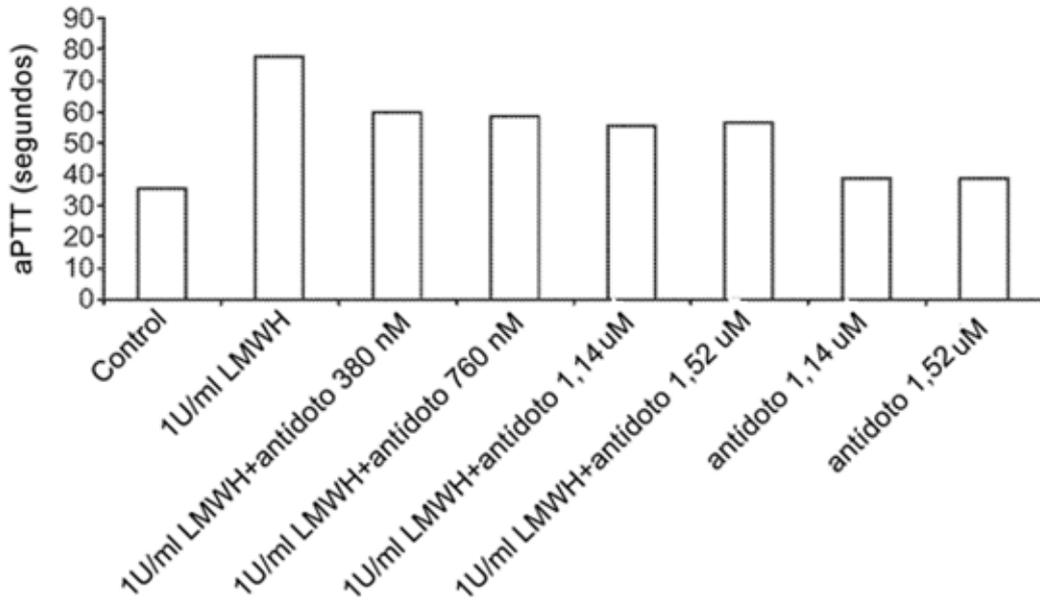


FIG. 19

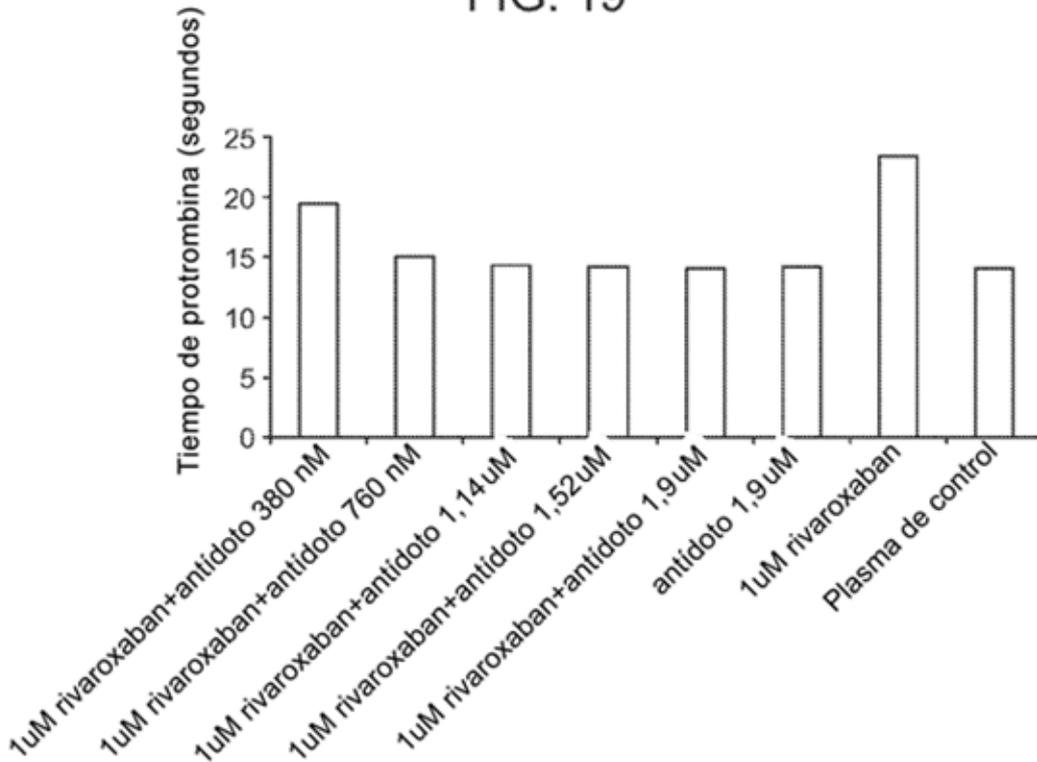


FIG. 20

atgggggcccactgcacctcgtcctgctcagtgccctccctggctggcctcctgctgctc  
 M G R P L H L V L L S A S L A G L L L L  
 ggggaaagtctgttccatccgcagggagcaggccaacaacatcctggcgagggtcacgagg  
 G E S L F I R R E Q A N N I L A R V T R  
 gccaatccctttcttttctggaataaatacaaaagatggcgaccagtgtagaccagtcct  
 A N S F L F W N K Y K D G D Q C E T S P  
 tgccagaaccagggcaaatgtaaagacggcctcggggaatacacctgcacctgtttagaa  
 C Q N Q G K C K D G L G E Y T C T C L E  
 ggattcgaaggcaaaaactgtgaattattcacacggaagctctgcagcctggacaacggg  
 G F E G K N C E L F T R K L C S L D N G  
 gactgtgaccagttctgccacgaggaacagaactctgtgggtgtgctcctgcccggggg  
 D C D Q F C H E E Q N S V V C S C A R G  
 tacacctggctgacaacggcaaggcctgcattcccacagggccctaccctgtgggaaa  
 Y T L A D N G K A C I P T G P Y P C G K  
 cagacctggaacgcaggaagaggaggaagaggatcgtgggaggccaggaatgcaaggac  
 Q T L E R R K R R K R I V G G Q E C K D  
 ggggagtgtccctggcagggccctgctcatcaatgagggaaaacgagggtttctgtgggtgga  
 G E C P W Q A L L I N E E N E G F C G G  
 accattctgagcaggttctacatcctaacggcagcccactgtctctaccaagccaagaga  
