

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 440**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C07K 14/46 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2015** **PCT/NL2015/050377**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015** **WO15183085**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2015** **E 15731411 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020** **EP 3149163**

54 Título: **Proteínas prohemostáticas para el tratamiento del sangrado**

30 Prioridad:

26.05.2014 EP 14169895

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

23.03.2021

73 Titular/es:

ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (100.0%)
Albinusdreef 2
2333 ZA Leiden, NL

72 Inventor/es:

VERHOEF, DANIËL;
REITSMA, PIETER H. y
BOS, METTINE H.A.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 813 440 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas prohemostáticas para el tratamiento del sangrado

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo del tratamiento médico. En particular, la invención se encuentra en el campo del tratamiento, prevención o mejora de las complicaciones hemorrágicas que resultan de una respuesta hemostática modulada.

Estado de la técnica

10 Millones de pacientes en todo el mundo necesitan fármacos anticoagulantes para el manejo profiláctico del accidente cerebrovascular en la fibrilación auricular o la prevención y el tratamiento de la trombosis venosa. La profilaxis se centra tradicionalmente en los antagonistas de la vitamina K (VKA) anticoagulantes orales a base de cumarina, tales como la warfarina, el acenocumarol y el fenprocumón, que bloquean la síntesis de factores de coagulación sanguínea dependientes de la vitamina K. Otros fármacos anticoagulantes incluyen anticoagulantes específicos para diana tales como dabigatrán, que inhiben la enzima trombina, que es una serina proteasa que convierte el fibrinógeno soluble en hebras insolubles de fibrina. La reversión eficaz del efecto anticoagulante, con el llamado antídoto, es un requisito previo para el uso seguro de fármacos. Esto es particularmente importante considerando que, solo en los Países Bajos, anualmente más de 10,000 pacientes tratados con anticoagulantes sufren un episodio hemorrágico grave adverso, que incluye hasta 2,000 muertes (Adriaansen H., et al: "Samenvatting Medische Jaarverslagen van de Federatie van Nederlandse Trombosediensten", 2011; 1-44).

20 Los pares anticoagulante-antídoto actualmente disponibles para prevenir la sobre-anticoagulación son heparina-protamina y warfarina-vitamina K. Concentrados de complejo de protrombina (PCC) que contiene los factores de coagulación dependientes de vitamina K II, IX, X (PCC de 3 factores) o II, VII, IX, X (PCC de 4 factores) y cantidades variables de proteínas C y S se han indicado para revertir los efectos relacionados con la warfarina (véase, por ejemplo, Frumkin, Ann Emerg Med, 2013, 62: 616-626). El plasma fresco congelado y el factor VIIa recombinante (rFVIIa) también se han usado como antídoto inespecífico en pacientes sometidos a tratamiento con heparina de bajo peso molecular, que sufren un traumatismo mayor o hemorragia grave (Lauritzen et al., 2005. Blood 106: Abstract 2149, 607A-608A). También se describen fragmentos de protamina (Patente de los Estados Unidos No. 6,624,141) y péptidos sintéticos pequeños (Patente de los Estados Unidos No. 6,200,955) como heparina o antídotos de heparina de bajo peso molecular; y muteína de trombina (Patente de los Estados Unidos No. 6,060,300) como antídotos para inhibidores de trombina. Se ha informado que los productos intermedios y derivados de la protrombina son antídotos para la hirudina y otros inhibidores de la trombina (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,817,309 y 6,086,871). A pesar de la ausencia de datos clínicos sólidos, la hemorragia grave asociada a dabigatrán se trata preferiblemente con el concentrado de complejo de protrombina activado por agente de reversión inespecífico (APCC) (Siegal et al., 2014. Blood 123: 1152-1158).

35 Los inhibidores directos del factor Xa (FXa) (DFXI) recientemente desarrollados, tales como rivaroxaban, apixaban y edoxaban, son anticoagulantes y pueden reemplazar en gran medida a los VKA clásicos en un futuro cercano debido a su rápida eficacia terapéutica, facilidad de dosificación y falta de requisitos de seguimiento debido a una menor cantidad de interacciones de fármacos y alimentos y una farmacocinética predecible. Los DFXI son pequeños compuestos inhibidores que se han diseñado específicamente para unirse estrechamente y detener la actividad del FXa de coagulación sanguínea. El FXa de coagulación es una serina proteasa esencial que normalmente circula inactiva por el factor X de coagulación (FX) de la proteína de ~ 60 kDa (zymogen) en la sangre, pero se convierte en el daño vascular a su forma de proteasa activa en una serie compleja de etapas de activación de proteínas, colectivamente conocida como cascada de coagulación sanguínea. Es fundamental para este sistema la formación del complejo cofactor-proteasa conocido como complejo protrombinasa que consiste en el FXa de coagulación en asociación con el cofactor factor Va (FVa), que se ensambla exclusivamente en una membrana fosfolipídica cargada negativamente y convierte la protrombina inactiva en la trombina serina proteasa activa.

45 Un inconveniente principal del uso de los DFXI es la ausencia de una estrategia de reversión específica y adecuada para prevenir y detener las posibles complicaciones hemorrágicas que amenazan la vida asociadas con su terapia anticoagulante.

50 Dado que los DFXI inhiben la coagulación de la protrombinasa tanto libre como unida FXa (European Medicines Agency, 2008. CHMP assessment report for Xarelto, Procedure No. EMEA/H/C/000944. Doc.Ref.: EMEA/543519/2008), restablecimiento eficaz de la hemostasia normal requeriría, por lo tanto, la sustitución completa del FXa de coagulación circulante o la eliminación eficaz de los compuestos inhibidores de la sangre.

55 Actualmente, no hay disponibles estrategias de reversión específicas para prevenir y detener las posibles complicaciones hemorrágicas que amenazan la vida asociadas con el tratamiento con DFXI. Además de las terapias quirúrgicas y de soporte vital, la terapia de reversión inespecífica que usa PCC de 3 y 4 factores se puede considerar en base a evidencia limitada (Siegal et al., 2014. Blood 123: 1152-1158; Levi et al., 2014. J Thrombosis Haemostasis, Published online 8 May 2014; doi: 10.1111/jth.12599). Una estrategia de reversión específica para el sangrado asociado a DFXI es un desarrollo, que se basa en una forma catalíticamente inactiva de FXa recombinante (receptor de andexanet) que sirve como señuelo

para los DFXI al unirse y atrapar así los DFXI circulantes, lo que permite que el FXa de coagulación endógena que participe normalmente en la coagulación (Lu et al., 2013. *Nature Medicine* 19: 446). Una desventaja de este enfoque es que se deben administrar dosis altas de andexanet alfa ya que se requieren concentraciones estequiométricas para lograr la inhibición (400 mg de bolo IV en el ensayo de fase 3; Portola News Release March 19, 2014). Adicionalmente, dado que la semivida de DFXI depende parcialmente del aclaramiento renal, la cantidad de FXa señuelo necesaria para atrapar todas las moléculas inhibitoras circulantes puede ser incluso mayor en caso de insuficiencia renal. Esta estrategia de reversión no proporciona una respuesta procoagulante rápida y directa, ya que la respuesta depende de la generación de FXa de coagulación endógena, libre.

En este momento, no se dispone de una estrategia adecuada de reversión directa para prevenir y detener posibles complicaciones hemorrágicas potencialmente mortales asociadas con la terapia anticoagulante DFXI.

La presente invención resuelve este problema proporcionando, como una estrategia de reversión adecuada para prevenir y detener posibles complicaciones hemorrágicas potencialmente mortales asociadas con la terapia anticoagulante DFXI, las proteínas recombinantes que comprenden un polipéptido del factor Xa de coagulación, teniendo dicho polipéptido una alteración en el región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1, preferiblemente entre His-311 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1, cuya proteína alterada tiene una sensibilidad disminuida a la inhibición por un inhibidor directo del factor Xa, en la que la alteración es una inserción de 1-50 residuos de aminoácidos. Para fines de aclaración, la numeración de los residuos de aminoácidos se basa en la secuencia de aminoácidos del FX de coagulación humana como se proporciona en la SEQ ID NO: 1.

Se encontró que un FXa de coagulación humana catalíticamente activo, con una composición de aminoácidos alterada en una región entre Gly y Asp correspondiente a Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1, participa en la cascada de coagulación como un procoagulante, en el que dicho factor tiene una menor sensibilidad a la inhibición por DFXI, en comparación con un FXa de coagulación que no tiene dicha composición de aminoácidos alterada. Por lo tanto, se proporciona un antídoto procoagulante que no depende de la generación de FXa de coagulación endógena, libre y ofrece una estrategia de reversión rápida y directa para prevenir y detener las complicaciones asociadas con la terapia anticoagulante DFXI.

La secuencia de aminoácidos de FX de coagulación humana se proporciona en SEQ ID NO: 1 y se puede encontrar en GENBANK® bajo "AAH46125.1" en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAH46125.1>>. La numeración de residuos de aminoácidos en esta secuencia se basa en la secuencia de FX de coagulación humana. El FX de coagulación con la secuencia enumerada en SEQ ID NO: 1 es un precursor que contiene una secuencia prepro-líder (residuos de aminoácidos 1 a 40 de SEQ ID NO: 1), seguida de secuencias correspondientes a una cadena ligera de FX de coagulación (residuos de aminoácidos 41 a 179 de SEQ ID NO: 1), un triplete RKR (residuos de aminoácidos 180 a 182 de SEQ ID NO: 1) que se elimina durante la secreción del FX de coagulación, y una cadena pesada de FX de coagulación (residuos de aminoácidos 183 a 488 de SEQ ID NO: 1) que contiene el péptido de activación (AP) (residuos de aminoácidos 183 a 234 de SEQ ID NO: 1) y el dominio de serina proteasa catalítica (residuos de aminoácidos 235 a 488 de SEQ ID NO: 1).

La maduración del FX de coagulación humano implica, entre otras cosas, la escisión proteolítica y la modificación postraducciona en el aparato de Golgi. La proteína FX madura es una molécula de dos cadenas, compuesta por una cadena ligera y una pesada que están unidas por un enlace disulfuro (Uprichard et al., 2002. *Blood Reviews* 16: 97-110). El FX de coagulación humano maduro se activa mediante la escisión de un enlace peptídico en la cadena pesada entre Arg-234 e Ile-235 de SEQ ID NO: 1, liberando así un péptido de activación de 52 residuos de la cadena pesada del FX de coagulación. La cadena ligera unida por disulfuro resultante y la cadena pesada truncada constituyen un polipéptido de FXa activado.

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de FXa de coagulación humana se proporciona en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de FXa de coagulación humana se proporciona en la SEQ ID NO: 3.

El término "recombinante", como se usa en este documento, se refiere a una proteína que se produce usando técnicas de ADN recombinante conocidas por los expertos en la técnica. Un polipéptido de FX o FXa de coagulación recombinante también se indica como rFX o rFXa. Una proteína recombinante preferiblemente no es idéntica a una proteína nativa, por ejemplo porque la composición de aminoácidos difiere y/o debido a una diferencia en la modificación postraducciona tal como glicosilación.

El término "alteración", como se usa en este documento, se refiere a una inserción y/o reemplazo y/o eliminación de al menos un residuo de aminoácido. Preferiblemente, dicha alteración es una inserción de al menos un aminoácido.

La frase "proteína recombinante que comprende un polipéptido de FXa de coagulación", como se usa en este documento, pretende abarcar una proteína que comprende un polipéptido de FXa de coagulación recombinante, preferiblemente de mamífero, más preferiblemente de primate y más preferiblemente de origen humano. La frase incluye, por ejemplo, una proteína precursora de mamífero recombinante, tal como FX de coagulación humana, que se procesa y/o activa en un polipéptido rFXa de coagulación de mamífero. De este modo, una proteína de la invención es preferiblemente un mamífero recombinante, preferiblemente un primate, más preferiblemente un FX de coagulación humano, que tiene una inserción de 1-50 residuos de aminoácidos en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1, preferiblemente entre Glu-297 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1, más

preferiblemente entre Val-305 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 y más preferiblemente entre His-311 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1. Además, dicha frase incluye una proteína que comprende una o más secuencias de aminoácidos adicionales, además del polipéptido rFXa de coagulación, por ejemplo una secuencia de aminoácidos que constituye una etiqueta, por ejemplo una Etiqueta FLAG como se describe en EP0150126, y/o uno o más de otros péptidos de identificación.

5 En una realización, por lo tanto, una proteína recombinante que comprende un polipéptido de FXa de coagulación según la invención es un polipéptido del factor X de coagulación, teniendo dicho polipéptido una alteración en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320, preferiblemente entre His-311 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1; en la que la alteración es una inserción de 1-50 residuos de aminoácidos.

10 El término "FX de coagulación", como se usa en este documento, se refiere a una proteína precursora de FX de coagulación inactiva. El experto en la materia sabe que el FX de coagulación también se denomina FX de preproteína. Como se usa en este documento, un FX de coagulación comprende un polipéptido de FXa de coagulación.

El término "FX de coagulación maduro", como se usa en este documento, se refiere a una proteína FX de coagulación inactiva que está compuesta por una cadena ligera y una pesada que están unidas por un enlace disulfuro. Esta proteína FX también se conoce como proproteína FX o zimógeno FX. Como se usa en este documento, un FX de coagulación maduro comprende un polipéptido de FXa de coagulación.

Una proteína de la invención preferiblemente comprende, o es, un polipéptido de FXa de coagulación de mamífero, preferiblemente de primate, más preferiblemente humano o humanizado, que tiene una inserción de 1-50 residuos de aminoácidos en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1.

El término "humanizado", como se usa en este documento, se refiere al reemplazo o humanización de residuos de aminoácidos preferiblemente exteriores de una proteína de una especie por residuos de aminoácidos que están presentes en un homólogo humano de la proteína de modo que las proteínas de la primera especie no serán inmunogénicas, o serán menos inmunogénicas, cuando se aplica a un ser humano. La sustitución de residuos exteriores tiene preferiblemente poco o ningún efecto sobre los dominios interiores o sobre los contactos entre dominios entre cadenas ligeras y pesadas. Una proteína de la invención de origen no humano, preferiblemente de origen mamífero, más preferiblemente de primate, se humaniza preferiblemente para reducir la inmunogenicidad de dicha proteína en un ser humano.

Una proteína no humana de la invención comprende preferiblemente un polipéptido de FXa de coagulación de mamífero humanizado, más preferiblemente un primate humanizado, ya que se espera que el riesgo de una respuesta antigénica tras la administración en el cuerpo humano sea menor en comparación con una proteína de la invención que comprende un polipéptido de FXa de coagulación no humanizado.

En el contexto de la humanización de proteínas, se puede prestar atención al procedimiento de humanización que es aplicable a los anticuerpos. Este procedimiento hace uso de los datos de secuencia disponibles para dominios variables de anticuerpos humanos compilados por Kabat et al. (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th ed., Bethesda, Md., National Institutes of Health, actualizaciones de esta base de datos y otras bases de datos accesibles de los Estados Unidos y extranjeras (tanto de ácidos nucleicos como de proteínas). Los ejemplos no limitantes de los métodos usados para generar anticuerpos humanizados incluyen el documento EP 519596; Patente de los Estados Unidos No. 6,797,492; y descrito en Padlan et al., 1991. Mol Immunol 28: 489-498. Como ejemplo adicional del procedimiento de humanización de proteínas no humanas, Sarkar et al., 2012, Journal of Lipids, Article ID 610937, p. 1-13 describieron que la paraoxonasa-1 se humanizó con éxito alterando la superficie de la enzima para reflejar la secuencia humana.

El término "polipéptido de FXa de coagulación" se refiere a la forma catalíticamente activa de un FX de coagulación. Dicho polipéptido de FXa de coagulación se obtiene por escisión del péptido de activación de la cadena pesada de un FX de coagulación maduro. Un polipéptido de FXa de coagulación activa la protrombina y como resultado promueve la coagulación. En el contexto de la invención, una proteína es un polipéptido de FXa de coagulación si es una serina proteasa procoagulante y si la secuencia de aminoácidos de longitud completa de dicha proteína comprende tramos de, o residuos de aminoácidos individuales, que corresponden a tramos de, o residuos de aminoácidos individuales que se conservan entre factores FX de coagulación de diferentes especies, como se indica en la figura 8. Por ejemplo, una serina proteasa procoagulante que comprende un polipéptido que contiene tramos de residuos de aminoácidos que corresponden a los residuos de aminoácidos Cys-246 a Ala-250, Phe-260 a Leu-266 y/o Asp-413 a His-423 de SEQ ID NO: 1, se supone que es un polipéptido de FXa de coagulación. Los métodos para determinar si una proteína es una serina proteasa se conocen en la técnica e incluyen la comparación de secuencias y el uso de un kit de detección de proteasas, por ejemplo de Sigma-Aldrich.

El término "polipéptido de FXa de coagulación de mamífero", como se usa en este documento, se refiere a un polipéptido de FXa de coagulación que está presente de forma endógena en un mamífero, preferiblemente un primate, más preferiblemente un ser humano.

El término "inhibidor de la coagulación", como se usa en este documento, se refiere a un agente anticoagulante. El término "inhibidor de la coagulación" incluye, pero no se limita a (i) agentes, tales como heparina, que estimulan la actividad de la

antitrombina, (ii) antagonistas anticoagulantes orales de la vitamina K basados en cumarina, tales como warfarina, acenocumarol y fenprocumón y (iii) DFXI.

El término "DFXI", como se usa en este documento, se refiere a inhibidores directos de FXa, por ejemplo inhibidores directos de FXa orales. Los DFXI son pequeños compuestos inhibidores que se unen y detienen la actividad del FXa de coagulación. El grupo de DFXI incluye, pero no se limita a, rivaroxaban (5-cloro-N-[[[(5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxo-4-morfolinil)fenil]-5-oxazolidinil]metil]-2-tiofenocarboxamida), apixaban (1-(4-metoxifenil)-7-oxo-6-[4-(2-oxopiperidin-1-il)fenil]-4,5,6,7-tetrahidro-1H-pirazolo[3,4-c]piridina-3-carboxamida), edoxaban (N'-(5-cloropiridin-2-il)-N-[(1S,2R,4S)-4-(dimetilcarbamoil)-2-[(5-metil-6,7-dihidro-4H-[1,3]tiazolo[5,4-c]piridina-2-carbonil)amino]ciclohexil]oxamida; ácido 4-metilbencenosulfónico), betrixaban (N-(5-cloropiridin-2-il)-2-[[4-(N,N-dimetilcarbamidooil)benzoil]amino]-5-metoxibenzamida), darexaban (N-[2-[[4-(Hexahidro-4-metil-1H-1,4-diazepin-1-il)benzoil]amino]-3-hidroxifenil]-4-metoxibenzamida), otamixaban (metil(2R,3R)-2-[(3-carbamimidooilfenil)metil]-3-[[4-(1-oxidopiridin-1-ium-4-il)benzoil]amino]butanoato), eribaxaban (2R,4R)-1-N-(4-clorofenil)-2-N-[2-fluoro-4-(2-oxopiridin-1-il)fenil]-4-metoxipirrolidina-1,2-dicarboxamida), letaxaban (1-[1-[(2S)-3-(6-cloronaftalen-2-il)sulfonil-2-hidroxiopropanoil]piperidin-4-il]-1,3-diazinan-2-ona, LY517717 (N-[2-[4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il]-2-oxo-1-feniletil]-1H-indol-6-carboxamida) y 813893 (N-ciclohexil-N-[2-[[4-metil-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-oxoetil]furan-2-carboxamida). Los términos "DOAC" (anticoagulante oral directo) y "DFXI" se usan de forma intercambiable en este documento.

El término "homólogo", como se usa en este documento, se refiere a la identidad de la secuencia de aminoácidos entre dos secuencias de aminoácidos, expresada como un porcentaje de la longitud total de las dos secuencias de aminoácidos. La identidad de la secuencia se determina comparando la identidad de los residuos de aminoácidos individuales de una secuencia de aminoácidos con el correspondiente residuo de aminoácidos en otra secuencia de aminoácidos.

El término "región", como se usa en este documento, se refiere a un tramo de residuos de aminoácidos que está bordeado por dos residuos de aminoácidos. La numeración de los residuos de aminoácidos como se aplica en este documento se basa en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

El término "inserción" o "insertado", como se usa en este documento, se refiere a la adición de residuos de aminoácidos en una región específica de un polipéptido de FXa de coagulación nativo, aumentando así el número de residuos de aminoácidos en dicha región, en comparación con el número de residuos de aminoácidos en esa región del polipéptido del factor FXa de coagulación nativo.

El término "reemplazo" o "reemplazado", como se usa en este documento, se refiere a la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en una región específica, o en un sitio específico, de un polipéptido del factor Xa de coagulación, alterando así la secuencia de aminoácidos, pero no el número de residuos de aminoácidos en dicha región. Un reemplazo es la consecuencia de la eliminación de un residuo de aminoácido seguida de la inserción de un residuo de aminoácido diferente en la misma posición.

El término "eliminación" o "eliminado", como se usa en este documento, se refiere a eliminar uno o más residuos de aminoácidos en una región específica, o en un sitio específico, de un polipéptido del factor Xa de coagulación, reduciendo así el número de aminoácidos. residuos de ácido en dicha región de dicho polipéptido.

El término "polipéptido de FXa de coagulación nativo", como se usa en este documento, se refiere a un polipéptido de FXa de coagulación endógeno de origen natural en un animal, preferiblemente en un mamífero, más preferiblemente en un primate, más preferiblemente en un ser humano.

El término "composición de aminoácidos", como se usa en este documento, se refiere a la secuencia de aminoácidos y la longitud de un tramo de residuos de aminoácidos, en la que la longitud está determinada por el número de residuos de aminoácidos en ese tramo.

La inserción, sustitución y/o eliminación, preferiblemente inserción, de uno o más residuos de aminoácidos se puede realizar usando técnicas de ADN recombinante que son bien conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la persona experta en la técnica puede usar ADN sintético, tecnología de PCR y clonación molecular para obtener construcciones de ADN recombinante que tienen una secuencia de ADN que codifica una proteína de la presente invención. Los métodos y medios apropiados se describen en Green and Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", CSHL Press, 2012.

La frase "correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre", por ejemplo con respecto a la región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre His-311 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1, se usa en este documento para indicar que el número de residuo de los residuos His y Asp conservados de otro FXa de coagulación correspondiente a His-311 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1, puede diferir del número de residuo atribuido a dicho residuo His y Asp en SEQ ID NO: 1 (véase la figura 8). Las diferencias en el número de residuos de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, el resultado de una forma diferente de numerar los residuos de aminoácidos. También, una diferencia en el número de residuos de aminoácidos puede ser el resultado de una diferencia en la longitud de un polipéptido de FXa de coagulación en comparación con la longitud del polipéptido de FXa de coagulación humano que se indica en la figura 8. De manera similar, los residuos de aminoácidos Gly-289, Glu-297, Val-305 y Tyr-319, de SEQ ID NO: 1, se conservan entre los polipéptidos de FXa de coagulación de diferentes especies (véanse las figuras 1 y 8). Por lo tanto, es

posible identificar residuos de aminoácidos que corresponden a dichos residuos de aminoácidos en otro polipéptido de FXa de coagulación. La persona experta en la técnica comprenderá por tanto que la numeración de los residuos de aminoácidos tal como se aplica en este documento no es limitante para la invención, sino que sólo se aplica con fines de claridad.

5 El experto en la técnica sabrá cómo identificar una región de residuos de aminoácidos que corresponde a la región de residuos de aminoácidos entre dichos residuos de aminoácidos conservados de SEQ ID NO: 1 que limitan con una región como se describe en este documento. Cuando los residuos de aminoácidos 289-322 de SEQ ID NO: 1 se alinean con los residuos de aminoácidos correspondientes en polipéptidos de FXa de coagulación de diferentes especies, se concluye que los residuos de aminoácidos en las posiciones 289, 297, 305, 311, 313, 314, 318, 319, 320 y 322 de SEQ ID NO: 1 se conservan, aunque no idénticos, en polipéptidos FXa de coagulación de diferentes especies, especialmente en mamíferos, en los que Asp-322 de SEQ ID NO: 1 es un residuo catalítico conservado (Asp-102 en la numeración de quimotripsinógenos; Bode et al., 1989. EMBO Journal 8: 3467-3475; Messier et al., 1996. Blood Coagulation and Fibrinolysis 7: 5-14 and figures 1 and 8).

15 Debido a la naturaleza altamente conservada de la región de residuos de aminoácidos en y alrededor de Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1, o en y alrededor de los residuos de Gly y Asp correspondientes en un FXa de coagulación no humano, el experto en la técnica es capaz de identificar una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1. El mismo principio general se aplica a otros residuos de aminoácidos que rodean una región como se describe en este documento. En otras palabras, la naturaleza conservada de los residuos de aminoácidos específicos le dará al experto un indicador inequívoco sobre qué residuos de aminoácidos constituyen una región.

20 Una persona experta en la técnica comprenderá que la presente invención se refiere a la composición de aminoácidos de una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320, más preferiblemente entre His-311 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, el experto en la técnica comprenderá que la secuencia de aminoácidos del resto de una proteína de la invención puede variar, bajo la condición de que dicha proteína permanezca en, o sea activada en un polipéptido de FXa procoagulante con sensibilidad disminuida a DFXIs. De este modo, dicho resto de una proteína de la invención puede variar, ya que varía, por ejemplo, entre polipéptidos FX de coagulación, o FXa de coagulación, de diferentes especies.

25 El número de residuos de aminoácidos en una región correspondiente a la región entre Gly-289 y Asp-320, preferiblemente entre His-311 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 se conserva entre las proteínas FX de coagulación de diferentes especies, especialmente entre especies pertenecientes al grupo de los mamíferos o al grupo de los primates. Esta región también está presente en la proteína zimógeno FX y el polipéptido de FXa. Por consiguiente, el número de residuos de aminoácidos también se conserva en la proteína zimógeno FX y el polipéptido de FXa y en la región correspondiente de la proteína zimógeno FX y el polipéptido de FXa. Dicho número conservado de residuos de aminoácidos en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 es treinta, sin incluir Gly-289 y Asp-320. Dicho número conservado de residuos de aminoácidos en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región entre His-311 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 es ocho, sin incluir His-311 y Asp-320.

30 Se encontró que la inserción de 1-50 residuos de aminoácidos en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320, preferiblemente entre His-311 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 en una proteína de la invención, produce un FXa de coagulación catalíticamente activo con sensibilidad disminuida a la inhibición por DFXI.

35 Se ha demostrado que Tyr-319 de FXa humano es un residuo coordinador de DFXI (Roehrig et al., 2005. J Med Chem 48: 5900-5908; Pinto et al., 2007. J Med Chem 50: 5339-5356), mientras que Asp-322 de SEQ ID NO: 1 está presente en el sitio catalítico de serina proteasa (Messier et al., 1996. Blood Coagulation and Fibrinolysis 7: 5-14). Sin pretender imponer ninguna teoría, es posible que la proximidad de un residuo de aminoácido alterado, tal como la inserción de al menos un residuo de aminoácido, en la región entre Gly-289 y Asp-320 al residuo de coordinación de DFXI Tyr-319 de SEQ ID NO: 1 - o la tirosina correspondiente- y/o la proximidad cercana al dominio catalítico es responsable de la sensibilidad disminuida para un DFXI. Se encuentra que la región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 en una proteína de la invención se puede alterar en el número de residuos de aminoácidos y en la secuencia de aminoácidos, generando así un FXa de coagulación catalíticamente activo con sensibilidad disminuida para DFXI.

40 Dicha alteración se selecciona entre una inserción, un reemplazo y/o una eliminación, y preferiblemente es una inserción, más preferiblemente una inserción combinada con una alteración de al menos un aminoácido en la región entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1.

45 Se prefiere particularmente una proteína de la invención en la que la inserción es de 1-20 residuos de aminoácidos. La inserción en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320, preferiblemente entre His-311 y Asp-320, de la SEQ ID NO: 1 en una proteína de la invención comprende o consta de entre 1 y 50, preferiblemente entre 1 y 20, residuos de aminoácidos. La inserción preferiblemente comprende, o consta de, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 residuos de aminoácidos, lo que da como resultado un total de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28,

respectivamente, aminoácidos entre His-311 y Asp-320. Se prefiere particularmente la inserción de al menos 5 residuos de aminoácidos, tal como una inserción de 9, 12 o 13 residuos de aminoácidos. El experto en la técnica comprenderá que los residuos de aminoácidos se pueden insertar en cualquier posición en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1. Un residuo de aminoácido apropiado para la inserción se selecciona del grupo de veinte residuos de aminoácidos enumerado en la tabla 1. El experto en la técnica comprenderá que dichos residuos de aminoácidos insertados pueden sufrir una alteración química postraducciona *in vivo* o *in vitro*. Como se indica en este documento anteriormente, la persona experta en la técnica puede usar ADN sintético, tecnología de PCR y clonación molecular para obtener construcciones de ADN recombinante que tienen una secuencia de ADN que codifica una proteína de la presente invención que tiene una inserción de entre 1 y 50 residuos de aminoácidos en la región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1.

La inserción en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 en una proteína de la invención es preferiblemente entre Thr-315 y Lys-316, entre Lys-316 y Glu-317, entre Glu-317 y Thr-318, y/o entre Thr-318 y Tyr-319 de SEQ ID NO: 1 o entre dos residuos de aminoácidos correspondientes a estos residuos de aminoácidos en una polipéptido de FXa de coagulación no humana.

Se prefiere particularmente una proteína de la invención en la que el reemplazo es 1-30, preferiblemente 1-8, más preferiblemente 6 o 7, residuos de aminoácidos. El reemplazo de residuos de aminoácidos en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 en una proteína de la invención preferiblemente comprende, o consiste en, entre 1 -30 residuos de aminoácidos en una región correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1. Dicho reemplazo preferiblemente comprende, o consiste en, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 residuos de aminoácidos. Se prefiere que los residuos de aminoácidos conservados tales como, por ejemplo, Glu-297, Val-305 y/o His-311 como se indica en SEQ ID No: 1. no se reemplacen. Se prefiere particularmente la sustitución de 6 o 7 residuos de aminoácidos.

Un residuo de aminoácido presente en una región correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 de una proteína de la invención se reemplaza preferiblemente por uno cualquiera de los residuos de aminoácido. enumerados en la tabla 1, preferiblemente por un aminoácido del mismo grupo que se indica en las columnas "polaridad de la cadena lateral" y "carga de la cadena lateral" en la tabla 1. Preferiblemente, uno o más de Asn-312, Arg-313, Phe-314, Thr-315, Lys-316, Glu-317, Thr-318 y Tyr-319 de SEQ ID NO: 1, o sus correspondientes residuos de aminoácidos en una proteína no humana de la invención, se reemplazan por uno cualquiera de los residuos de aminoácidos como se indica en la tabla 1. Asn-312 de SEQ ID NO: 1 se reemplaza preferiblemente por un residuo Thr o Lys. Arg-313 se reemplaza preferiblemente por un residuo de aminoácido con una polaridad básica y una cadena lateral cargada positivamente (véase la tabla 1), más preferiblemente por un residuo de Lys. El residuo de aminoácido Thr-315 se reemplaza preferiblemente por un residuo de aminoácido polar con una cadena lateral neutra o por un residuo de aminoácido no polar con una cadena lateral neutra, más preferiblemente por un residuo Val. Lys-316 de SEQ ID NO: 1 se reemplaza preferiblemente por un residuo Pro. Glu-317 de SEQ ID NO: 1 se reemplaza preferiblemente por un residuo Val. Thr-318 se reemplaza preferiblemente por un residuo de aminoácido polar con una cadena lateral neutra o por un residuo de aminoácido no polar con una cadena lateral neutra, más preferiblemente por un residuo de Ser o Ala.

La sustitución de residuos de aminoácidos en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 en una proteína de la invención preferiblemente comprende, o consiste en, al menos dos residuos de aminoácidos. En la invención se contempla cualquier combinación de al menos dos residuos de aminoácidos, por ejemplo, un reemplazo de Asn-312 de SEQ ID NO: 1 y Lys-316 de SEQ ID NO: 1 por un residuo Pro y un residuo Ala, respectivamente, o reemplazo de Asn-312, Arg-313, Thr-315, Lys-316, Glu-317, Thr-318 y Tyr-319 de SEQ ID NO: 1 por uno cualquiera de los residuos de aminoácidos enumerados en la tabla 1. Se prefiere particularmente una proteína de la invención que tiene un reemplazo de (i) Asn-312, (ii) Arg-313, (iii) Thr-315, (iv) Lys-316, (v) Glu-317 y (vi) Thr-318 de SEQ ID NO: 1 por un (i) residuo Thr o Pro, (ii) residuo Lys, (iii) residuo Val, (iv) residuo Pro, (v) residuo Val y (vi) residuo Ser o Ala, respectivamente.

La persona experta en la técnica entenderá que cuando los residuos de aminoácidos se reemplazan en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 de una proteína no humana de la invención, solo se reemplazan aquellos residuos de aminoácidos que no están ya presentes en una proteína preferida de la invención. La persona experta en la técnica sabrá que la referencia mencionada anteriormente a la SEQ ID NO: 1 solo se hace en el contexto de ejemplificar la sustitución de residuos de aminoácidos en una región específica de residuos de aminoácidos. Por lo tanto, tendrá una indicación de qué uno o más residuos de aminoácidos se puede reemplazar en un FXa de coagulación no humano por qué otro residuo o residuos de aminoácidos.

Una proteína de la invención puede comprender además una eliminación de al menos un residuo de aminoácido en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1. Se prefiere particularmente una proteína que tiene una eliminación de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20 o 30 residuos de aminoácidos.