 T I L S E F Y I L T A A H C L Y Q A K R  
 ttcaaggtgagggtaggggaccggaacacggagcaggaggagggcggtgaggcggtgac  
 F K V G D R N T E Q E E G G E A V H  
 gaggtggaggtggtcatcaagcacaacgggttcacaaaggagacctatgacttccagtc  
 E V E V V I K H N R F T K E T Y D F D I  
 gccgtgctccggctcaagacccccatcacctccgcgatgaacgtggcgccctgcctgcctc  
 A V L R L K T P I T F R M N V A P A C L  
 cccgagcgtgactgggcccaggtccacgctgatgaagcagaagacggggattgtgagcggc  
 P E R D W A E S T L M T Q K T G I V S G  
 ttggggcgaccccacgagaagggccggcagtcaccaggctcaagatgctggagggtgcc  
 F G R T H E K G R Q S T R L K M L E V P  
 tacgtggaccgcaacagctgcaagctgtccagcagcttccatcatcaccagaaacatgttc  
 Y V D R N S C K L S S S F I I T Q N M F  
 tgtgccggctacgacaccaagcaggaggatgcctgccagggggacgcagggggcccgcac  
 C A G Y D T K Q E D A C Q G D A G G P H  
 gtcaccgccttcaaggacacctacttccgtgacagggcatcgtcagctggggagagggctgt  
 V T R F K D T Y F V T G I V S W G E G C  
 gcccgtaaggggaagtacgggatctacaccaaggtcaccgccttccctcaagtggatcgac  
 A R K G K Y G I Y T K V T A F L K W I D  
 aggtccatgaaaaccaggggcttgcccaggccaagagccatgcccggagggtcataacg  
 R S M K T R G L P K A K S H A P E V I T  
 tcctctccattaaagtga  
 S S P L K -

FIG. 21

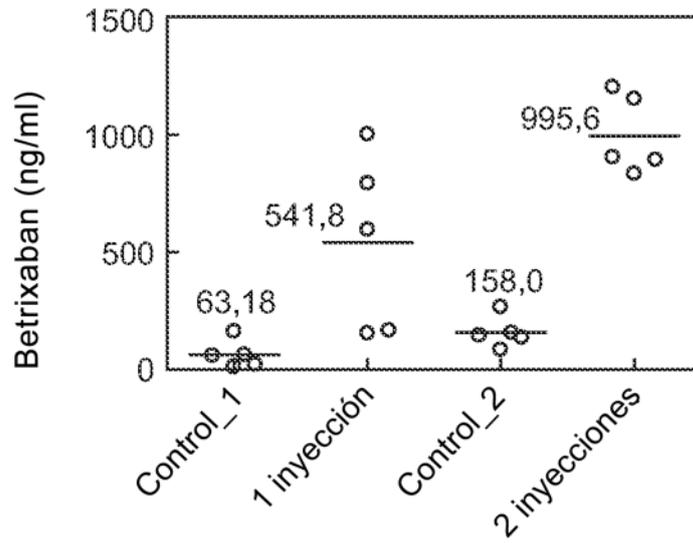


FIG. 22A

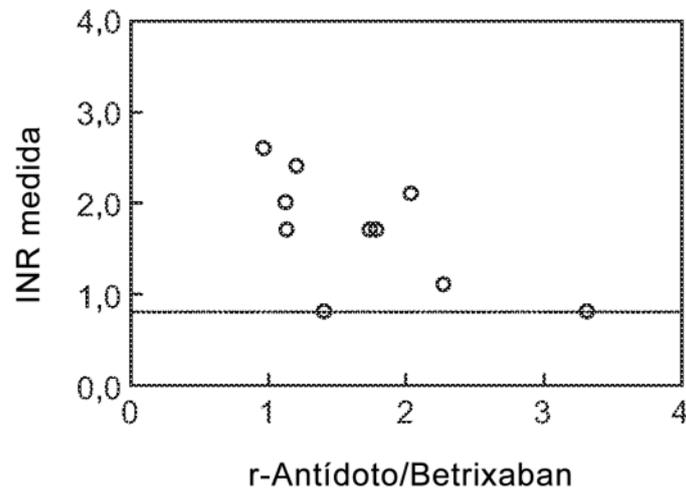


FIG. 22B

FIGURA 23

**Tabla 1 – SEQ ID NO. 1 – Secuencia polipeptídica del factor X humano**

1	MGRPLHLVLL	SASLAGLLLL	GESLFIRREQ	ANNILARVTR	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE
61	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKGDQC	ETSPCQNQGK	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN
121	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVCS	CARGYTLADN	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR
181	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE
241	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE
301	AVHEVEVVIK	HNRFTKETVD	FDIAVLRLLKT	PITFRMNVAP	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI
361	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVVYVDRNSC	KLSSSFIIITQ	NMFCAGYDTK	QEDACQDGS
421	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK	WIDRSMKTRG	LPAKAKSHAPE
481	VITSSPLK					

**Tabla 2 – SEQ ID NO. 2 – Una secuencia de polinucleótidos que codifica el factor X**

1	gactttgctc	cagcagcctg	tcccagtgag	gacagggaca	cagtactcgg	ccacaccatg
61	ggcgcccac	tgcacctcgt	ctgctcagt	gcctccctgg	ctggcctcct	gtgctcggg
121	gaaagtctgt	tcatccgcag	ggagcaggcc	aacaacatcc	tggcgagggt	cacgagggcc
181	aattcctttc	ttgaagagat	gaagaaagga	cacctcgaaa	gagagtgcac	ggaagagacc
241	tgetcatatc	aagagggccc	cgaggtcttt	gaggacagcg	acaagacgaa	tgaattctgg
301	aataaataca	aagatggcga	ccagtgtag	accagtcctt	gccagaacca	gggcaaatgt
361	aaagacggcc	tcggggaata	cacctgcacc	tgtttagaag	gattcgaagg	caaaaactgt
421	gaattattca	cacggaagct	ctgcagcctg	gacaacgggg	actgtgacca	gttctgccac
481	gaggaacaga	actctgtggt	gtgctcctgc	gcccgggggt	acacctggc	tgacaacggc
541	aaggctgca	ttcccacagg	gccctacccc	tgtgggaaac	agacctgga	acgcaggaag
601	aggtcagtg	cccaggccac	cagcagcagc	ggggaggccc	ctgacagcat	cacatggaag
661	ccatatgatg	cagccgacct	ggaccccacc	gagaaccctt	tegacctgct	tgacttcaac
721	cagcagcagc	ctgagagggg	cgacaacaac	ctcaccagga	tcgtgggagg	ccaggaatgc
781	aaggacgggg	agtgtccctg	gcaggccctg	ctcatcaatg	aggaaaacga	gggtttctgt
841	ggtggaacca	ttctgagcga	gttctacatc	ctaacggcag	cccactgtct	ctaccaagcc
901	aagagattca	aggtgagggt	aggggaccgg	aacacgggag	aggaggagg	cggtgaggcg
961	gtgcacgagg	tggagtggt	catcaagcac	aaccggttca	caaaggagac	ctatgacttc
1021	gacatcgccg	tgctccggt	caagaccccc	atcaccttcc	gcatgaacgt	ggcgccctgcc
1081	tgctccccc	agcgtgactg	ggccgagctc	acgctgatga	cgcagaagac	ggggattgtg
1141	agcggcttgc	ggcgaccca	cgagaagggc	cggcagtcca	ccaggctcaa	gatgtggag
1201	gtgccttacg	tggaccgcaa	cagctgcaag	ctgtccagca	gcttcatcat	caccgaaac
1261	atgttctgtg	ccggctacga	caccaagcag	gaggatgcct	gccaggggga	cagcgggggc
1321	ccgcacgtca	cccgttcaa	ggacacctac	ttcgtgacag	gcatcgtcag	ctggggagag
1381	ggctgtgccc	gtaaggggaa	gtacgggac	tacaccaagg	tcaccgcctt	cctcaagtgg
1441	atcgacaggt	ccatgaaaac	caggggcttg	cccaaggcca	agagccatgc	cccggaggtc
1501	ataacgtcct	ctccattaaa	gtgagatccc	actcaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa

**Tabla 3 – SEQ ID NO. 3 – Secuencia polipeptídica del factor X humano maduro**

1	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKGDQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF
181	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETVD	FDIAVLRLLKT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVVYVDRNSC	KLSSSFIIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQDGS	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPAKAKSHAPE	VITSSPLK			

FIGURA 23 (cont.)