Una proteína preferida comprende una combinación de una inserción y un reemplazo, o una combinación de una inserción, un reemplazo y/o una eliminación. Las inserciones y eliminaciones pueden ocurrir independientemente unas de las otras

y de este modo es posible que, por ejemplo, una inserción de 5 residuos de aminoácidos y una eliminación de 5 aminoácidos estén presentes en diferentes posiciones de aminoácidos en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1, sin afectar el número total de residuos de aminoácidos en un FX de coagulación. El experto comprenderá que una inserción o eliminación cambia la numeración de los residuos de aminoácidos en una proteína. Con respecto a una evaluación conveniente de dónde se localiza una alteración y qué constituye la alteración, el experto puede realizar una alineación múltiple de la secuencia de aminoácidos de diferentes proteínas FX de coagulación como se muestra en la figura 8. El experto puede deducir de tal alineación qué residuos de aminoácidos están alterados. El experto en la materia puede usar residuos de aminoácidos conservados, por ejemplo Glu-297, Val-305 y/o His-311 como marcadores para evaluar el número de residuos de aminoácidos donde tuvo lugar la alteración.

Se prefiere particularmente una proteína de la invención en la que la inserción es 1-50, preferiblemente 1-20, residuos de aminoácidos y en la que el reemplazo es 1-7, preferiblemente 6, residuos de aminoácidos. Dicha proteína preferida tiene una inserción de entre 1-50, preferiblemente entre 1-20, residuos de aminoácidos, combinada con una sustitución de entre 1-8, preferiblemente 6 o 7, residuos de aminoácidos en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1

Una proteína más preferida de la invención tiene una inserción de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 residuos de aminoácidos y un reemplazo de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 residuos de aminoácidos en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1, lo que significa que la inserción de al menos 1-20 residuos de aminoácidos se combina con un reemplazo de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 residuos de aminoácidos. La invención está dirigida a todas las posibles combinaciones de la inserción y sustitución antes mencionadas. Se prefiere particularmente una proteína que tiene una inserción de 12-13 residuos de aminoácidos y un reemplazo de 6 residuos de aminoácidos en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1.

Una proteína de la invención comprende más preferiblemente una región de residuos de aminoácidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11 entre los residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos de aminoácidos His-311 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1.

Adicionalmente, la alteración de Arg-366, Glu-369, Phe-396, Asp-413, Ala-414, Cys-415, Gln-416, Ser-419, Val-437, Ser-438, Trp-439, Gly-440, Glu-441, Gly-442, Cys-443, Gly-450, Ile-451 y Tyr-452 de SEQ ID NO:1 es probable que den como resultado una proteína que está insensibilizada a DFXI. Sin pretender imponer ninguna teoría, Arg-366, Glu-369, Phe-396, Asp-413, Ala-414, Cys-415, Gln-416, Ser-419, Val-437, Ser-438, Trp-439, Gly-440, Glu-441, Gly-442, Cys-443, Gly-450, Ile-451 y Tyr-452 de SEQ ID NO: 1 es probable que sean residuos de coordinación de DFXI. La literatura apoya indirectamente este punto de vista, ya que se muestra que al menos algunos de estos residuos están implicados en la unión de DFXI (Roehrig et al., 2005. J Med Chem 48: 5900-5908; Pinto et al., 2007. J Med Chem 50: 5339-5356). Una proteína preferiblemente ha reemplazado o eliminado un residuo de aminoácido correspondiente a Arg-366, Glu-369, Phe-396, Asp-413, Ala-414, Cys-415, Gln-416, Ser-419, Val-437, Ser-438, Trp-439, Gly-440, Glu-441, Gly-442, Cys-443, Gly-450, Ile-451 o Tyr-452 de SEQ ID NO:1. Los residuos de aminoácidos Arg-366, Glu-369, Phe-396, Asp-413, Ala-414, Cys-415, Gln-416, Ser-419, Val-437, Ser-438, Trp-439, Gly-440, Glu-441, Gly-442, Cys-443, Gly-450, Ile-451 y/o Tyr-452 de SEQ ID NO:1 de SEQ ID NO:1, o los residuos de aminoácidos correspondientes en una proteína relacionada, se reemplazan preferiblemente por una cualquiera de los residuos de aminoácidos que se enumeran en la tabla 1. Además, una proteína tiene preferiblemente una inserción de al menos un residuo de aminoácido, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 residuos de aminoácidos en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región entre los residuos de aminoácidos 15 residuos de aminoácidos N- terminal y 15 residuos de aminoácidos C-terminal localizados de Arg-366, Glu-369, Phe-396, Asp-413, Ala-414, Cys-415, Gln-416, Ser-419, Val-437, Ser-438, Trp-439, Gly-440, Glu-441, Gly-442, Cys-443, Gly-450, Ile-451 y/o Tyr-452. Dicha alteración de Phe-396, Arg-366, Glu-369, Asp-413, Ala-414, Cys-415, Gln-416, Ser-419, Val-437, Ser-438, Trp-439, Gly-440, Glu-441, Gly-442, Cys-443, Gly-450, Ile-451 y/o Tyr-452 de SEQ ID NO:1. Dicha inserción en una región como se indica en este párrafo se combina preferiblemente con una alteración en la región entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 como se define en este documento anteriormente.

Una proteína de la invención tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos que es más del 60%, preferiblemente más del 70%, más preferiblemente más del 80% y más preferiblemente más del 90% homóloga a SEQ ID NO: 1 o a la forma activada de la misma, en la que dicha proteína es catalíticamente activa (procoagulante), o catalíticamente activa después del procesamiento/activación, y tiene una sensibilidad disminuida a los DFXI, preferiblemente un DFXI seleccionado del grupo que consiste en rivaroxaban, apixaban, edoxaban y betrixaban. El experto en la materia sabe cómo se procesa la preproteína o proproteína del FX de coagulación hasta su forma catalíticamente activa. La base de datos UniProt proporciona una descripción general, con el número de acceso P00742, del procesamiento de FX de coagulación humana para FXa de coagulación humana activado. De este modo, el experto en la materia podrá determinar qué residuos de aminoácidos están presentes o ausentes en el FXa de coagulación.

El término "sensibilidad disminuida a los DFXI", como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a la concentración de un DFXI que se requiere para producir el 50% de la inhibición máxima (Ki), que es mayor para un polipéptido de la presente invención que para un FXa de coagulación nativo, en el que dicho FXa de coagulación nativo se deriva preferiblemente de plasma sanguíneo o se produce de manera recombinante. La Ki de un DFXI se determina

preferiblemente preincubando una proteína de la invención con 0.001 a 100 μ M de un DFXI y posteriormente realizando un experimento en el que la actividad catalítica hacia Spectrozyme Xa (Sekisui Diagnostics; Stamford, CT, Estados Unidos) mediante el sustrato peptídico se ensaya la conversión. La K_i de una proteína de la invención aumenta preferiblemente más de 2 veces, más preferiblemente aumenta entre 50 y 100 veces, y más preferiblemente aumenta más de 100 veces en comparación con la K_i de dicho FXa de coagulación nativo sin una alteración de al menos un residuo de aminoácido. en una región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre Gly-298 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1.

Se encontró inesperadamente que una proteína de la invención tiene una afinidad de unión aumentada para el FVa de coagulación, el socio de unión del FXa de coagulación en el complejo de protrombinasa, en comparación con la afinidad de unión del FXa de coagulación nativo para el FVa de coagulación. La afinidad de unión de una proteína humana o humanizada de la invención para FVa es al menos dos veces mayor que la afinidad de unión de FXa humano nativo para el FVa.

Los ensayos para determinar la afinidad de unión son conocidos en la técnica, por ejemplo usando un socio de unión (tal como FVa o FXa) con un radiomarcador. La cantidad de radiación emitida tras la unión se puede usar para calcular la afinidad de unión. También, se pueden usar métodos no radiactivos tales como la resonancia de plasmón superficial y la interferometría de polarización dual para cuantificar la afinidad de unión a partir de ensayos basados en concentración, pero también a partir de la cinética de asociación y disociación y, en este último, el cambio conformacional inducido tras la unión. Recientemente, se desarrolló la Termoforesis a Microescala (MST), un método libre de inmovilización, que permite la determinación de la afinidad de unión entre dos proteínas (Wienken et al., 2010. Nature Communications 1: 100). Preferiblemente, la afinidad de unión del complejo de coagulación FVa-FXa se determina mediante la cinética de la protrombina o la conversión de derivados de protrombina (pretrombina-1, pretrombina-2) (Bos et al, 2009. Blood 114: 686-692), intensidad de fluorescencia/mediciones de anisotropía (Bos et al, 2012. J Biol Chem 287: 26342-51); o calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

La invención proporciona además una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína de la invención. El experto en la técnica comprenderá cómo generar una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína de la presente invención y cómo fabricar y aislar una molécula de ácido nucleico con dicha secuencia de ADN usando técnicas de ADN recombinante generalmente conocidas. La secuencia de la molécula de ácido nucleico tiene preferiblemente codones optimizados para la expresión en una célula huésped de la invención. De esta manera, se usan codones que se favorecen para un alto nivel de expresión en una célula huésped específica.

La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención.

Las moléculas de ácido nucleico se insertan preferiblemente en un vector de expresión usando técnicas de ADN recombinante conocidas para los expertos en la técnica. Los vectores de expresión en el contexto de la invención dirigen la expresión de una proteína de la invención en una célula huésped. Estos vectores de expresión son preferiblemente replicables en una célula huésped, ya sea como episomas o como parte del ADN cromosómico. Además, el vector de expresión comprende preferiblemente (i) un promotor/potenciador fuerte, tal como el promotor CMV o SV40, (ii) una secuencia de iniciación de la traducción óptima, tal como un sitio de unión ribosómico y un codón de inicio, preferiblemente una secuencia consenso KOZAK y (iii) una secuencia de terminación de la transcripción, que incluye una señal poli (A) cuando la proteína se expresa en células eucariotas. Los vectores de expresión apropiados incluyen plásmidos y vectores virales tales como adenovirus, virus adenoasociados y retrovirus. El experto en la técnica comprenderá que el vector de expresión que se va a usar depende de la célula huésped que se usa para la expresión de una proteína recombinante. Un vector de expresión de la invención es preferiblemente apropiado para la expresión de una molécula de ácido nucleico de la invención en una célula procariota que incluye una célula bacteriana, o, más preferiblemente, en una célula huésped eucariota, tal como una célula de levadura y una célula de mamífero. Particularmente preferido es el vector de expresión de mamífero pCMV4.

Como alternativa, se puede insertar una molécula de ácido nucleico de la invención en el genoma de una célula huésped. Preferiblemente, dicha inserción se realiza en un locus o dentro de una región que asegura la expresión de una molécula de ácido nucleico de la invención en la célula huésped.

La invención proporciona además una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención. La invención preferiblemente proporciona una célula huésped que expresa una molécula de ácido nucleico de la invención produciendo así una proteína de la invención. Dicha proteína se produce dentro de la célula huésped o, preferiblemente, se secreta a partir de la célula huésped.

Las células huésped apropiadas para su uso en la presente invención incluyen células procariotas y eucariotas, tales como células bacterianas, células de levadura, células de insectos, células animales, células de mamíferos, células murinas, células de rata, células de oveja, células de simios y células humanas. Los ejemplos de células huésped eucariotas apropiadas incluyen, pero no se limitan a células HEK 293, la línea celular de hámster CHO y BHK-21; las células huésped murinas NIH3T3, NSO y C127; las células huésped de simio COS y Vero; y las células huésped humanas HeLa, PER.C6, U-937 y Hep G2. Las células apropiadas están disponibles en fuentes públicas tales como ATCC y Life

- Technologies. Se conocen un número de técnicas de transfección en la técnica, véase, por ejemplo, Graham et al., 1973. Virology 52: 456; Green et al., 2012. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", CSHL Press; Davis et al., "Basic Methods in Molecular Biology", 1986, Elsevier; and Chu et al., 1981. Gene 13: 197. La persona experta en la técnica emplea preferiblemente técnicas como las descritas en estas referencias para introducir una o más moléculas de ácido nucleico exógenas en células huésped apropiadas.
- Una célula huésped particularmente preferida para la producción de una proteína de la invención es una célula HEK 293.
- La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una proteína de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la invención comprende preferiblemente uno o más de diluyentes, rellenos, sales, soluciones reguladoras, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales conocidos en la técnica. Las características del portador dependerán de la vía de administración, como es conocido para el experto. Para reducir el riesgo trombotico potencial de administrar el FXa de la serina proteasa, una composición farmacéutica de la invención preferiblemente comprende una proteína de la invención que se activa después de la administración al sujeto.
- El término "sujeto" se refiere al grupo de mamíferos, preferiblemente seres humanos.
- El término "composición farmacéutica" se refiere, en el contexto de la invención, a una combinación de una proteína de la invención con un portador, inerte o activo, que hace que la composición sea apropiada para uso terapéutico *in vivo* o *ex vivo*.
- El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, se refiere a un material no tóxico que es compatible con las características físicas y químicas de una proteína de la invención y no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de dicha proteína.
- Una composición farmacéutica de la invención puede adaptarse para la administración enteral de la composición, en la que la composición se absorbe a través del tracto digestivo, por ejemplo, por ingestión oral o administración rectal. Preferiblemente, dicha composición se encapsula, por ejemplo, mediante liposomas, para evitar la degradación proteolítica.
- Una composición farmacéutica de la invención se aplica preferiblemente localmente, por ejemplo en o en una herida o en un vaso sanguíneo, preferiblemente una arteria, que suministra sangre a la región herida. Dicha administración local es una administración tópica, por ejemplo en forma de crema, espuma, gel, loción o ungüento, o una administración parenteral, por ejemplo mediante inyección o infusión, para generar un efecto terapéutico local o sistémico. La administración tópica de una proteína de la invención para un efecto local reduce el riesgo de un incidente trombotico sistémico potencial.
- Una composición farmacéutica de la invención, que comprende preferiblemente FX de coagulación o un FX de coagulación maduro que comprende un polipéptido del factor Xa de coagulación alterado, se administra preferiblemente por vía sistémica, preferiblemente por administración parenteral. La administración sistémica de una preproteína inactiva o proproteína inactiva dará como resultado la formación de un complejo de protrombinasa activo que consiste en FXa de coagulación en asociación con FVa en membranas de fosfolípidos cargados negativamente donde convierte la protrombina inactiva en la serina proteasa trombina activa.
- Una composición farmacéutica de la invención se adapta preferiblemente para la administración parenteral, en la que la composición se introduce por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea y/o intramuscular. La administración parenteral implica la inyección o infusión de una composición farmacéutica de la invención en un tejido corporal o fluido corporal, por lo que preferiblemente se usa una jeringa, aguja o catéter. Como alternativa, se puede usar la administración a alta presión sin aguja como medio para la administración parenteral.
- Para composiciones inyectables (por ejemplo, composiciones intravenosas), el portador puede ser una solución, dispersiones, emulsiones y/o suspensión acuosas u oleosas. Preferiblemente, el portador es una solución acuosa, preferiblemente agua destilada estéril, solución salina, solución salina regulada u otro excipiente farmacéuticamente aceptable para inyección.
- Una composición farmacéutica de la invención se usa preferiblemente en una variedad de aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede usar como agente de derivación en el tratamiento o la mejora de trastornos en los que se altera la coagulación sanguínea normal, tal como en la hemofilia A y B, incluidos los grupos de pacientes con inhibidores de la hemofilia A y B, o en la deficiencia de factor X.
- La invención proporciona además una proteína según la invención o una composición farmacéutica según la invención para su uso en un método para revertir total o parcialmente un efecto anticoagulante de un inhibidor directo del factor Xa en un sujeto.
- El término "efecto anticoagulante" se refiere al efecto terapéutico, tal como la prevención de la coagulación sanguínea, que es el resultado de la acción de los inhibidores de la coagulación.

Se describe además el uso de una proteína de la invención para la fabricación de un medicamento para revertir total o parcialmente un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación en un sujeto.

5 El inhibidor directo de FXa (DFXI), más preferiblemente un inhibidor directo de FXa, se selecciona preferiblemente del grupo formado por rivaroxaban (5-cloro-N-[[[(5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxo-4-morfolinil)fenil]-5-oxazolidinil]metil]-2-tiofenocarboxamida), apixaban (1-(4-metoxifenil)-7-oxo-6-[4-(2-oxopiperidin-1-il)fenil]-4,5,6,7-tetrahidro-1H-pirazol[3,4-c]piridina-3-carboxamida), edoxaban (N'-(5-cloropiridin-2-il)-N-[(1S,2R,4S)-4-(dimetilcarbamoyl)-2-[(5-metil-6,7-dihidro-4H-[1,3]tiazolo[5,4-c]piridina-2-carbonil)amino]ciclohexil]oxamida; ácido 4-metilbencenosulfónico) y/o betrixaban (N-(5-cloropiridin-2-il)-2-[[4-(N,N-dimetilcarbamimidoil)benzoil]amino]-5-metoxibenzamida).

10 Se describe además un método para revertir total o parcialmente un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de la invención o una composición farmacéutica de la invención. Preferiblemente, dicho método se aplica para prevenir o mejorar las complicaciones hemorrágicas asociadas con la terapia anticoagulante.

15 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en este documento significa que la cantidad del ingrediente activo contenido en la composición farmacéutica que se va a administrar es suficiente para lograr el propósito pretendido, tal como, en este caso, total o parcialmente revertir un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación. La cantidad de ingrediente activo, esto es, una proteína de la invención, en una composición farmacéutica según la invención está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 600 mg. Una composición farmacéutica según la invención se administra preferiblemente solo una, dos o tres veces, preferiblemente solo una, a un sujeto que necesita una reversión completa o parcial de un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación.