**Tabla 4 – SEQ ID NO. 4 – Secuencia polipeptídica del factor Xa sin dominio Gla que carece de los residuos de aminoácidos 1 a 44**

Cadena Ligera						
1					KDGDQC	ETSPCQNQ GK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRK LCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSV VCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER				
Cadena Pesada						
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKET YD	FDIAVLR LKT	PITFRMNVAP
301	ACLP ERD WAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTR LKML	EVPYVDR NSC	KLSSSF IITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGD SG	GPHVTRFKDT	YFVTGIV SWG	EGCARKG KYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

**Tabla 5 – SEQ ID NO. 5 – Secuencia polipeptídica del factor Xa sin dominio Gla que carece de los residuos de aminoácidos 1 a 45**

Cadena Ligera						
1					DGDQC	ETSPCQNQ GK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRK LCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSV VCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER				
Cadena Pesada						
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKET YD	FDIAVLR LKT	PITFRMNVAP
301	ACLP ERD WAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTR LKML	EVPYVDR NSC	KLSSSF IITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGD SG	GPHVTRFKDT	YFVTGIV SWG	EGCARKG KYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

**Tabla 6 – SEQ ID NO. 6 – Secuencia polipeptídica del factor Xa humano activado antes de la post-traduccion de ácido glutámico a ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico**

Cadena Ligera						
1	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGDQC	ETSPCQNQ GK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRK LCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSV VCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER				
Cadena Pesada						
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKET YD	FDIAVLR LKT	PITFRMNVAP
301	ACLP ERD WAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTR LKML	EVPYVDR NSC	KLSSSF IITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGD SG	GPHVTRFKDT	YFVTGIV SWG	EGCARKG KYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

## FIGURA 23 (cont.)

**Tabla 7 – SEQ ID NO. 7 – Secuencia polipeptídica del factor Xa humano activado con post-traducción de ácido glutámico a ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico ( $\gamma$  representa residuo de  $\gamma$ -carboxiglutámico)**

Cadena Ligera	
1	ANSFL $\gamma$ MKK GHL $\gamma$ RYCM $\gamma$ TCSY $\gamma$ AR $\gamma$ V F $\gamma$ DSDKTN $\gamma$ F WNKYKDGQDC ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCs LDNGDCDQFC HEEQNSVVCs CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
Cadena Pesada	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDSG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK

**Tabla 8 – SEQ ID NO. 8 – Secuencia polipeptídica de la cadena ligera del factor Xa humano activado con post-traducción de ácido glutámico a ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico**

Cadena Ligera	
1	ANSFL $\gamma$ MKK GHL $\gamma$ RYCM $\gamma$ TCSY $\gamma$ AR $\gamma$ V F $\gamma$ DSDKTN $\gamma$ F WNKYKDGQDC ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCs LDNGDCDQFC HEEQNSVVCs CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER

**Tabla 9 – SEQ ID NO. 9 – Secuencia polipeptídica de la cadena pesada del factor Xa humano activado**

181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDSG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK

FIGURA 23 (cont.)

**Tabla 10 – SEQ ID NO. 10 – Secuencia polipeptídica del factor Xa anhidro sin dominio Gla (A representa deshidroalanina)**

Cadena Ligera	
1	KDGDQC
ETSPCQNQGK	
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS
CARGYTLADN	
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
Cadena Pesada	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY
ILTAAHCLYQ	
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDIAVLRLKT
PITFRMNVAP	
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC
KLSSSFIITQ	
361	NMFCAGYDTK QEDACQGD <sup>A</sup> G GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG
IYTKVTAFLK	
421	WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK

**Tabla 11 – SEQ ID NO. 11 – Secuencia polipeptídica del Des-Gla fXa-S379**

Cadena Ligera	
1	DGDQC
ETSPCQNQGK	
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS
CARGYTLADN	
121	GKACIPTGPY PCGKQTLER
Cadena Pesada	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY
ILTAAHCLYQ	
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDIAVLRLKT
PITFRMNVAP	
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC
KLSSSFIITQ	
361	NMFCAGYDTK QEDACQGD <sup>A</sup> G GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG
IYTKVTAFLK	
421	WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK

## FIGURA 23 (cont.)

**Tabla 12 – SEQ ID NO. 12 – Secuencia polipeptídica de un mutante triple del factor Xa humano antes de la eliminación del enlazador -RKRRKR-**

Cadena Ligera	
1 ANSFL	F WNKYKGDQC ETSPCQNQGK
61 CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLC	LDNGDCDQFC HEEQNSVCS CARGYTLADN
121 GKACIPTGPY PCGKQTLER	
Enlazador	
RKRRKR	
Cadena Pesada	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETVD	FDIAVLRLKT PITFRMNVAP
301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML	EVPIVDRNSC KLSSSFIITQ
361 NMFCAGYDTK QEDACQGD <b>A</b> G	GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421 WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK	

**Tabla 12a – SEQ ID NO. 12a – Secuencia polipeptídica de un mutante triple del factor Xa humano después de la eliminación del enlazador -RKRRKR-**

Cadena Ligera	
1 ANSFL	F WNKYKGDQC ETSPCQNQGK
61 CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLC	LDNGDCDQFC HEEQNSVCS CARGYTLADN
121 GKACIPTGPY PCGKQTLER	
Cadena Pesada	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETVD	FDIAVLRLKT PITFRMNVAP
301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML	EVPIVDRNSC KLSSSFIITQ
361 NMFCAGYDTK QEDACQGD <b>A</b> G	GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421 WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK	

**Tabla 12b – SEQ ID NO. 12b – Secuencia polipeptídica de un fragmento de cadena ligera del mutante triple del factor Xa después de la secreción**

1 ANSFL	F WNKYKGDQC ETSPCQNQGK
61 CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLC	LDNGDCDQFC HEEQNSVCS CARGYTLADN
121 GKACIPTGPY PCGKQTLER	

**Tabla 12c – SEQ ID NO. 12c – Secuencia polipeptídica de un fragmento de cadena pesada del mutante triple del factor Xa después de la secreción**

Cadena Pesada	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETVD	FDIAVLRLKT PITFRMNVAP
301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML	EVPIVDRNSC KLSSSFIITQ
361 NMFCAGYDTK QEDACQGD <b>A</b> G	GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421 WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK	

**Tabla 19 – SEQ ID NO. 16 – Una secuencia de polinucleótidos que codifica el r-anfidoto (un mutante triple del factor Xa)**

1 ATGGGGCC CACTGCACCT CGTCCTGCTC AGTGCCTCCC TGGCTGGCCT CCTGCTGCTC GGGGAAGTC TGTTCATCCG CAGGGAGCAG GCCAACAA  
 101 TCCTGGCGAG GGTACAGAGG GCCAATTCCT TTCFTTCTG GAATAAATAC AAAGATGGCG ACCAGTGTGA GACCAATCCT TGCCAGAAC AGGGCAAATG  
 201 TAAAGACGGC CTCGGGGAAT ACACCTGCAC CTGTTTAGA GGATTCGAAG GCAAAAACATG TGAATTTATC ACACGGAAGC TCTGCAAGCCT GGAACAAGGG  
 301 GACTGTGACC AGTCTGCGCA CGAGGAACAG AACTCTGTGG TGTGCTCCTG CGCCCGCGG TACACCTGG CTGACAAAGG CAAGGCCTGC ATTCCCACAG  
 401 GGCCTACCC CTGTGGAAA CAGACCCCTGG AACGCAGGA GAGGAGAA AGGATCGTGG GAGGCCAGGA ATGCAAGGAC GGGGAGTGTG CCTGGCAGGC  
 501 CCTGCTATC ARTGAGGAAA ACGAGGGTTT CTGTGTTGGA ACCATTCTGA GCGATTCTA CATCCTAAG GCAGCCACT GTCTCTACCA AGCCAAAGAG  
 601 TTCAAGTGA GGTAGGGGA CCGGAACACG GAGCAGGAG AGGGCGTGA GCGGTGCAC GAGGTGAGG TGGTATCAA GCACAAACCGG TTCACAAAGG  
 701 AGACCTATGA CTTGACATC GCGTGTCTCC GGCTCAAGC CCCCATACC TTCCGATGA ACGTGGCGC TGCTGCTC TCAGAGCCTG ACTGGGCGCA  
 801 GTCACGCTG ATGACGCAGA AGACGGGAT TGTGAGCCGC TTCGGCGGA CCCACAGAA GGGCCGGCAG TCCACAGGC TCAAGATGT GGAGGTGCCC  
 1001 TACGTGACC GCAACAGCTG CAAGCTGTCC AGCAGTTCA TCATCACCA GAACATGTTG TGTGCCGGT ACGACACCA GCAGGAGGAT GCCTGCCAGG  
 1101 GGGACGCAGG GGGCCCGCAC GTCACCCGCT TCAAGGACAC CTACTTCGTG ACAGGCATCG AGAGGAGG AGAGGCTGT GCCCCTAAG GGAAGTACGG  
 1201 GATCTACACC AAGGTACCC CATTCTCAA GTGGATCGAC AGGTCCATGA AAACAGGGG CTTGCCCAAG GCCAAGAGCC ATGCCCGGA GFTCATAACG  
 TAAAGTGA

FIGURA 23 (cont.)

FIGURA 23 (cont.)