20 Para mayor claridad y una descripción concisa, las características se describen en este documento como parte de las mismas o de realizaciones separadas, sin embargo, se apreciará que el alcance de la invención puede incluir realizaciones que tengan combinaciones de todas o algunas de las características descritas.

SEQ ID NO: 1 (Proteína del factor X de coagulación humano)

```

1  mgrplhlvll saslagllll geslfirreq annilarvtr ansfleemkk ghlerecmee
61  tcsyeearev fedsdktnef wnkykdgdqc etspcqnqgk ckdglgeytc tclegfegkn
121  celftrklcs ldngdcdqfc heeqnsvvcs cargytladn gkaciptgpy pcgkqtlerr
181  krsvaqatss sgeapdsitw kpydaadldp tenpfdlldf nqtqpergdn nltrivggqe
241  ckdgecpwqa llineenegf cggtilsefy iltaahclyq akrfkvrvgd rnteqeegge
301  avhevevvik hnrftketyd fdiavlrlkt pitfrmnvap aclperdwae stlmtqktgi
361  vsgfgrthek grqstrlkml evpyvdrnsc klsssfliitq nmfcagydtk qedacqgdsg
421  gphvtrfkdt yfvtgivswg egcarkgkyg iytkvtaflk widrsmktrg lpkakshape
481  vitssplk

```

SEQ ID NO: 2 (Cadena ligera del factor Xa de coagulación humano)

```

1  ansfleemkk ghlerecmee tcsyeearev fedsdktnef wnkykdgdqc etspcqnqgk
61  ckdglgeytc tclegfegkn celftrklcs ldngdcdqfc heeqnsvvcs cargytladn
121  gkaciptgpy pcgkqtlr 139

```

SEQ ID NO: 3 (Cadena pesada del factor Xa de coagulación humano)

1 ivgggeckdg ecpwqallin eenegfcggt ilsefyilta ahclyqakrf kvrvgdrnte
 61 qeeggeavhe vevvikhnrf tketydfdia vlrlktpitf rmnvapaclp erdwaestlm
 121 tqktgivsgf grthekgrqs trlkmlevpy vdrnscklss sfiitqnmfc agydtkqeda
 181 cqgdsggphv trfkdyfvt givswgegca rkgkygiytk vtaflkwidr smktrglpka
 241 kshapevits splk

SEQ ID NO: 4

1 tkfvppnyyyvhqnfdrvay

SEQ ID NO: 5

5 1 kkfvppkksqefyekfdlvsy

SEQ ID NO: 6 (Gen de FX de coagulación humano; 1-1473 bp)

atggcgacgtccgaggttgcagctgcctggctgcctggcctggctgcctgtgtagccttgtgcacagccag
 catgtgttctctggctcctcagcaagcacggtcgctgctccagcgggtccggcgagccaattcctttcttgaagag
 atgaagaaaggacacctcgaaagagagtgcattggaagagacctgctcatcacgaagaggcccgaggtctttgag
 gacagcgacaagacgaatgaattctggaataaatacaaaagatggcgaccagtgtgagaccagtcttgcagaaac
 cagggcaaatgtaagacggcctcggggaatacacctgcacctgtttagaaggattcgaaggcaaaaactgtgaa
 ttattcacacggaagctctgcagcctggacaacggggactgtgaccagtcttgcacagaggaacagaactctgtg
 gtgtgctcctgcgcccgggtacaccctggctgacaacgggaaggcctgcattcccacagggccctaccctgt
 gggaacagaccctggaacgcaggaagaggtcagtggcccaggccaccagcagcagcggggaggccctgacagc
 atcacatggaagccatgatgatgcagccgacctggacccaccgagaaccccttcgacctgcttgacttcaaccag
 acgcagcctgagagggggcgacaacaacctcacgcgtatcgtgggaggccaggaatgcaaggacggggagtgtccc
 tggcagggcctgctcatcaatgaggaacacgaggggtttctgtggtggaactattctgagcaggttctacatccta
 acggcagcccactgtctctaccaagccaagagattcaaggtgagggtaggtgaccggaacacggagcaggaggag
 ggcggtgaggcggtgcacgaggtggaggtggtcatcaagcacaaccggttcacaaaggagacctatgacttcgac
 atcgccgtgctccggctcaagacccccatcaccttcgcgatgaacgtggcgctgctgctccccgagcgtgac
 tgggcccaggtccacgctgatgacgcagaagacggggattgtgagcggcttcgggcccacccacgagaaggccgg
 cagtccaccaggtcaagatgctggaggtgcctacgtggaccgcaacagctgcaagctgtccagcagcttcatc
 atcacccagaacatgttctgtgcccgtacgacaccaagcaggaggatgctgccagggggacagcggggggcccg
 cagtcacccgcttcaaggacacctacttcgtgacaggcatcgtcagctggggagagggtgtgcccgttaagggg
 aagtagggatctacaccaaggtcacgccttctcaagtggatcgacaggtccatgaaaaccaggggcttgccc
 aaggccaagagccatgccccggaggtcataacgtcctctccattgaaa

SEQ ID NO: 7 (Secuencia de ADN de FX humano modificado- tipo A; 1-1509 bp)

Atggcgacgtccgaggcttgacagctgcctggctgcctggccctggctgccctgtgtagccttgtgcacagccag
catgtgttcctggctcctcagcaagcacggtcgctgctccagcgggtccggcgagccaattcctttcttgaagag
atgaagaaaggacacctcgaaagagagtgcatggaagagacctgctcatacgaagaggcccgaggtctttgag
gacagcgacaagacgaatgaattctggaataaatacaaagatggcgaccagtgtgagaccagtccttgccagaac
cagggcaaatgtaaagacggcctcggggaatacacctgcacctgtttagaaggattcgaaggcaaaaactgtgaa
.ttattcacacggaagctctgcagcctggacaacggggactgtgaccagttctgccacgaggaacagaactctgt
gggtgtgctcctgcgcccggggtacaccctggctgacaacggcaaggcctgcattcccacagggccctaccctg
tgggaacagaccctggaacgcaggaagaggtcagtgcccaggccaccagcagcagcggggaggccctgacag
catcacatggaagccatatgatgcagccgacctggacccaccgagaaccccttcgacctgcttgacttcaacca
gacgcagcctgagagggggcgacaacaacctcacgcgtatcgtagggaggccaggaatgcaaggacggggagtgtcc
ctggcaggccctgctcatcaatgaggaaaacgagggtttctgtggtggaactattctgagcaggttctacatcct
aacggcagcccactgtctctaccaagccaagagattcaaggtgagggtaggtgaccggaacacggagcaggagga
gggcgggtgaggcgggtgcacgaggtggaggtggcatcaagcacaccaagttcgtgccccctaactactattacgt
ccaccagaattttgaccgggtggccatgacttcgacatcgccgtgctccggctcaagacccccatcaccttcg
catgaacgtggcgccctgcctgcctccccgagcgtgactgggcccaggtccacgctgatgacgcagaagacggggat

tgtgagcggcttcgggcgcacccacgagaagggccggcagtcaccaggctcaagatgctggaggtgcctacgt
ggaccgcaacagctgcaagctgtccagcagcttcatcatcaccagaacatgttctgtgccggctacgacaccaa
gcaggaggatgcctgccagggggacagcggggggcccgacgtcaccgcttcaaggacacctacttcgtgacagg
catcgtcagctggggagagggctgtgcccgtaaggggaagtacgggatctacaccaagggtcaccgccttcctcaa
gtggatcgacaggtccatgaaaaccaggggcttgcccaaggccaagagccatgccccggaggtcataacgtctc
tccattgaaa

SEQ ID NO: 8 (Secuencia de ADN de FX humano modificado- tipo B; 1-1512 bp)

atggcgacgtccgaggttgcagctgcctggctgcctggcctggctgcctgtgtagccttgtgcacagccag
catgtgttcctggctcctcagcaagcaggtcgctgctccagcgggtccggcgagccaattcctttcttgaagag
atgaagaaaggacacctcgaaagagagtgcattggaagagacctgctcacaagaggcccgcgaggtctttgag
gacagcgacaagacgaatgaattctggaataaatacaaatgagggcgaccagtgtgagaccagtcccttgccagaac
cagggcaaatgtaagacggcctcggggaatacacctgcacctgtttagaaggattcgaaggcaaaaactgtgaa
ttattcacacggaagctctgcagcctggacaacggggactgtgaccagtcttgcacagaggaacagaactctgtg
gtgtgctcctgcgcccgggtacaccctggctgacaacgggaaggcctgcattcccacagggccctaccctgt
gggaaacagaccctggaacgcaggaagaggtcagtggcccaggccaccagcagcagcggggaggccctgacagc
atcacatggaagccatgatgagcgcagcctggacccaccagagaaccccttcgacctgcttgacttcaaccag
acgcagcctgagagggggcgacaacaacctcacgcgtatcgtgggaggccaggaatgcaaggacggggagtgtccc
tggcaggccctgctcatcaatgaggaacacgaggggtttctgtggtggaactattctgagcaggttctacatcta
acggcagcccactgtctctaccaagccaagagattcaaggtgagggtaggtgaccggaacacggagcaggaggag
ggcgggtgagggcgtgcacaggtggaggtggtcatcaagcacaagaaattcgtgccccctaagaaaagccaggag
ttctacgaaaagtgtgacctggtctcctatgacttcgacatcgccgtgctccggctcaagaccccccatcaccttc
cgcatgaacgtggcgctgcctgcctccccgagcgtgactgggcccaggtccacgctgatgacgcagaagacgggg
attgtgagcggcttcggggcaccacagagaaggccggcagtcaccaggtcaagatgctggaggtgcctac
gtggaccgcaacagctgcaagctgtccagcagcttcatcatcaccagaacatgttctgtgccggctacgacacc
aagcaggaggtgctgcagggggacagcgggggcccgcacgtcaccgcttcaaggacacctaacttcgtgaca
ggcatcgtcagctggggagagggctgtgccgtaaggggaagtacgggatctacaccaaggtcaccgccttcttc
aagtggatcgacaggtccatgaaaaccaggggcttgcccaaggccaagagccatgccccggaggtcataacgtcc
tctccattgaaa

SEQ ID NO: 9

1 kkfvppkksqefyekfdlaay

SEQ ID NO: 10

5 1 kkfvppnyyyvhqnfdaay

SEQ ID NO: 11

1 kkfvppqkaykfdlaay

Leyendas de las figuras

10 Figura 1. Estructura de FXa de coagulación sanguínea. A: Estructura esquemática de γ -carboxiglutámico ('GLA'), EGF-1 y -2 ('EGF') y dominio de serina proteasa ('SP') del FXa de coagulación. B: Estructura cristalina de la serina proteasa del FXa humano (pdb 2W26). Se indican la tríada catalítica His-276, Asp-322, Ser-419, residuos de contacto rivaroxaban/apixaban Try-319 y Phe-396, posición de los residuos 316-317 (en esferas) y residuos Gly-289, Glu-297, Val-305 e His-311. C: Se indica la alineación de la región 311-322 en diversas especies de FX plasmáticas con residuos conservados (resaltados), residuo de contacto Tyr-319 y residuo catalítico Asp-322. * Indica FX de coagulación de veneno con inserción en la región correspondiente a la región entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1.

20 Figura 2. Inhibición de la actividad cromogénica de FXa por inhibidores directos de FXa. A: Conversión de sustrato peptidílico (SpecFXa, 250 μ M) por FXa de coagulación humano recombinante (hFXa, 2 nM, círculos) o FXa de coagulación de veneno *P. textilis* (vptFXa, 10 nM, triángulos) en presencia de concentraciones crecientes (1 nM - 10 μ M) de rivaroxaban ('riva', símbolos cerrados) o apixaban ('api', símbolos abiertos). La conversión del sustrato se representa como el % de incubaciones en ausencia de inhibidor. B, C: La generación de trombina en plasma de coagulación deficiente en FX se

inició con hFXa 0.5 nM (panel B) o vptFXa (panel C) en ausencia (línea gris/columna gris) o presencia de rivaroxaban 0.4 μ M ('riva', línea negra/columna negra) o apixaban 2 μ M ('api', línea de puntos/columna blanca). La formación de trombina se evaluó usando un sustrato fluorogénico y las concentraciones máximas de trombina de las diversas incubaciones se muestran en los recuadros.

5 Figura 3. (A) Transferencia Western fluorescente de FX recombinante (200 ng) obtenido de líneas celulares HEK293 que expresan establemente cualquiera FX humano recombinante (r-hFX, carril 1, 5), FX-A humano modificado (mod A, carril 2, 6) o FX-B humano modificado (mod B, carril 3, 7), antes (carriles 1, 2, 3) o después (carriles 5, 6, 7) de la incubación con el activador RVV-X. La cadena pesada de FXa humano derivado de plasma endógeno migra a $\sim$ 29 kDa (carril 9). Se indica el peso relativo (kDa) de los marcadores de proteína (carriles 4, 8). (B) FX recombinante en medios acondicionados de líneas celulares HEK293 que expresan de manera estable el FX humano recombinante (columna negra), el FX-A humano modificado (columna blanca) o el FX-B humano modificado (columna gris) se cuantificó usando un ELISA específico de FX. Cada barra individual representa una única línea celular estable con la expresión más alta posible por variante de FX.

15 Figura 4. Activación del sustrato macromolecular. Conversión de protrombina (1.4 μ M) en presencia de PCPS 50 μ M, FV 20 nM (FV810, FV truncado del dominio B recombinante) y 0.1 nM de FXa de coagulación humano modificado tipo A (mhFXa A), tipo B (m-hFXa B), FXa recombinante (r-hFXa) o derivado de plasma (pd-hFXa). La conversión del sustrato se representa en nM/min/nM Enzima y los datos son el valor medio de dos experimentos independientes $\pm$ S.D.

20 Figura 5. Inhibición de la quimera FXa tipo A por DFXI. Conversión de sustrato peptidílico (SpecFXa, 250 μ M) de FXa de coagulación humano modificado activado por RVV-X tipo A (m-hFXa A, 1 nM) en comparación con FXa de coagulación humana recombinante (r-hFXa, 3 nM), FXa de coagulación humana derivada de plasma (pd-FXa, 2 nM) y veneno de *P. textilis* (vptFXa, 1 nM) FXa. Las tasas de conversión se determinaron en presencia de 0.001 - 100 μ M de rivaroxaban (panel A) o apixaban (panel B). Los datos representan el valor medio de dos experimentos independientes, excepto para r-hFXa (n = 1).

25 Figura 6. Inhibición de FX -A humano modificado y FX -B humano modificado por DFXI. Conversión de sustrato peptidilo (SpecFXa, 250 μ M) mediante FX -A humano modificado activado por RVV-X (m-hFXa A, 1 nM) y FX -B humano modificado (mhFXa B, 7 nM, en comparación con el FXa de coagulación humano recombinante activado por RVV-X) (r-hFXa, 6 nM). Las tasas de conversión se determinaron en presencia de 0.001 - 100 μ M de rivaroxaban (panel A) y apixaban (panel B). Los datos son la media de dos experimentos independientes.

30 Figura 7. Inhibición de FX -A humano modificado o FX -B humano modificado por DFXI en presencia de cofactor Va y fosfolípidos. Conversión de sustrato peptidilo (SpecFXa, 250 μ M) por FX -A humano modificado activado por RVV-X (mhFXa A, 2 nM) y FX -B humano modificado activado (m-hFXa B, 4 nM) en comparación con el FXa de coagulación humana recombinante activado por RVV-X (r-hFXa, 3 nM), en presencia de PCPS 50 μ M y FV 30 nM (FV810, dominio B recombinante truncado). Las tasas de conversión se determinaron en presencia de 0.001 - 100 μ M de rivaroxaban (panel A) o apixaban (panel B). Los datos son la media de dos experimentos independientes.

35 Figura 8. Alineación múltiple de proteínas FX de coagulación de diferentes especies. La secuencia de aminoácidos de FX de coagulación humana (número de acceso de Genbank: AAH46125.1) (HUM) se compara con las secuencias de aminoácidos de FX de coagulación de *M. musculus* (número de acceso de Genbank: AAC36345.1) (MUS), FX de coagulación de *X. tropicalis* (número de acceso de Genbank: NP_001015728) (Xtr), FX de coagulación de *D. rerio* (número de acceso de Genbank: AAM88343.1) (Dre), FX de coagulación de *T. rubripes* (número de acceso de Genbank: NP_001027783.1) (Tru), FX de coagulación isoforma 1 de *P. textilis* (número de acceso UniprotKB: Q1L659) (Pte1), FX de coagulación isoforma 2 de *P. textilis* (número de acceso UniprotKB: Q1L658) (Pte2), FX de coagulación de *P. textilis* (precursor de subunidad pseutarina C catalítica; número de acceso de Genbank: AAP86642.1) (Pte3) y FX de coagulación de *N. scutatus* (número de acceso de UniProtKB: P82807.2) (Nsc). En esta figura, Gly-289, Asp-320, Tyr-319, Glu-297, Val-305 e His-311 de SEQ ID NO: 1 se indican en negrita y subrayados. Esta figura muestra que existe variación en la región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región entre Gly-289 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 entre proteínas FX de coagulación de diferentes especies. Los residuos de aminoácidos que se conservan en todas las especies se indican en la secuencia consenso.