Tabla 20 – SEQ ID NO. 18 – Secuencia de polinucleótidos del vector de expresión del r-antidoto

1 TCTAGACACA GTAACGCGCC ACACATGGG GCGCCCACTG CACCTCGTCC TGCTCAGTGC CTCCCTGGCT GGCCTCTGTC TGCTCGGGGA AAGTCTGTTT  
 101 ATCCGAGGG AGCAGGCCAA CAACATCTG GCGAGGTTCA CGAGGGCCAA TTCTTTCTT AATACAAAGA TGCGGCCAG TGTGAGACCA  
 201 GTCTTCTCCA GAACCCAGGC AATGTAAAG ACGGCTCCG GGAAATACAC TGCACCTTT TAGAAGGATT CGAAGCCAAA AACTGTGTAAT TATTACACAG  
 301 GAAGCTCTGC AGCTGGACA ACGGGACTG TGCACAGTG TGCACAGTG TGTGTTGTC TGTGTTGTC TGTGTTGTC TGTGTTGTC TGTGTTGTC  
 401 AAGCCCAAG CTTGCAATTC CACAGGCC CACAGGCC CACAGGCC CACAGGCC CACAGGCC CACAGGCC CACAGGCC CACAGGCC  
 501 AGGACGGGA GTGTCCCTGG GTGTCCCTGG GTGTCCCTGG GTGTCCCTGG GTGTCCCTGG GTGTCCCTGG GTGTCCCTGG GTGTCCCTGG GTGTCCCTGG  
 601 CACTCTCTC TACCAGCCA AGAGTTCAA GGTGAGGTA GGGACCGGA ACACGGGA GGTGAGGCGT GGTGAGGCGT GGTGAGGCGT GGTGAGGCGT  
 701 ATCAAGCACA ACCGGTTTCA AAGGAGACC TATGACTTCG ACATCGCGT GCTCCGGTCC AAGACCCCA TCACCTTCCG CATGAACGTTG GCGCTTGCCT  
 801 GCTTCCCGA GCGTACTGG GCGAGTCCA CGTGAATGC GCAGAGAGC GGGATTGTA CCGGTTGTA CCGGTTGTA CCGGTTGTA CCGGTTGTA  
 901 CAGGCTCAAG ATGCTGGAGG TGCCCTACGT GGACCGAAC AGCTGCAAGC TGTCCAGCAG CTTCATCATC ACCCAGAACA TGTTCCTGTC CGGCTACGAC  
 1001 ACCAAGCAGG AGGATGCTG CCAGGGGAC GCAGGGGAC CCGCTTCAAG CCGCTTCAAG GACACTACT TCGTGAACGG CATCGTCAAG TGGGAGAGG  
 1101 GCTGTCCCG TAAAGGGGAG TACGGATCT ACACCAAGT CACCGCTTC CCAAGTGA TCGACAGGTC CATGAACAAC AGGGCTTGC CCAAGCCAA  
 1201 GAGCCATGCC CCGGAGTCA TACGTCCTC TCCATTAAG TGAGATCCA CTCGGATCC TATTCTATAG TGTCACTAA ATGCTAGAGC TCGCTGATCA  
 1301 GCTTCTAGG TGCCTTCTAG TTGCCAGCA TCTGTGTTT GCTTCTTCC CGTGCCTCC TTGACCTTG AAGTGCAC TCCCACTGC CTTTCTTAT  
 1401 AAATGAGGA AATGCAATG CATGTCTGA GTAGTGTCA TTCTATCTG GGGGTTGGG TGGGCTGGG CAGCARAGG GAGGATTGG AAGACATAG  
 1501 CAGGCAATG GGGATGCGG TGGCTCTAT GCTTCTGAG GCGAAGAA CCAAGTATG CCAAGTATG CCAAGTATG CCAAGTATG CCAAGTATG  
 1601 TGGATGTTG GTCAAGTGG GTGTGGAAG TCCCCAGGCT CCCCAGGAG TAGTCAGCA CCAAGTATG CCAAGTATG CCAAGTATG CCAAGTATG  
 1701 AGTCCCAAG CTCGCCAGCA GGCAGAATG TGCARAGCAT GATCTCAAT TAGTCAGCA CCAAGTATG CCAAGTATG CCAAGTATG CCAAGTATG  
 1801 TCCGCCAGT  
 1901 TGAGGAGGCT TTTTGGAGG CCTAGGCTTT TGCRAAABAG CTAGCTTCC CTGCTCCTC GCTCCATCA TGGTTCGAC ATTGAAGTGC ATCGTCCCG TGTCCRAAA  