50 Figura 9. Composición de aminoácidos de variantes de FX quimérico y hFX endógeno. Residuos del dominio de serina proteasa Histidina91 y Tirosina99 (numeración de quimotripsina; correspondiente a His 311 y Tirosina 319, respectivamente, de FX como se muestra en SEQ ID NO: 1) de humano endógeno (hFX) en alineación con FX quimérico tipo A (c-FX A, medio; secuencia entre His 311 y Asp 320 corresponde a SEQ ID NO: 9), tipo B (c-FX B; secuencia entre His 311 y Asp 320 corresponde a SEQ ID NO: 10), y tipo C (c-FX C; la secuencia entre His 311 y Asp 320 corresponde a SEQ ID NO: 11).

55 Figura 10. Caracterización de FXa: A: tinción de Coomassie de variantes de FXa de 5 μ g en geles Bis-Tris al 4-12%. De izquierda a derecha: factor Xa derivado de plasma (pd-FXa), r-hFXa, factor Xa quimérico tipo A, B y C (- A, - B, - C). B: Conversión de protrombina (1.4 μ M) en presencia de PCPS 50 μ M (75% de fosfatidilcolina, 25% de fosfatidilserina) y FV 20 nM (FV810, FV truncado con dominio B recombinante) y 0.1 nM de pd-FXa, r-hFXa, c-FXa - A, c-FXa - B y c-FXa - C. Los puntos de datos son el valor medio de dos experimentos independientes.

Figura 11. Inhibición de variantes de FXa por DOAC. La conversión de protrombina normalizada por 1 nM de pd-FXa (triángulos), r-hFXa (círculos), FXa quimérico - A (cuadrados), - B (diamantes) y - C (cruces) se evaluó en presencia de 0.001 - 100 μ M de apixaban (izquierda, símbolos cerrados) o edoxaban (derecha, símbolos abiertos). Constantes inhibitorias (determinadas con el paquete de software Graphpad Prism 6) de apixaban para pd-FXa: 2nM, r-hFXa: 4nM, c-FXa - A: 130nM, - B: 760nM - C: 1270nM y de edoxaban para r-hFXa: 0.5nM, c-FXa - A: 3nM, - B: 140nM- C: 270nM.

Figura 12. Perfiles de generación de trombina (TG) iniciada por FXa para variantes de FXa. TG en plasma en ausencia (A) y presencia (B) de DOAC apixaban (2 μ M). Iniciación de TG por pd-FXa, r-hFXa, c-FXa - A, c-FXa - B y c-FXa - C en plasma empobrecido en FX. Las curvas son el promedio de al menos 3 experimentos independientes

Figura 13. Perfil de TG iniciado por factor tisular (TF) para r-hFX y c-FX - C. A: TG plasmático a TF bajo (2pM) en ausencia y presencia de apixaban (Apixa) DOAC 2 μ M por 1 unidad r- hFX, r-hFX más apixaban, c-FXa - C o c-FXa - C más apixaban. Una unidad de r-hFX (7 μ g/ml) o c-FXa - C (16 μ g/ml) se definió mediante un ensayo de coagulación basado en el tiempo de protrombina usando plasma humano normal como referencia. Las curvas representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes. B: TG en plasma a TF alto (20 pM).

Figura 14. Perfil de TG iniciado por TF para r-hFX y c-FX - C. (Gráfico superior): TG en plasma a TF bajo (2pM) en ausencia (línea de puntos) y presencia de 200 nM (gris claro), 600 nM (gris oscuro) y 2000 nM (negro) de DOAC edoxaban por 1 unidad de r-hFX (7 μ g/ml). (Gráfico inferior): TG en plasma a TF bajo (2 pM) con concentraciones similares de edoxaban por 1 unidad de c-FXa - C (16 μ g/ml). Las curvas representan el promedio de 2 experimentos independientes.

Tabla 1

Aminoácido	3 letras ⁽¹⁴⁾	1 letra ⁽¹⁵⁾	Polaridad de cadena lateral ⁽¹⁶⁾	Carga de cadena lateral (pH 7.4) ⁽¹⁷⁾	Índice de hidropatía ⁽¹⁸⁾	Absorbancia λ_{max} (nm) ⁽¹⁹⁾	E a λ_{max} ($\times 10^{-3} M^{-1} cm^{-1}$) ⁽²⁰⁾
Alanina	Ala	A	no polar	neutra	1.8		
Arginina	Arg	R	Polar básico	positiva	-4.5		
Asparagina	Asn	N	Polar	neutra	-3.5		
Ácido aspártico	Asp	D	Polar ácido	negativa	-3.5		
Cisteína	Cys	C	no polar	neutra	2.5	250	0.3
Ácido glutámico	Glu	E	Polar ácido	negativa	-3.5		
Glutamina	Gln	Q	Polar	neutra	-3.5		
Glicina	Gly	G	no polar	neutra	-0.4		
Histidina	His	H	Polar básico	positiva (10%) neutra (90%)	-3.2	211	5.9
Isoleucina	Ile	I	no polar	neutra	4.5		
Leucina	Leu	L	no polar	neutra	3.8		
Lisina	Lys	K	Polar básico	positiva	-3.9		
Metionina	Met	M	no polar	neutra	1.9		
Fenilalanina	Phe	F	no polar	neutra	2.6	257, 260, 188	0.2, 9.3, 09.0
Prolina	Pro	P	no polar	neutra	-1.6		
Serina	Ser	S	Polar	neutra	-0.8		
Treonina	Thr	T	Polar	neutra	-0.7		
Triptófano	Trp	W	no polar	neutra	-0.9	280, 219	5.6, 47.9
Tirosina	Tyr	Y	Polar	neutra	-1.3	274, 222, 193	1.4, 8.0, 48.0
Valina	Val	V	no polar	neutra	4.2		

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Se obtuvieron rivaroxaban y apixaban de Alsachim (Illkirch, Francia) y se disolvieron en DMSO (~ 30 mg/ml). El sustrato de peptidilo metoxicarbonilciclohexilglicilglicilarginina-p-nitroanilida (Spec-Xa) se obtuvo de Sekisui Diagnostics (Stamford, CT, Estados Unidos). Todos los reactivos de cultivo de tejidos eran de Life Technologies (Carlsbad, CA), excepto insulina-transferrina-selenito sódico (ITS), que era de Roche (Basilea, Suiza). Se prepararon pequeñas vesículas de fosfolípidos unilaminares (PCPS) compuestas de 75% (p/p) de L-fosfatidilcolina de huevo de gallina y 25% (p/p) de L-fosfatidilserina de cerebro porcino (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) y se caracterizaron como se describió anteriormente. (Higgins et al., 1983. J Biol Chem 258: 6503-6508). El plasma humano empobrecido en FX se obtuvo de Diagnostica Stago (París, Francia). Todos los ensayos funcionales se realizaron en solución salina regulada con HEPES (Hepes 20 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.5) suplementada con CaCl₂ 5 mM y polietilenglicol 8000 al 0.1% (solución reguladora de ensayo). El vector de expresión de mamíferos pCMV4 (Andersson et al, 1989. J Biol Chem. 264: 8222-8229, que lleva FX humano recombinante (r-hFX) fue un generoso regalo de Rodney M. Camire (Camire et al. 2000. Biochemistry 39: 14322-14329). El vector pcDNA3 se obtuvo de Invitrogen y el ADNc de PACE fue un generoso obsequio del Genetics Institute, Boston, MA. Se ha descrito un vector que lleva la proproteína convertasa de Furin (Patente de los Estados Unidos número 5,460,950).

El factor V recombinante humano (FV) se preparó, purificó y caracterizó como se describió previamente (Bos et al, 2009. Blood 114: 686-692). Se preparó, purificó y caracterizó el FXa recombinante de veneno de *P. textilis* (vpt-FXa) como se describió anteriormente (Verhoef et al., Toxin Reviews (2013) (doi:10.3109/15569543.2013.844712). Factor Xa humano derivado de plasma (pd-hFXa), DAPA, protrombina humana e IgG de ratón monoclonal factor X antihumano (AHX-5050) fueron de Haematologic Technologies (Essex Junction, VT, Estados Unidos). Los anticuerpos emparejados con antígeno FX para ELISA se obtuvieron de Cedarlane (Burlington, Canadá). El activador RVV-X se obtuvo de Diagnostica Stago (París, Francia) o Haematologic Technologies. La endonucleasa de restricción Apa1 se obtuvo de New England Biolabs (Ipswich, MA, Estados Unidos). La T4-ADN ligasa se obtuvo de Roche (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, Estados Unidos).

La secuencia de ADN que codifica FX-A humano modificado se proporciona como SEQ ID NO: 7. La secuencia de ADN que codifica FX -B humano modificado se proporciona como SEQ ID NO: 8. Nucleótidos que codifican las secuencias SEQ ID NO: 4 (para generar las secuencias de FX -A humano modificado) o SEQ ID NO: 5 (para generar FX -B humano modificado) flanqueadas por sitios de restricción Apal fueron sintetizadas por Genscript (Piscataway, NJ, Estados Unidos), subclonadas en el vector de expresión de mamíferos pCMV4 usando Apa1 y T4-ADN ligasa y secuenciado para mayor consistencia. El FX-A humano modificado y el FX-B humano modificado también se denominan mod-hFX-A y mod-hFX-B, respectivamente. Se obtuvieron líneas celulares HEK293 estables que expresaban r-hFX o hFX modificado como se describió previamente (Larson et al., 1998. Biochemistry 37, 5029-5038). Las células HEK293 se cotransfectaron con los vectores pCMV4 y pcDNA-PACE usando Lipofectamine2000 según las instrucciones del fabricante. La expresión de FX de los transfectantes se evaluó mediante un ensayo de coagulación de una etapa modificado usando plasma humano empobrecido en FX. Los transfectantes con los niveles más altos de expresión se expandieron en matraces de cultivo T175 y se acondicionaron durante 24 horas en medio de expresión (mezcla de nutrientes DMEM-F12 sin rojo de fenol suplementado con: penicilina/estreptomizina/fungizona, L-glutamina 2 mM, 10 µg/ml de ITS, 100 µg/ml de sulfato de Geneticin-418 y 6 µg/ml de vitamina K). Se recogió el medio acondicionado, se centrifugó a 10.000 g para eliminar los restos celulares, se concentró en un filtro de corte de 10 kDa (Millipore, Darmstadt, Alemania), se lavó con solución salina regulada con HEPES y se almacenó en glicerol al 50% a -20 °C. Los niveles de antígeno FX de las reservas de glicerol se evaluaron mediante ELISA tipo sándwich según las instrucciones del fabricante usando plasma humano combinado como referencia, asumiendo una concentración de FX en plasma de 10 µg/ml.

Los medios de expresión se acondicionaron durante 24 horas en líneas celulares estables que expresaban r-hFX, FX -A humano modificado o FX -B humano modificado. Se incubó una alícuota de medio acondicionado con RVV-X (10 ng/µl; Haematologic Technologies) durante 120 minutos a 37 °C. Después de la activación, el FX -A humano modificado o el FX-B humano modificado también se denominan m-hFXa A o m-hFXa B, respectivamente. Suponiendo afinidades de sustrato similares para todas las variantes de FXa, posteriormente se determinó la concentración de FXa en el medio por conversión de sustrato peptidilo (Spec-Xa, 250 µM) usando concentraciones conocidas de pd-hFXa como referencia. Las velocidades iniciales en estado estacionario de la escisión del sustrato macromolecular se determinaron de forma discontinua a 25 °C como se describe (Camire, 2002. J Biol Chem 277: 37863-70). En resumen, las curvas de progreso de la activación de protrombina se obtuvieron incubando PCPS (50 µM), DAPA (10 µM) y protrombina (1.4 µM) con FV-810 recombinante humano (dominio B truncado, constitutivamente activo), y la reacción se inició con 0.1 nM de pdhFXa, r-hFXa, m-hFXa B, o 0.033 nM de m-hFXa A. La tasa de conversión de protrombina se midió como se describe (Krishnaswamy et al., 1997. Biochemistry 36, 3319-3330).

El FX recombinante y el FX -A humano modificado y el FX -B humano modificado (200 ng) se activaron con RVV-X (0.5 U/ml) durante 60 minutos a 37 °C y se sometieron a electroforesis con condiciones de reducción (ditiotreitól 30 mM) usando geles en gradiente prefabricados al 4-12% y el sistema de solución reguladora MES (Life Technologies) y transferidos a una membrana de nitrocelulosa usando el Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos). La transferencia se probó con un anticuerpo anti-FX de cadena pesada y las bandas de

proteínas se visualizaron usando un anticuerpo fluorescente antitratón Dyelight-800 (Thermo Scientific, Rockford, IL Estados Unidos). Se usó hFXa derivado de plasma (200 ng) como referencia.

La generación de trombina se adaptó de los protocolos descritos anteriormente (Hemker et al., 2003. Pathophysiol Haemost Thromb, 33: 4-15). En resumen, se mezcló plasma empobrecido en FX con inhibidor de tripsina de maíz (70 µg/ml), solución reguladora (HEPES 25 mM, NaCl 175 mM, BSA 5 mg/ml, pH 7.5) y PCPS (20 µM) y se incubó durante 10 minutos a 37 °C en una microplaca de 96 pocillos. La formación de trombina se inició mediante la adición de pd-hFXa (0.5 nM) o vpt-FXa (0.5 nM) preincubados con rivaroxaban (0.4 µM) o apixaban (0.2 µM), suplementado con FluCa y transferido inmediatamente a la mezcla de plasma. El volumen de reacción final fue de 120 µl, de los cuales 64 µl fueron plasma empobrecido en FX. La formación de trombina se determinó cada 20 s durante 30 minutos y se corrigió para el calibrador usando un paquete de software (Thrombinscope, versión 5.0). El potencial medio de trombina endógena (el área bajo la curva de generación de trombina) se calculó a partir de al menos 2 experimentos individuales. El calibrador y el sustrato fluorescente (FluCa) se adquirieron en Thrombinscope (Maastricht, Países Bajos).

La conversión de sustrato peptídico (Spec-Xa, 250 µM final) de cada variante de FXa se realizó en ausencia o presencia de inhibidores directos de FXa rivaroxaban y apixaban (0,001 µM - 100 µM final) a temperatura ambiente. Se diluyeron soluciones madre sin calcio de pd-hFXa (final 2 nM) o vpt-FXa (final 10 nM) en solución reguladora de ensayo y se incubaron en una microplaca de 96 pocillos en presencia de solución reguladora de ensayo o inhibidor durante 2 minutos. La conversión del sustrato se inició con Spec-Xa y la absorción se controló durante 10 minutos a 405 nM en un lector de microplacas SpectraMax M2e equipado con el paquete de software Softmax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos). Para analizar la sensibilidad de DFXI de cada variante de FX recombinante, se diluyeron reservas de glicerol (5-40 µl) de r-hFX, FX -A humano modificado y FX -B humano modificado en solución reguladora de ensayo y se incubaron con RVV-X (0.5 U/ml) durante 60 minutos a 37 °C. Las soluciones madre activadas se diluyeron posteriormente en solución reguladora de ensayo, se incubaron durante 2 minutos en una microplaca de 96 pocillos en presencia de solución reguladora de ensayo o inhibidor y se ensayaron para la conversión de sustrato como se describe. La concentración relativa de rhFX, m-hFXa A y m-hFXa B se evaluó a partir de la tasa de conversión del sustrato en ausencia de inhibidor usando concentraciones conocidas de pd-hFXa como referencia.

Resultados

FXa de *P. textilis* derivado del veneno (Vpt) es resistente a la inhibición por DFXI.

La caracterización bioquímica de FXa de *P. textilis* derivado de veneno (vptFXa) recombinante purificado reveló que esta proteasa, a diferencia de cualquier otra especie de FXa conocida hasta la fecha, es resistente a la inhibición por los anticoagulantes directos rivaroxaban y apixaban, que han sido diseñados para bloquear reversiblemente el sitio activo de FXa. De acuerdo con observaciones previas, la K_i para la inhibición del FXa humano (hFXa) fue de aproximadamente 1 nM (Perzborn, 2005. J Thromb Haemost, 3, 514-521), mientras que la inhibición de vptFXa se redujo al menos 1000 veces (Figura 2A). Estos hallazgos fueron corroborados en un sistema de plasma que imita la generación de fibrina *in vivo*, demostrando que las concentraciones fisiológicas de los inhibidores de FXa apenas afectaron la formación de trombina iniciada por vptFXa, mientras que se observó una reducción significativa con la hFXa presente (Figuras 2B, C).

Quimera FXa humano de *P. textilis* de veneno.

Un elemento estructural llamativo que no solo se limita a vptFXa, sino que también está presente en el FX de veneno de la serpiente australiana *Notechis scutatus*, es una composición de aminoácidos alterada en una posición cercana al sitio activo de hFXa (Figura 1C). Dada su ubicación, se plantea la hipótesis de que esta hélice única no solo puede modular la interacción con rivaroxaban y/o apixaban, sino también con FVa, ya que el sitio de unión de FVa es C-terminal a esta hélice (Lee et al., 2011. J Thromb Haemost 9: 2123-2126). Para probar esta hipótesis, se prepararon las dos construcciones de ADN que codifican proteínas enumeradas en SEQ ID NO: 7 y 8. La quimera modhFX-A proporcionada en SEQ ID NO: 7 comprende la parte relevante de la secuencia de ADN de *N. scutatus* (indicada en negrita y subrayada) y la quimera mod-hFX-B proporcionada en SEQ ID NO: 8 comprende la parte relevante de la secuencia de *P. textilis* (indicada en negrita y subrayada).