 2001 TATGGGATT GGCAGAACG GAGACCTACC CTGGCTCCG CTCAGAACG AGTTCAAGTA CTTCRAAAGA ATGCCACAA CCTTCTCAGT GGAAGTAAA  
 2101 CAGATCTGG TGATTTATGG TAGGAAAAC TGGTTCTCA TTCTGAGAA GAATCGACT TTAAGAGCA GAATTAATAT AGTTCATCAGT AAGAACTCA  
 2201 AAGAACACC ACGAGGAGCT CATTTCTTG CAAAAGTTT GGAATGATCC TTAGACTTGA ACAACAAA GAAATGAGCA AGTAARATAG ACATGTTTGG  
 2301 GATAGTCCGA GCGATTTCTG TTTACAGGA AGCCATGAT CAACAGGCC ACCTTAGACT CTTCAGCA AGAATGAGCA AGAATTTGA AAGTACAGC  
 2401 TTTTCCAG AATTTGATTT GGGAAATAT AAATTTCTC CAGAAATACC AGGGTCTC TCTGAGTCC AGGAGAAA CCAATGGACT TTTGCTGGCT  
 2501 AAGTCTACGA GAAAGAGC TAAAGGAG ATGCTTCAA GTTCTCTGCT CCCCCTCAA AGTATGAT TTTTATAAGA CCATGGGACT TTTGCTGGCT  
 2601 TTAGATCCCG CCGAGATCCA GACATGATA TGNATTTGGA CABACCACA CTAGATGCA GTGAAAATA TGTCTTATTT GTGAATTTG  
 2701 TGAATCTATT GCTTATTTG TAACRTAT AAGTGCAT AAACAAGTA ACAACAAA TTGCATTCAT TTTATCTTT AGGTTACGG SCAGCTGG  
 2801 GAGGTTTAT AAAGCAAGTA AAATCTAC AAATGATGA TGGCTGATTA TGACTCCAG CTTTGTCTCC TTTTAGTAG GGTATATGC GCGTGGG  
 2901 TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCGTGTTGA AATTTGTTA CCGTCAAAAT TCCACAAAC ATACCAGCCG GAAGCTAAA GTGTAAAGCC TGGGTTGCT  
 3001 AATGAGTGG CTAATCTACA TTAATTTGCT TCGCTCACT GCGCTCTTC CAGTCCGAA ACCTGTGTC CCAGCTGCAT TAATGAATCC GCCRAAGCC  
 3101 GGGGAGGCG GTTTGCGTA TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACT ACTGCTGG CTGCTGCTG GAGCTGGG GAGGCTGATC AACTCAGCT  
 3201 AAGGCGTAA TACGGTTATC CACAAATCA GGGATAAC CAGGAAGAA CATGTGAGCA AAGGCCAC AAGCCGTA AAGCCGTA AAGTACCA  
 3301 TGTGCGGTT TTTCCATAG CTCGCCCC CTGACAGCA TCAAAAAT CGAGCTCA GTCAGAGTTG GCGAACCAG ACAGACTAT AAGATACCA  
 3401 GCGGTTTCC CTTGGAAGCT CCTCGTGG CTCTCTGTC GAGTCTGTC CCGTACCGG ATACTGTC ATACTGTC CTTCCGGAA CTTCCGGCT  
 3501 TCTCATAGCT CAGCTGTAG TATCTCAGT TCGTCTAG TCGTCTAG TCGTCTAG TCGTCTAG TCGTCTAG TCGTCTAG TCGTCTAG  
 3601 TATCCGGTAA CTATGCTTT GAGTCTAAC CCGTAAACA CCGACTTAT CCGACTTAT CCGACTTAT CCGACTTAT CCGACTTAT CCGACTTAT  
 3701 CCGTCTACA GAGTCTTGA AGTGTGCTC TAACTACGG TAACTACGG TAACTACGG TAACTACGG TAACTACGG TAACTACGG TAACTACGG  
 3801 AAGATTGGTA GCTCTTATC CCGCAACA ACCACCGCT GTAGCGGTG TTTTGTGTT TGCAGCAGC AATTTAGCC CAGAAAAAA GATCTCAG