Usando estas construcciones de ADN, se generaron líneas celulares HEK293 que producían de manera estable ambas proteínas quiméricas y posteriormente evaluaron los niveles de expresión de FX humano modificado de células HEK293 acondicionando las células en medios de expresión durante 24 horas. El análisis de transferencia Western reveló la expresión de FX de longitud completa para ambas variantes quiméricas similar al FX de tipo salvaje (Figura 3A). La incubación con el activador de Russell's Viper Venom (RVV-X) dio como resultado la activación proteolítica de aproximadamente el 30% del zimógeno FX a FXa, indicado por la aparición de la banda de cadena pesada de ~ 29 kDa. La cadena pesada de tanto FXa-A humano modificado como FXa-B humano modificado migró a un peso molecular ligeramente más alto, lo que es consistente con la inserción de una secuencia de serpiente que es 12 o 13 residuos más larga en comparación con la del FXa humano, respectivamente. El análisis de los niveles de antígeno FX en medios acondicionados indicó que mientras que la expresión de mod-hFX-A se redujo aproximadamente ~ 7 veces, la de mod-hFX-B fue similar a la del FX humano de tipo salvaje (Figura 3B). Los niveles bajos de antígeno FX de mod-hFX-A se correlacionaron con los niveles de actividad FX igualmente bajos que observamos empleando un ensayo de coagulación

modificado. Esto indica que aunque la expresión de la proteína de mod-hFX-A es subóptima en comparación con la de las otras variantes de FX, su función de FX no se ve perturbada.

Para probar la activación de zimógeno de FX, se convierten rFX y FX-A humano modificado y FX-B humano modificado en FXa usando el activador de FX de Russell's Viper Venom (RVV-X). Tanto el FXa-A humano modificado como el FXa-B humano modificado mostraron actividad proteasa tras la activación de RVV-X, según se evaluó mediante la conversión del sustrato de peptidilo específico de FXa pequeño SpectroZyme Xa. Además, las tasas de conversión de protrombina en presencia del cofactor humano FVa de ambas quimeras fueron similares a las del FXa humano (tanto pd-hFXa como r-hFXa) (Figura 4). En conjunto, estas observaciones sugieren que las inserciones de la secuencia de serpientes no obstaculizan gravemente las propiedades enzimáticas del FX humano.

10 Inhibición de quimeras FXa por DFXI.

Para estimar la constante inhibidora (K_i) de rivaroxaban y apixaban para FXa humano modificado activado por RVV-X, la proteína recombinante activada se preincubó con 0.001 a 100 μ M de inhibidor y posteriormente se ensayó para determinar su actividad catalítica frente a SpectroZyme Xa. Aunque la incubación con rivaroxaban 0.5 μ M dio como resultado la inhibición completa de rhFXa y pd-hFXa, mod-hFXa-A permaneció completamente activo en estas condiciones (Figura 5A). Además, la variante quimérica todavía mostraba actividad cromogénica parcial después de la incubación con rivaroxaban 100 μ M, similar al FXa de *P. textilis* de veneno. Estos datos indican que la K_i para la inhibición de mod-hFXa-A aumenta al menos 100 veces en comparación con la del FXa humano. Observamos una sensibilidad reducida similar para la inhibición por apixaban (Figura 5B).

La evaluación de la inhibición de mod-hFXa-B por rivaroxaban y apixaban dio como resultado una K_i similar a la observada para mod-hFXa-A (Figuras 6A y 6B). De este modo, se demostró una sensibilidad reducida para la inhibición por apixaban y rivaroxaban. Finalmente, la inhibición de DFXI de las variantes quiméricas de FXa no se alteró en presencia del cofactor FVa y vesículas de fosfolípidos cargadas negativamente, lo que sugiere que tanto la proteasa libre como la ensamblada en un complejo FVa-FXa unido a lípidos son igualmente resistentes a la inhibición por rivaroxaban y apixaban (Figuras 7A, B).

25 Ejemplo 2

Materiales y métodos

A menos que se indique lo contrario, los materiales y métodos usados en este ejemplo fueron los mismos o similares a los materiales y métodos indicados en el ejemplo 1.

Construcción y expresión de FX recombinante: ADN que codifica FX-A quimérico (c-FX A), FX-B quimérico (c-FX B) y FX-C quimérico (c-FX C) se sintetizaron en Genscript (Piscataway, NJ, Estados Unidos), subclonado en el vector de expresión de mamífero pCMV4 usando Apa1 y ligasa de ADN T4 y secuenciado para mantener la coherencia. Se obtuvieron líneas celulares HEK293 estables que expresaban FX quimérico recombinante o humano recombinante como se describió previamente (Larson et al, 1998. Biochemistry 37, 5029-5038). Las células HEK293 se cotransfectaron con los vectores pCMV4 y pcDNA-PACE mediante Lipofectamine2000 según las instrucciones del fabricante.

Purificación de FX quimérico (a): Se prepararon, purificaron y caracterizaron productos quiméricos FX recombinantes A, B y C como se describió anteriormente (Camire et al, 2000), con la excepción de que la purificación por inmunoafinidad fue reemplazada por una purificación con gradiente de calcio de FX en una columna POROS HQ20-sepharose. El rendimiento típico de FX recombinante completamente γ -carboxilado fue de 0.9 mg/litro de medio acondicionado. El FX quimérico recombinante purificado se activó con RVV-X (0.1 U/mg de FX), se aisló por cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Sephacryl S200 HR (Vt 460 ml) y se almacenó a -20 °C en HBS que contenía glicerol al 50% vol/vol. Los productos purificados se visualizaron mediante tinción de Coomassie.

Activación del sustrato macromolecular: las velocidades iniciales en estado estacionario de la escisión del sustrato macromolecular se determinaron de forma discontinua a 25 °C como se describe (Camire, 2002). En resumen, las curvas de progreso de la activación de la protrombina se obtuvieron incubando PCPS (50 μ M), DAPA (10 μ M) y protrombina (1.4 μ M) con FV-810 recombinante humano (20 nM, dominio B truncado, FV constitutivamente activo) y la reacción se inició con 0.1 nM de pd-hFXa, rhFXa, c-FXa A, c-FXa B o c-FXa C. La tasa de conversión de protrombina se midió como se describe (Krishnaswamy et al, 1997). La conversión de protrombina se analizó en ausencia o presencia de inhibidores directos de FXa edoxaban (número de registro CAS 912273-65-5; fabricado por Daiichi Sankyo, comercializado como Savaysa) y apixaban (0,001 μ M - 100 μ M final) para determinar la sensibilidad DOAC de cada variante de FXa recombinante.

Ensayos de generación de trombina: la generación de trombina se adaptó de los protocolos descritos anteriormente (Hemker et al, 2003). En resumen, las curvas de generación de trombina se obtuvieron complementando el plasma empobrecido en FX con factor tisular (TF, 2 o 20 pM final), inhibidor de tripsina de maíz (70 μ g/ml), PCPS (20 μ M) y 1 unidad (actividad de coagulación específica del tiempo de protrombina) de r-hFX (7 μ g/ml) o FX-C quimérico (16 μ g/ml). La formación de trombina se inició agregando solución reguladora de sustrato (Fluca) al plasma. Las curvas de generación de trombina FXa se obtuvieron suplementando plasma empobrecido en FX con inhibidor de tripsina de maíz (70 μ g/ml),

solución reguladora de ensayo y PCPS (20 μ M). La formación de trombina se inició mediante la adición de FXa premezclado con rivaroxaban o apixaban, solución reguladora de ensayo sin calcio y suplementado con Fluca. El volumen de reacción final fue de 120 μ l, de los cuales 64 μ l fueron plasma empobrecido en FX. La formación de trombina se determinó cada 20 segundos durante 30 minutos y se corrigió para el calibrador, usando el software Thrombinoscope. El tiempo de retraso, el potencial medio de trombina endógena (el área bajo la curva de generación de trombina), el tiempo hasta el pico y el pico de generación de trombina, se calculó a partir de al menos 3 experimentos individuales.

Resultados

La inserción de 9-13 residuos en los dominios de serina proteasa del veneno de *P. textilis*, la isoforma de *P. textilis* y el FXa de veneno de *N. scutatis* ha impulsado la construcción de quimeras de FX humano y de serpiente. Se hicieron tres construcciones de ADN codificantes de proteínas que incorporan cada una de estas inserciones en FXa humano. (Figura 9). Usando estas construcciones de ADN, se generaron líneas celulares HEK293 que producen de manera estable FX humano normal recombinante (r-hFX) o tres tipos de FX quimérico (c-FX A, c-FX B y c-FX C). Los niveles de expresión de FX quimérico y humano recombinante de células HEK293 se determinaron cultivando las células en medio de expresión durante 24 horas, después de lo cual se evaluó la actividad de coagulación del medio condicionado mediante un ensayo de coagulación PT de una etapa modificado en plasma sin FX. El FX γ -carboxilado recombinante se purificó a partir de medios acondicionados mediante sucesivas etapas de cromatografía de intercambio iónico. Una fracción del conjunto de FX se activó posteriormente con el activador de FX del veneno de Russell's Viper, se aisló por cromatografía de exclusión por tamaño y se caracterizó por SDS-PAGE. La cadena pesada del factor Xa derivado de plasma purificado migra como una mezcla 50/50 de FXa- α y FXa- β a $\sim$ 34-31 kDa. Si bien la escisión autoproteolítica de la porción C-terminal de FXa- α (residuos 436-447) produce la forma β de FXa, ambas isoformas son funcionalmente similares con respecto al ensamblaje de protrombinasa, activación de protrombina, reconocimiento de antitrombina y conversión de sustrato de peptidilo (Prydzial and Kessler, 1996).

Los productos purificados de r-hFXa y FXa-B y-C quiméricos migraron predominantemente como FXa- β , el FXa-A quimérico migra en su lugar como una mezcla 50/50 de FXa α y β . (Figura 10A). La cinética de la activación del sustrato macromolecular por r-hFXa y FXa quimérico (A/B/C) en vesículas de fosfolípidos cargadas negativamente (PCPS) en presencia del cofactor FVa muestra que todas las variantes quiméricas se ensamblan en el complejo de protrombinasa. Sin embargo, la velocidad catalítica de las variantes quiméricas de FXa - A, - B y - C se reduce respectivamente 8.2, 6.8 y 2.3 veces en comparación con el FXa humano recombinante. Además, el FXa humano preparado de forma recombinante muestra una modesta disminución en la eficacia catalítica en comparación con el FXa derivado del plasma. (Figura 10B).

Para determinar la constante inhibidora (K_i) de DOAC (apixaban, edoxaban) para FXa quimérico (A/B/C), analizamos la cinética de activación de protrombina en presencia de 0.001 a 100 μ M de DOAC. Si bien el FXa derivado de plasma y el FXa humano recombinante se inhiben por completo a concentraciones casi equimolares de DOAC, todas las variantes de FXa quimérico pudieron mantener la conversión de protrombina a concentraciones de inhibidor de FXa significativamente más altas (K_i apexaban: 130-1270 nM, K_i edoxaban: 3- 270 nM). (Figura 11). Dado que las variantes quiméricas de FXa comprenden inserciones colocadas de manera similar con una longitud y composición de aminoácidos variables, se especula que la proximidad de estas inserciones al residuo de coordinación de DOAC Tyr99 y/o el sitio activo es una consecuencia directa de la disminución de la sensibilidad para el DOAC.

Con el fin de evaluar el potencial del FXa quimérico para restaurar la generación de trombina en plasma enriquecido con DOAC, se realizó un ensayo de generación de trombina (TG). La generación de trombina iniciada por FXa (5 nM) en plasma humano empobrecido en FX demostró un perfil de TG normal para la variante C de c-FXa, y perfiles casi normales para las variantes A y B de c-FXa (Figura 12A). Mientras que apexaban (2 μ M) prolongó drásticamente el tiempo de retraso y redujo la generación máxima de trombina en TG iniciados con pd-FXa y rhFXa, estos parámetros no se alteraron con las variantes quiméricas de FXa presentes. (Figura 12B). (Tabla 2). Estos resultados muestran que las variantes quiméricas de FXa son capaces de restaurar la hemostasia en plasma inhibido por DOAC. Además, la forma zimógena del FX-C quimérico también es capaz de mantener la generación de trombina en plasma empobrecido en FX. El inicio de la coagulación por una concentración baja de factor tisular (TF, 2 pM) genera una curva TG robusta para FX-C quimérico que no se ve afectada por apexaban, a diferencia de TG por r-hFX (Figura 13). A baja concentración de TF, el FX-C quimérico muestra un breve retraso en el inicio de TG y el tiempo para alcanzar el pico, además, el FX-C quimérico tiene un mayor potencial de trombina endógena (ETP) y una mayor generación de trombina máxima (Tabla 3). Sin embargo, estos valores se normalizan a concentraciones altas de TF (20 pM) (Figura 13) (Tabla 3). En base a las observaciones realizadas en el ensayo TG iniciado por FXa, esperamos que las formas de zimógeno de las variantes A y B de FX quimérico también mantengan TG iniciado por TF en plasma enriquecido con DOAC. La figura 14 en combinación con la tabla 4 proporciona evidencia adicional del efecto de las variantes quiméricas de FXa sobre la restauración de la hemostasia en plasma inhibido por DOAC. Tomados en conjunto, estos resultados muestran que el FX(a) quimérico es capaz de restaurar la hemostasis en plasma inhibido por DOAC tanto en forma de zimógeno como de proteasa.

Tabla 2. Efecto de apixaban en parámetros TG iniciados con FXa. Los valores representan valores de TG experimental obtenidos en presencia de apixaban corregidos para valores de TG obtenidos en la ausencia de apixaban.

	pd-FXa	r-hFXa	c-FXa -A	c-FXa -B	c-FXa -C
Detención del tiempo de retraso (segundos)	299	293	61	12	3
Retraso en el tiempo para alcanzar el pico (segundos)	515	467	120	30	7
Generación máxima de trombina (% de no apixaban)	26	33	78	85	99
Área bajo la curva (% de no apixaban)	67	76	89	92	101

Tabla 3. Sumario de experimentos TG iniciados con TF bajo y alto.

<i>TF bajo (2 pM)</i>	r-hFX	r-hFX + Apixaban	c-FX -C	c-FX -C + Apixaban	<i>TF alto (20 pM)</i>	r-hFX	r-hFX + Apixaban	c-FX -C	c-FX -C + Apixaban
Detención del tiempo de retraso (segundos)	132 ± 5	696 ± 162	185 ± 12	186 ± 6	Detención del tiempo de retraso (segundos)	48 ± 1	138 ± 12	72 ± 2	78 ± 2
Retraso en el tiempo para alcanzar el pico (segundos)	324 ± 6	no peak	480 ± 24	492 ± 23	Retraso en el tiempo para alcanzar el pico (segundos)	114 ± 6	804 ± 36	138 ± 6	144 ± 9
Pico de trombina (nM)	61 ± 4	8 ± 4	78 ± 1	72 ± 4	Pico de trombina (nM)	338 ± 8	32 ± 4	334 ± 15	321 ± 15
ETP (nM)	567 ± 61	no ETP	830 ± 131	756 ± 38	ETP (nM)	973 ± 18	694 ± 67	1027 ± 19	1012 ± 33

Tabla 4. Efecto de edoxaban en parámetros TG iniciados con FXa para r-hFX y c-FX-C. Los valores representan valores de TG experimental obtenidos en presencia de concentraciones crecientes de edoxaban.

r-hFX									
Edoxaban (nM)	control	50	100	200	400	600	1000	2000	
Detención del tiempo de retraso (s)	115	247	297	397	538	679	874	1180	
ETP restante	100.0%	99.3%	87.1%	no-ETP	no-ETP	no-ETP	no-ETP	no-ETP	
Altura del pico %	100.0%	41.2%	30.8%	23.1%	15.9%	13.0%	10.1%	7.1%	
Tiempo para el pico (s)	265	618	756	1290	1890	1932	2472	2562	
c-FX-C									
Edoxaban (nM)	control	50	100	200	400	600	1000	2000	
Detención del tiempo de retraso (s)	188	161	161	172	182	197	212	232	
ETP restante	100.0%	87.9%	92.5%	88.3%	92.7%	96.8%	92.7%	82.0%	
Altura del pico %	100.0%	109.3%	112.3%	101.0%	94.6%	88.7%	77.5%	65.3%	
Tiempo para el pico (s)	433	382	388	418	448	483	538	578	