FIGURA 23 (cont.)

3901 AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGTCTG ACGGTCACTG GAACGAAAC TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA TCARAAAGGA TCTTACACCTA  
 4001 GATCCTTTTA AATTAATAAT GAAGTTTAA AGTATATAT AGTAACTTG AGTACACAGT TACCRATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC  
 4101 TCAGCGATCT GCTCTATTTC TTTCATCCATA GTTGCCTGAG TCCCTCTGCT GTAGATACT ACATACACGG AGGCTATPACC ATCTGGCCCC AGTGCCTCAA  
 4201 TGATACCCGG AGACCCACGC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG GAAGGCCCGA GGGCAGAACT GGTCTTGCAA CTTTATCCGG  
 4301 CTCATCTCCAG TCTATTAATTT GTTCCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCCG CAGTTAATAG TTTCGCAAC TTGCTACAGG CATGTGGTG  
 4401 TCAGCTCTGT CGTTTGGTAT GGCCTCATTC AGCTCCGGTT CCCAAGATC AGSCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAARAAAGG GTTAGCTCTT  
 4501 TCGTCTCTCC GATCGTTTGC AGAAGTAACT TGGCCCGACT GTTATCACTC ATGCTTATGG CAGCACTGCA TAATTTCTCT ACTGTCAAG CATCCGTAAG  
 4601 ATGCTTTTCT GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCAATC TGAGATATGT GTATGCGCG ACCGAGTTGC TCTTGGCCCC CGTCAATPAG GGTAAATPACC  
 4701 GCGCCACATA GCGAAGCTTT AAGAGTCTC AATCATTTGA AACGTTTTC GGGCGAAA CTCTCAAGG TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT  
 4801 AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCCACAGC GTTCTGGGT GAGCAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCA AARAGGGAAT  
 4901 AAGCCGACA CGGAATGTT GAATACTCAT ACTCTCTCTT TTTCAATAT AITGACCCT TATCAGGCT TATTTCTCA TGAGCCGATA CATATTTGA  
 5001 TGTATTTAGA AAATAAACA AATAGGGGTT CCGGCACAT TTCCCGAAA AGTCCCACT GGAATTTGT AAACGTTAAT ATTTTGTAA AATTCGCTT  
 5101 AATTTTGT TAAATCAGCT CATTTTAAAG AACCTGACT CCATCCGAA AATCCCTTA TAAATCAAA GAATPACCC AGATAGGGT GAGTGTGTT  
 5201 CCAGTTTGA ACAGAGTCC ACTATTAAG AGCTGAGCT CCAACCTCA AGGCGAAA ACCGCTATC AGGCGATGG CCCACTAGT GAACCATCAC  
 5301 CCTAATCAAG TTTTITGGG TCGAGGTGCC GTRAGCACT AATCCGAA CTTAAAGGA CCCCAGAT TAGAGCTGA CGGGAAAGC CGGGAAAGT  
 5401 GCGGAAAG GAAGGAAGA AAGCAAGG AGCGGCGT AGCGGCTGG CAAGTGTAGC GGTACGCTG CCGTAAACA CCACACCCG CCGCTTAAT  
 5501 GCGCCGCTAC AGGGCGCTC CCGCCATCG CCATTCAGC TCGCAACTG TTGGGAAGG CGATCGTGC GGGCTTTC GCTPATACC CAGTGGGA  
 5601 AAGGGGATG TGTGCAAG CGATTAAGT GGTAAACGC AGGTTTTC CAGTCAAGC GATCAAGC GACGGCAGT GAGCGCGT AATCAGACT  
 5701 ACTATPAGGC GAATTTGAA TAAATCCGTG GGTGAGACC CCGAGAGMA GAGCTCTAG GATTTGTCC CGGACTPAG AGATGGCAAG CTTGAGGACG  
 5801 GGAGGCTGAT TGAGAGCGGA AGTACACCC TAAATCAAT ACAACCTTTG GAGCTAACC GAGCTAAGC AGCAATGTA GAGGAAAGT TCAGCAACCT CTTCCAGGC  
 5901 GGCCTCCCG TCACCACCA CCCCACCCG CCGGACCG AGCTGAGAT AATTCATA AAAGACTCG CCCCTGCTT GGGAAATCC AGGACCTGC  
 6001 GTTAACTCC CACTAACGTA GAACCCAG AGTCCGCTG TCCCGCCCC TCACCCGCTC AGTTGGGG AGGCTCGC TCACTGAGT GGAAGAGAG ATGCGTGAGG  
 6201 GGGTAACT GGGAAAGTGA TGTCTGTAT TGGCTCCGC TTTTTCGGA GGTGGGGGA GAACGTATA TAAATGAGT AGTCCGCTG AACGTTCTTT  
 6301 TTCGAACCG GTTTCCGCC AGAACACAG TAAATGCGT GTGTGGTT CCGGGGCTG CCGCTTTTAC GGTATGGC CTTTCCGCTG CTTGAAATAC  
 6401 TTCACGCCCT CTGGCTGCAG TACGTGATC TTGATCCCGA GCTTCGGGT GAAAGTGGT GGGAGATTC GAGGCTTGC GCTTAAAGG CCCCTTCCG  
 6501 TCGTCTTGA GTTGGCCCT GGTGTGGCG CTGGGCCG CCGAGATAG TCTTGTAAAT GCTTGTGCA ATCTGCAAC TGGTATTTCC GTTTTGGGG  
 6601 ATTTAAATTT TTTGATGACC TGTCTGCAG CTTTTTTCT GSCAAGATAG TCTTGTAAAT GCGGCCAAG ACCGAAATC GACCGGGT AGTCTCAAG  
 6701 CCGCGGGCG CGACGGGCC CGTGGCTCC AGCCACATG TTCCGGGAGG CCGGGCTGC GAGCCGGCC ACCGAAATC GACCGGGT AGTCTCAAG  
 6801 TGCCGGCTT GCTCTGGTGC CTGGCTCCG CCGCGCTG ATCCGCCCG CCGTGGCG AAGGCTGGC CCGTCCGCA CAGTTGCTG AGCGAAAGA  
 6901 TGGCGCTTC CCGCCCTGC TGCAGGAGC TCAATGGA GACCGGGCG CTCGGAGAG CCGCGGGTG AGTCAACCA AARAGGAAA AGGCGCTTC  
 7001 GTCCTCAG CGTGTCTCA TGTACTTCA CCGAGTCC GCGCCCTCC AGCACCTCG ATTAGTCTC AGGACTTGG AGTACGCTGT CTTTATGTTT  
 7101 GGGGAGGGG TTTTATGGA TGGAGTTTC CCACACTAG TGGTGGGA CTGAAGTAT GCCAGCTGG CACTGATGT AATCTCTCTT GGAATTTGCC  
 7201 CTTTGTGAT TTGGATCTTG GTTCATCTC AAGCCCTAGA CASTGGTCA AAGTTTTTTT CTTCCATTTT AGGTGCTGT AARACTACC CTAARAGCCA  
 7301 AAT