REIVINDICACIONES

1. Una proteína recombinante que comprende un polipéptido del factor Xa de coagulación de mamífero, teniendo dicho polipéptido una alteración en la región de los residuos de aminoácidos correspondientes a la región entre Gly-289 y Asp-320, preferiblemente entre His-311 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1; en la que dicha alteración es una inserción de 1-50
5 residuos de aminoácidos, y en la que dicha proteína alterada tiene una sensibilidad disminuida a la inhibición por un inhibidor directo del factor Xa en comparación con dicho polipéptido del factor Xa de coagulación de mamífero que no tiene dicha alteración.
2. La proteína según la reivindicación 1, en la que la inserción es de 1-20 residuos de aminoácidos.
3. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que dicha inserción está entre dos residuos de
10 aminoácidos correspondientes a Lys-316 y Glu-317 de SEQ ID NO: 1.
4. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la inserción de al menos un residuo de aminoácido se combina con un reemplazo de entre 1-8 residuos de aminoácidos en la región de residuos de aminoácidos entre Gly-289 y Asp-320, preferiblemente entre His-311 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1.
5. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha inserción es de 9-13 residuos de
15 aminoácidos.
6. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la región de residuos de aminoácidos correspondiente a la región de residuos de aminoácidos entre His-311 y Asp-320 de SEQ ID NO: 1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 11.
7. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que codifica la proteína según una cualquiera
20 de las reivindicaciones 1-6.
8. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7.
9. Célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7 o el vector de expresión según la reivindicación 8.
10. Una composición farmacéutica que comprende la proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una
25 sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un portador farmacéuticamente aceptable.
11. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la composición farmacéutica según la reivindicación 10, para uso como medicamento.
12. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la composición farmacéutica según la reivindicación 10 para su uso en un método para revertir total o parcialmente un efecto anticoagulante de un inhibidor directo del factor
30 Xa en un sujeto.
13. La proteína para uso según la reivindicación 12, en la que el inhibidor directo del factor Xa preferiblemente es rivaroxaban (5-cloro- N-[[[(5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxo-4-morfolinil)fenil]-5-oxazolidinil]metil]-2-tiofenocarboxamida), apixaban (1-(4-metoxifenil)-7-oxo-6-[4-(2-oxopiperidin-1-il)fenil]-4,5,6,7-tetrahidro-1H-pirazolo[3,4-c]piridina-3-carboxamida), edoxaban (N'-(5-cloropiridin-2-il)-N-[(1S,2R,4S)-4-(dimetilcarbamoil)-2-[(5-metil-6,7-dihidro- 4H-[1,3]tiazolo[5,4-c]piridina-2-carbonil)amino]ciclohexil]oxamida; ácido 4-metilbencenosulfónico), o betrixaban (N-(5-cloropiridin-2-il)-2-[[4-(N,N-dimetilcarbamimidoil)benzoil]amino]-5-metoxibenzamida).
- 35

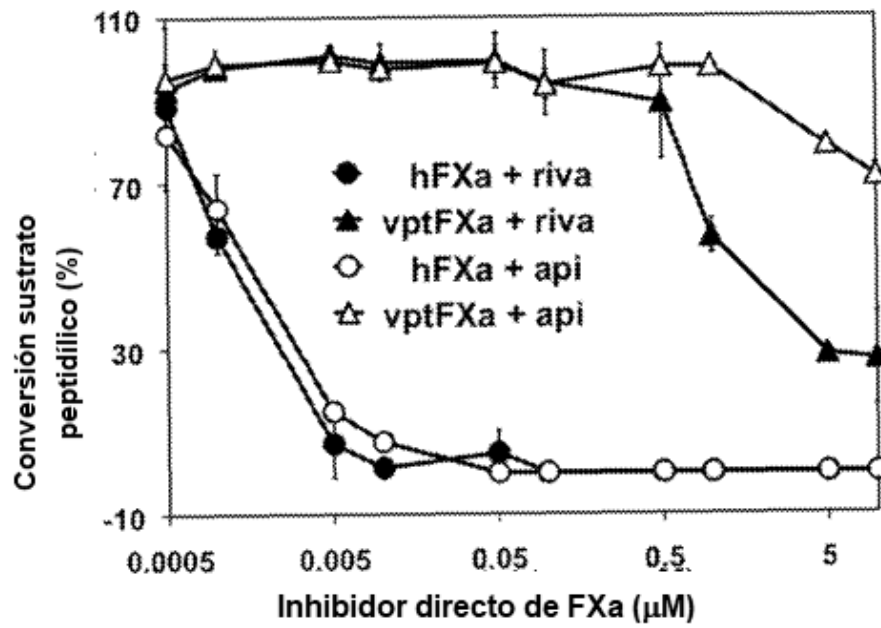


Fig. 2A

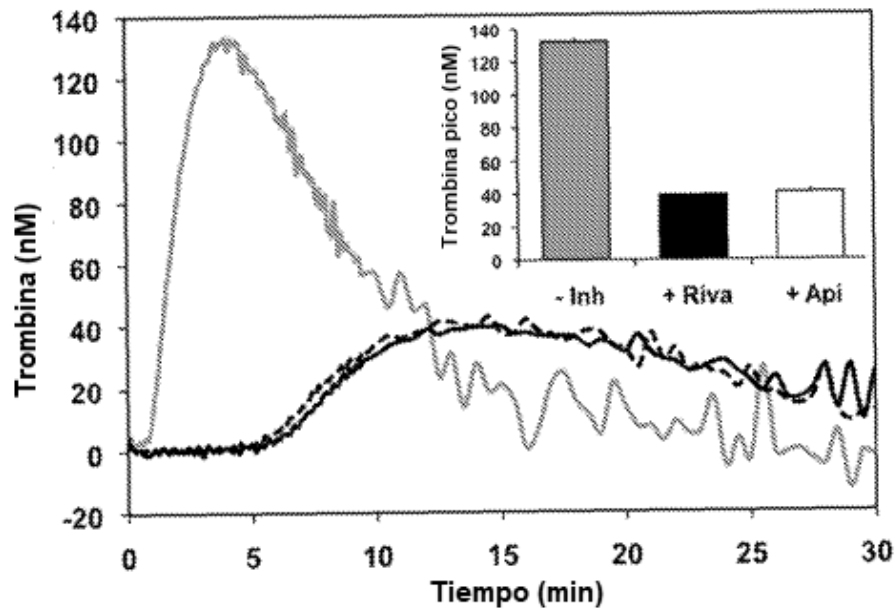


Fig. 2B

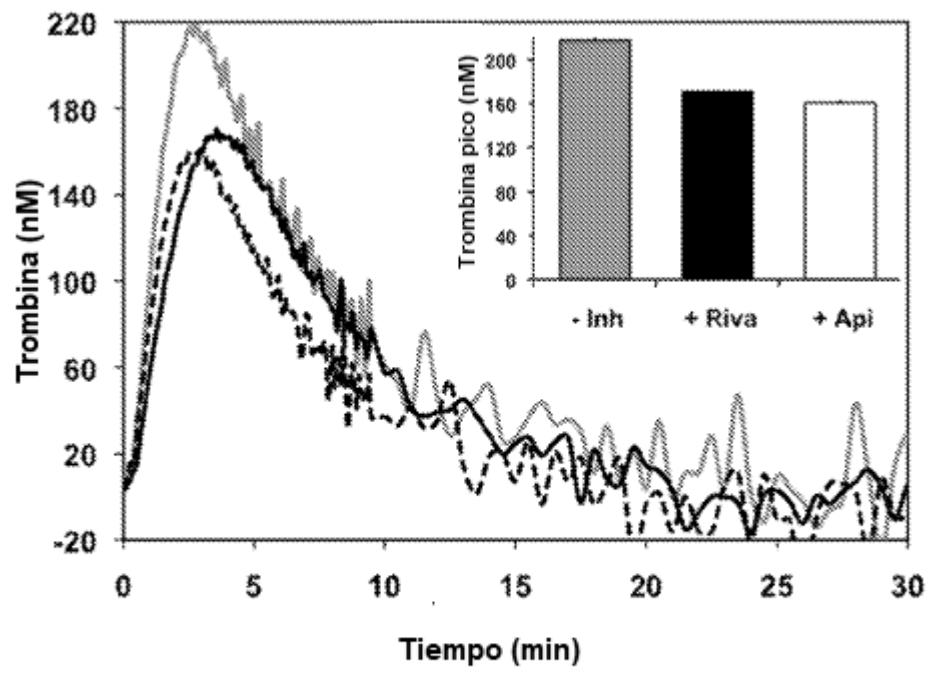


Fig. 2C

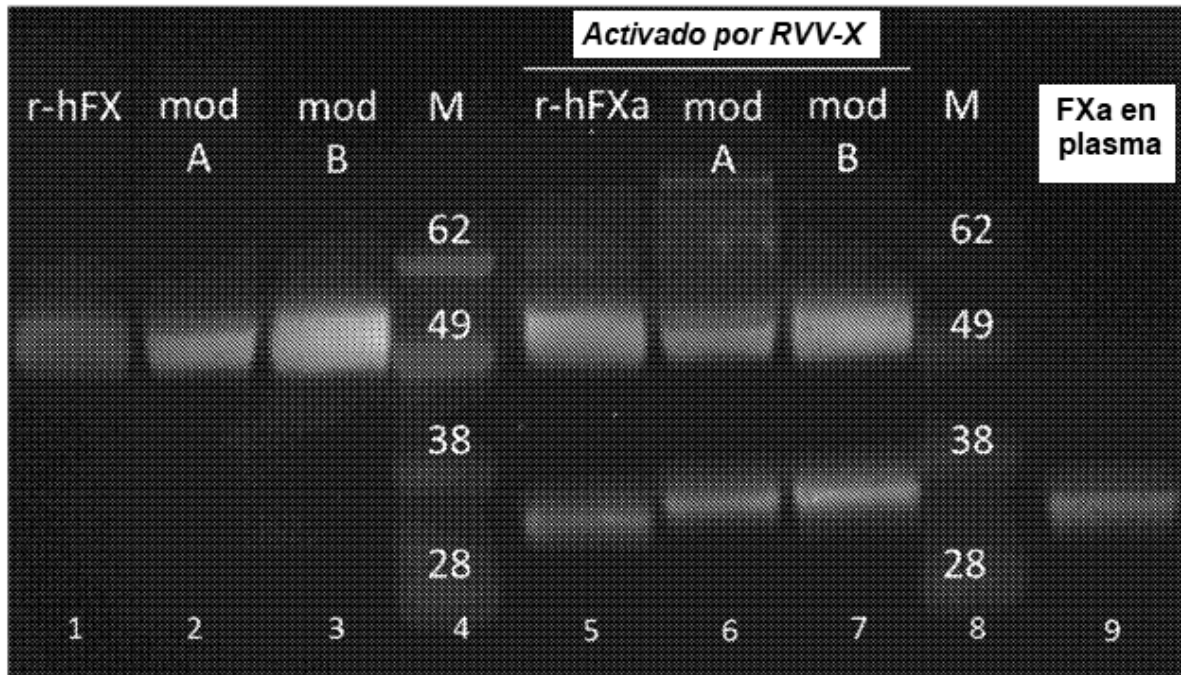


Fig. 3A

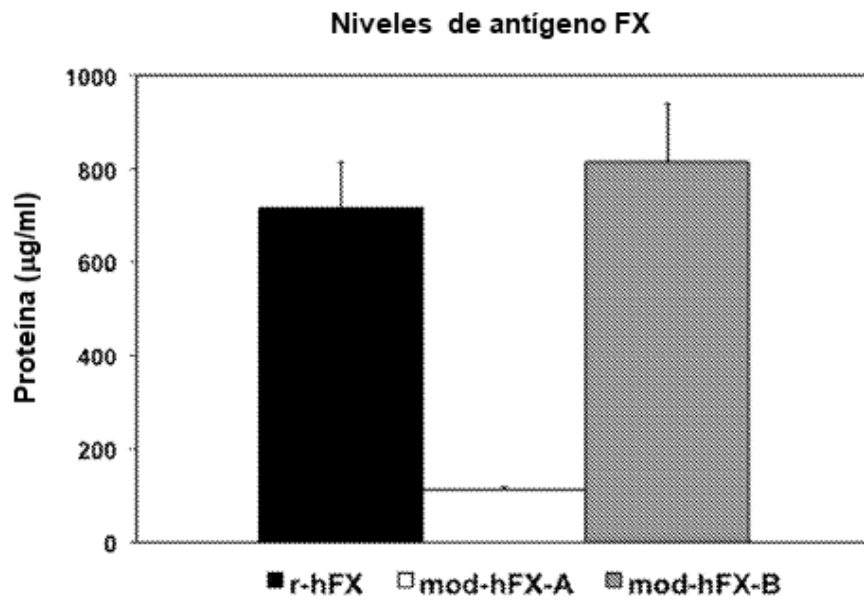


Fig. 3B

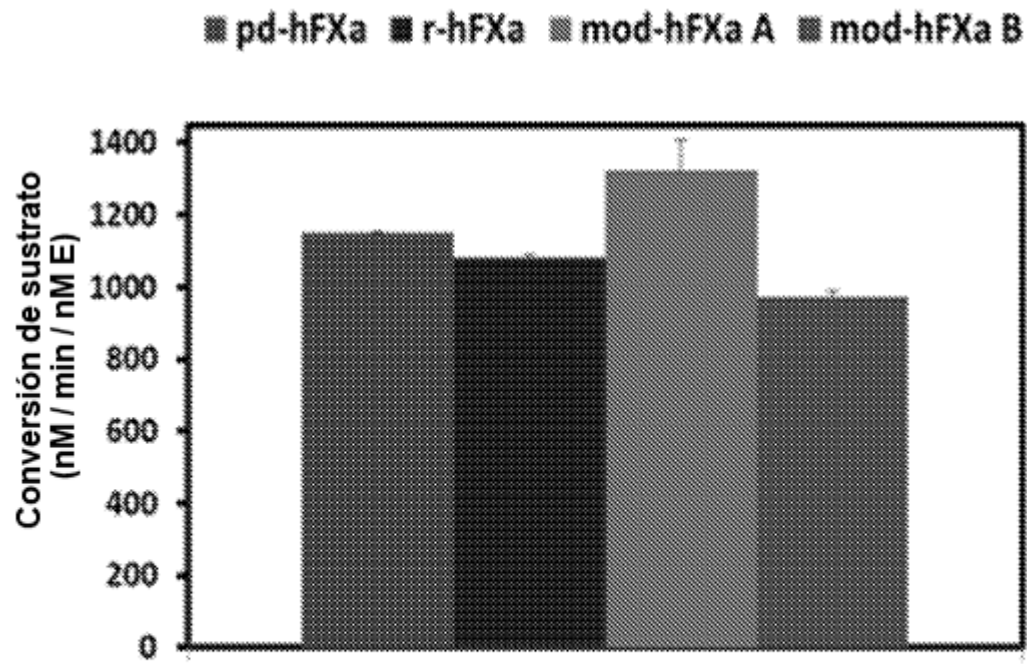


Fig. 4

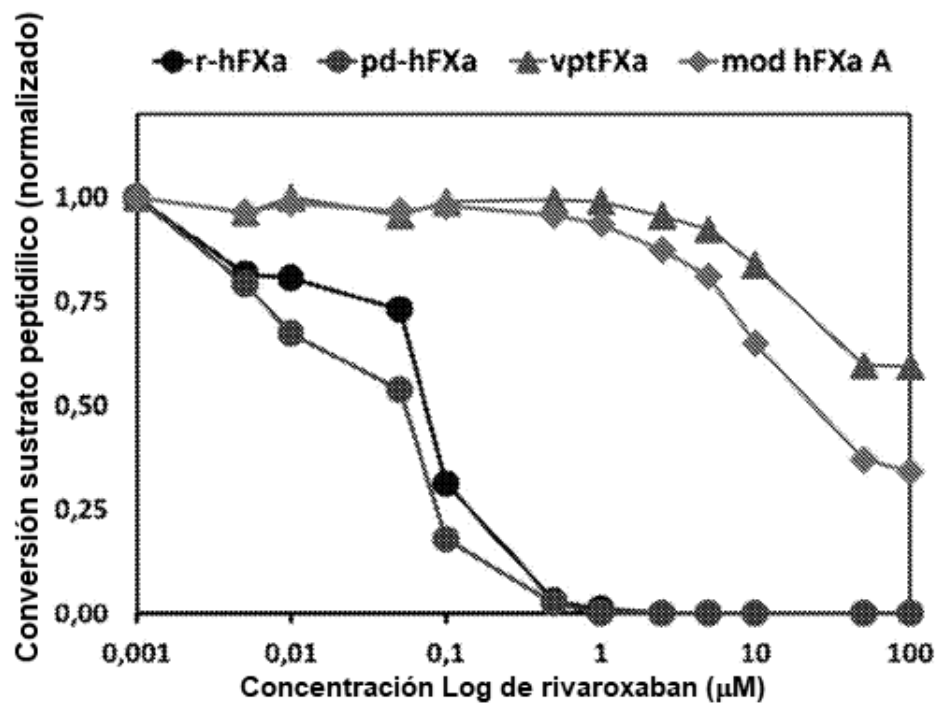


Fig. 5A

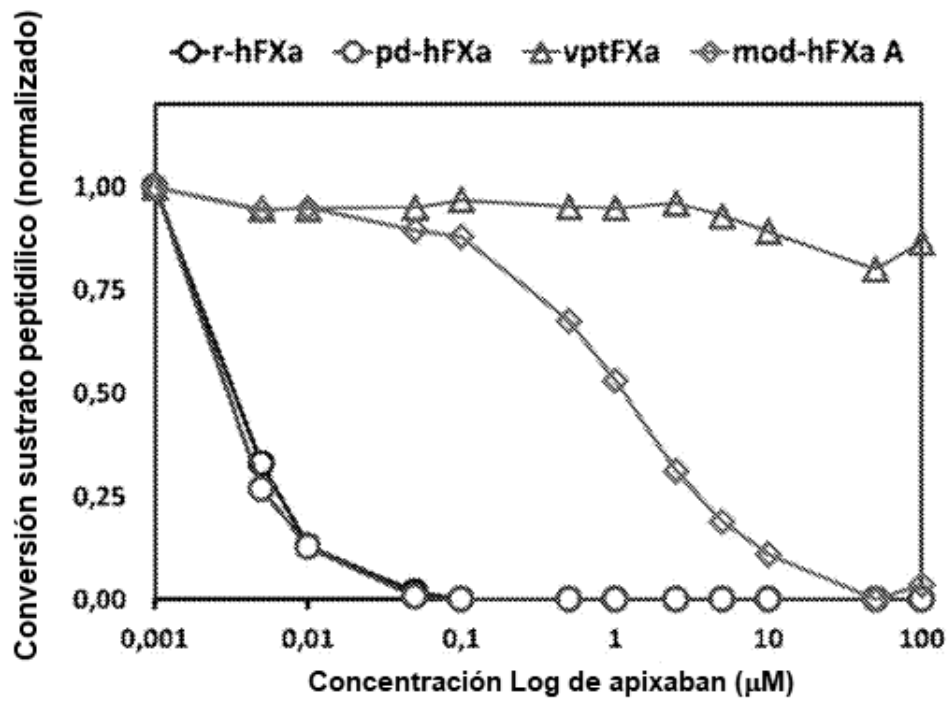


Fig. 5B

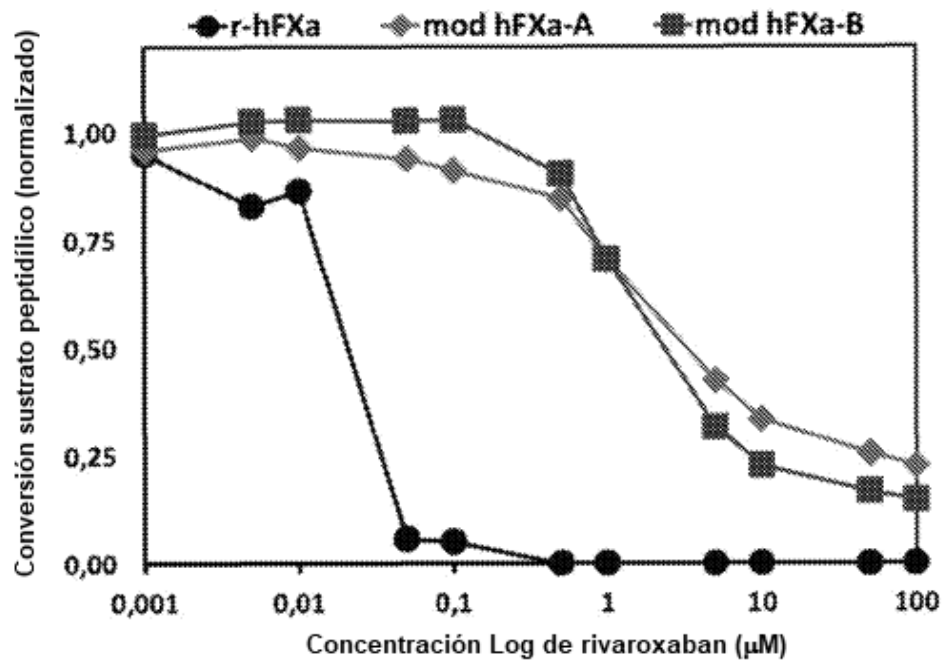


Fig. 6A

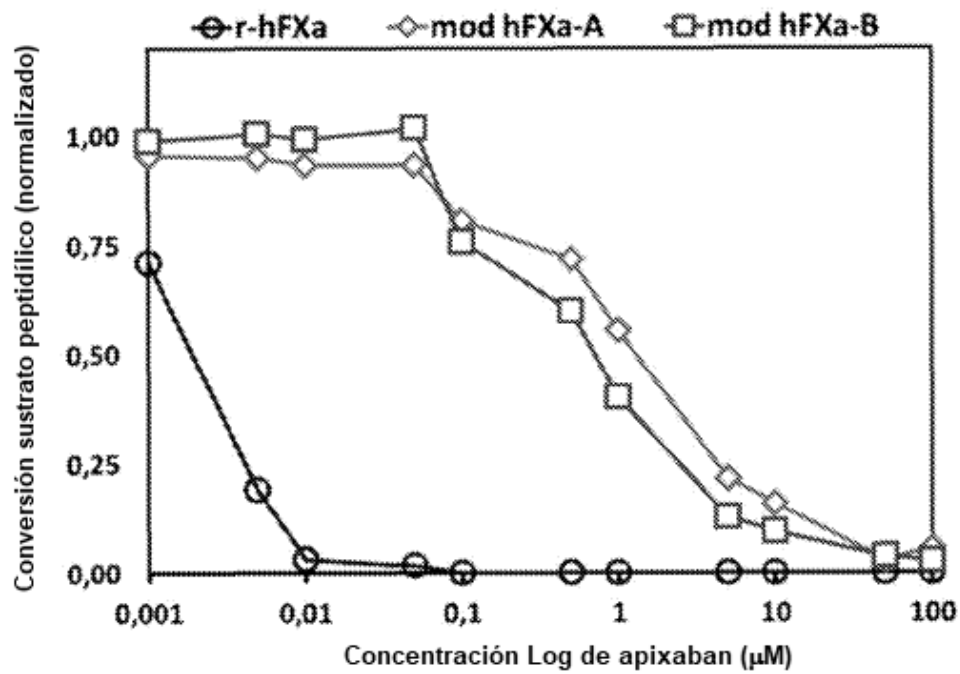


Fig. 6B

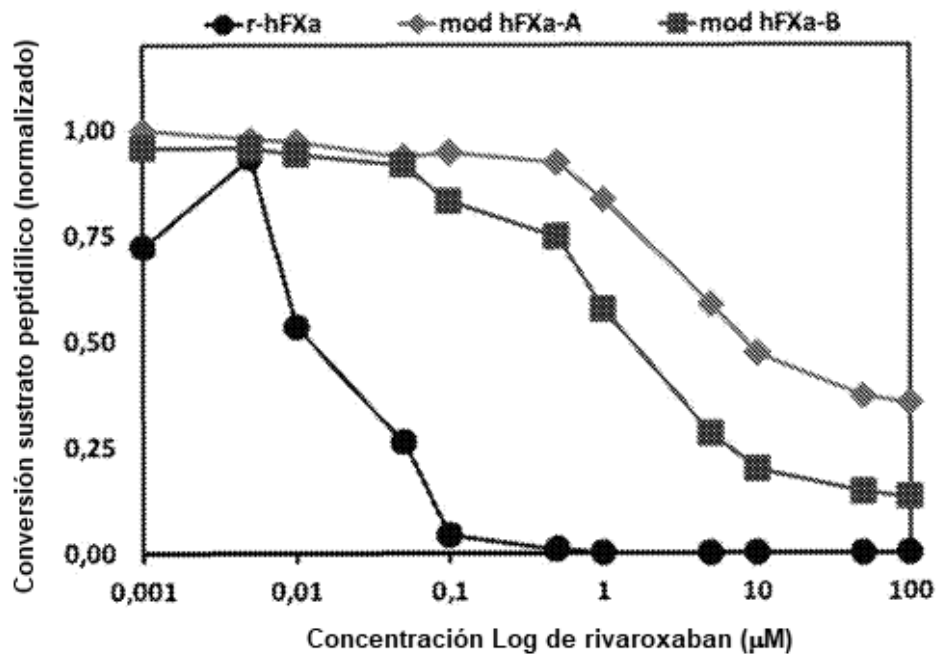


Fig. 7A

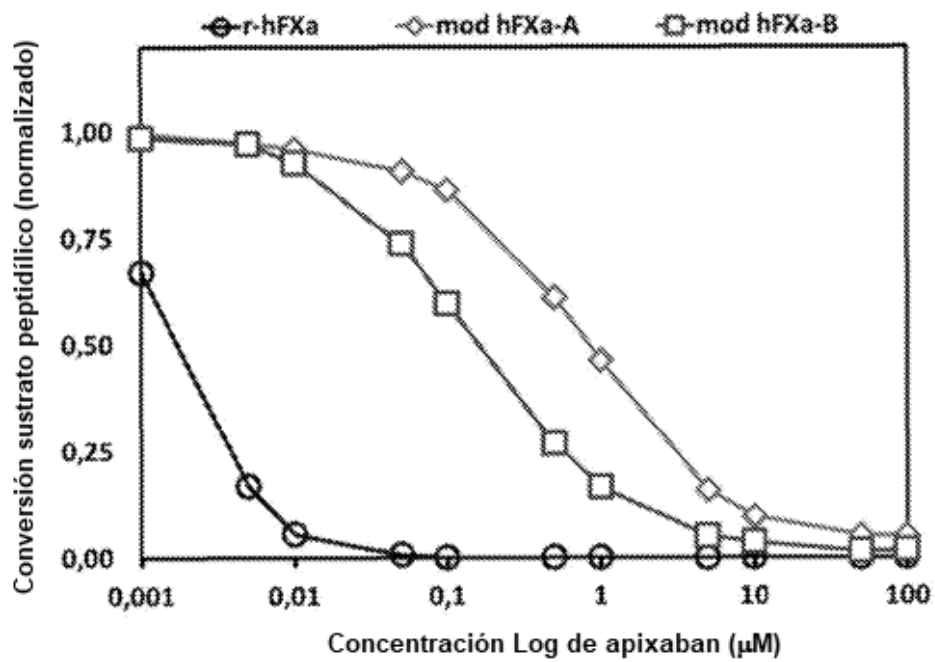


Fig. 7B

Fig. 8

YPCG	KQTLERRKRSVAQATS	SSGEAPDSITWKPYDAADLD	PTEPFLLDFNQTPERGDNLTIRIVGGQECKD	243
FPCG	KITGRRKRVSALNTS	DSELDLEDALL DEDFLS	PTEPIELLNLNETQPERSSDDLVRIVGGRECKD	240
YSCG	RRHMKRERRETKLHEN	DKNHTDSQNEVKMNQGTGL	PERNVTGINILN P NDPNVRIVGGRECSQ	236
FKCGVIYP	KKTRSIFFHTPNITESENEETELEATIEPVYNHNSPLNNQTDMS		FGLHELEIIQSEPILPVVSTAGDGRIVNGVECPP	254
FROGGIIT	ENVRTILRYRPNNTNGTKSDNSSSTNSTEQEDEFSSGTSQ		RKAHAASDHESMTMT RIVNGEDCPP	228
FSCG	RNIKTRNKREANLPDF	QTDQDFSDDYDEIDENNFTPTNFSGLVLTV	QSQNATLLKKSNDNPSPD IRVNGTDCKL	247
FSCGRNIKTRNKREANLPDF			VQSQNATLLKKSNDNPSPD IRVNGMDCKL	218
FSCGRNIKTRNKREASLPDF			VQSQNAPLLKISDNPSPD IRVNGMDCKL	218
FSCGRNIKARNKREASLPDF			VQSQKATLLKKSNDNPSPD IRVNGMDCKL	218
OG			R V G C	
GECPWQALLINEENEGFOGGTILSEFYILTAACHLYQAKRFKVRVGDNRNTEQEBGGEAVHEVEVVIKHNRFTE				TYD 320
GECPWQALLINEDNEGFCGGTILNEFYILTAACHLHQARRFKVRVGDNRNTEKEEGNEMVHEVDVVIKHNKFQRD				TYD 317
GECPWQALLVSDDEGFCGGTILSREFILTAACHMNQTKYFKVVVGELNTEKISEGTESIHKVEKIIMHPRFVKS				TYD 313
GDCPWQALLINENNMGFCGGTILTEHFILSAACHMNESLSIRVVVGEYDILVPEGREATHDVDEILIHKNYQPD				TYH 331
GECPWQAVLLNEEHWFQGGTILNDPIYILTAACHMNTRYFYIRLGESDMLNEGTEAMYEVETILAHYNYKPN				TYH 305
GECPWQALLNDEGDGFCGGTILSPIYVLTAAHCINQTKYITVVVGEIDISSKKTGR LHSVDKIYVHQKFVPA				TYD 323
GECPWQAAVLVDEKEGVFCGGTILSPIYVLTAAHCINETETISVVVGEIDKSRIETGP LLSVDKIYVHKKFVPQKAYKFDLA				AYD 303
GECPWQAAVLVDKKGVCFCGGTILSPIYVLTAAHCINETETISVVVGEIDRSRAETGP LLSVDKIYVHKKFVPFKKSQEFYKFDLVSYD				307
GECPWQAVLINEKGEVFCGGTILSPIHVLTAAHCINQTKSVSVIVGEIDISRKETRR LLSVDKIYVHTKFVPPNYYVHHQNFDRV				AYD 306
G CPWQA L	FOGGTIL	L AAHC	<u>G</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>YD</u>	

Fig. 8, continuación

```

FDIAVLRLKTPITFRMNVAPACLPERDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSTRLMLEVPYVDRNSCKLSSFIITQNMFCAGYDTK 410
YDIAVLRLKTPITFRMNVAPACLPQKDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSNILKMLEVPYVDRNTCKLSTFSITQNMFCAGYEAK 407
YDIAVIKLEAINFTENIIPACIPDPEFADQVLMNEPDAMVSGFGRIHERGROASTLQMLQVPYIKRHSCKESSTFAITENMFCAGFDTE 403
NDIALIKLSKPIKFTKYIIPACLPKFAERVLMMQDDGLVSGFGRVREGGLSSTILQKLTVPYVNRKACIESSNFKISGRMFCAGYDQE 421
NDIALIKLTKPIKYSRIFLPA CIPEQEFAESVLMQSDGMSGFRGCGNRQTSPIKRLTIPYVERRTCMESTSLRISARMFAGYDEI 395
YDIAIQLKTPIQFSENVVAPACLPADTADFANQVLMKQNFQIVSGFGRTREGRKTSNTLKVVTLPYVDRHTCMLSSNFPITQNMFCAGYDTL 413
YDIAIQLKTPIQFSENVVAPACLPADTADFANQVLMKQDFGIVSGFGRIFEKGPKSNTLKVLPYVDRHTCMVSSSETPITFNMFCAGYDTL 393
YDIAIQLKTPIQFSENVVAPACLPADTADFANQVLMKQDFGIVSGFGRIFEKGPKSNTLKVLPYVDRHTCMVSSSETPITFNMFCAGYDTL 397
YDIAIQLKTPIQFSENVVAPACLPADTADFANQVLMKQDFGIVSGFGRIFEKGPKSNTLKVLPYVDRHTCMVSSSETPITFNMFCAGYDTL 396
DIA I I PAC P A LM SGFG L PY R C S I MFCAG

QEDACQGDSSGPHVTRFKDITYFVTGIVSWGEGCARKGKYGIYTKVTAFLKWIDRSMKTRGLPKAKSHAPEVITSSPLK 488
LEDACQGDSSGPHVTRFKNTYTYVTGIVSWGEGCARKGKYGIYTKVTTFLKWIDRSMKARVGPTAET PRTA GPPN 481
VKDACQGDSSGPHVTPFKGTIFYVTGIVSWGEGCARKGKFGVYTKVSKLHRWLKGVLLKNQV 464
EKDACQGDSSGPHVTRFKNTWFTIGVVKLGRVRAQ GE IRELHTGLQIHHDVQ 474
AKDACQGDSSGPHVTRYSRSTIFYVTGIVSWGEGCAQKGYGVYTVQVSKYIRNIRDGINTLIPKGQSTRLKRHYGPIRRIVG 475
PQDACQGDSSGPHITAYRDTHTFITGIVSWGEGCAQTKGYGVYTKVSKFILWIKRIIRQKQPSTESSTGRL 483
PRDACQGDSSGPHITVYRDTHTFITGIVSSGEGCARNKGYIYTKLSKFIPWIKRIMRQKLPSTESSTGRL 463
PQDACQGDSSGPHITAYRDTHTFITGIVSWGEGCARKGRYGIYTKLSKFIPWI 449
PQDACQGDSSGPHITAYRDTHTFITGIIISWGEGCARKGKYGVYTKVSRFIPWIKKIMSLK 455
DACQGDSSGPH T T TG G G

```

Fig. 8, continuación

Figura 9

<i>hFX:</i>	H ₉₁	-	NRFTK-----ET	-	Y ₉₉
<i>C-FX A:</i>	H ₉₁	-	KKFVPPKKSQEFYEKFDLAA	-	Y ₉₉
<i>C-FX B:</i>	H ₉₁	-	KKFVPPPNYYV-HQNFDLAA	-	Y ₉₉
<i>C-FX C:</i>	H ₉₁	-	KKFVPPQKAYK-----FDLAA	-	Y ₉₉

Figura 10

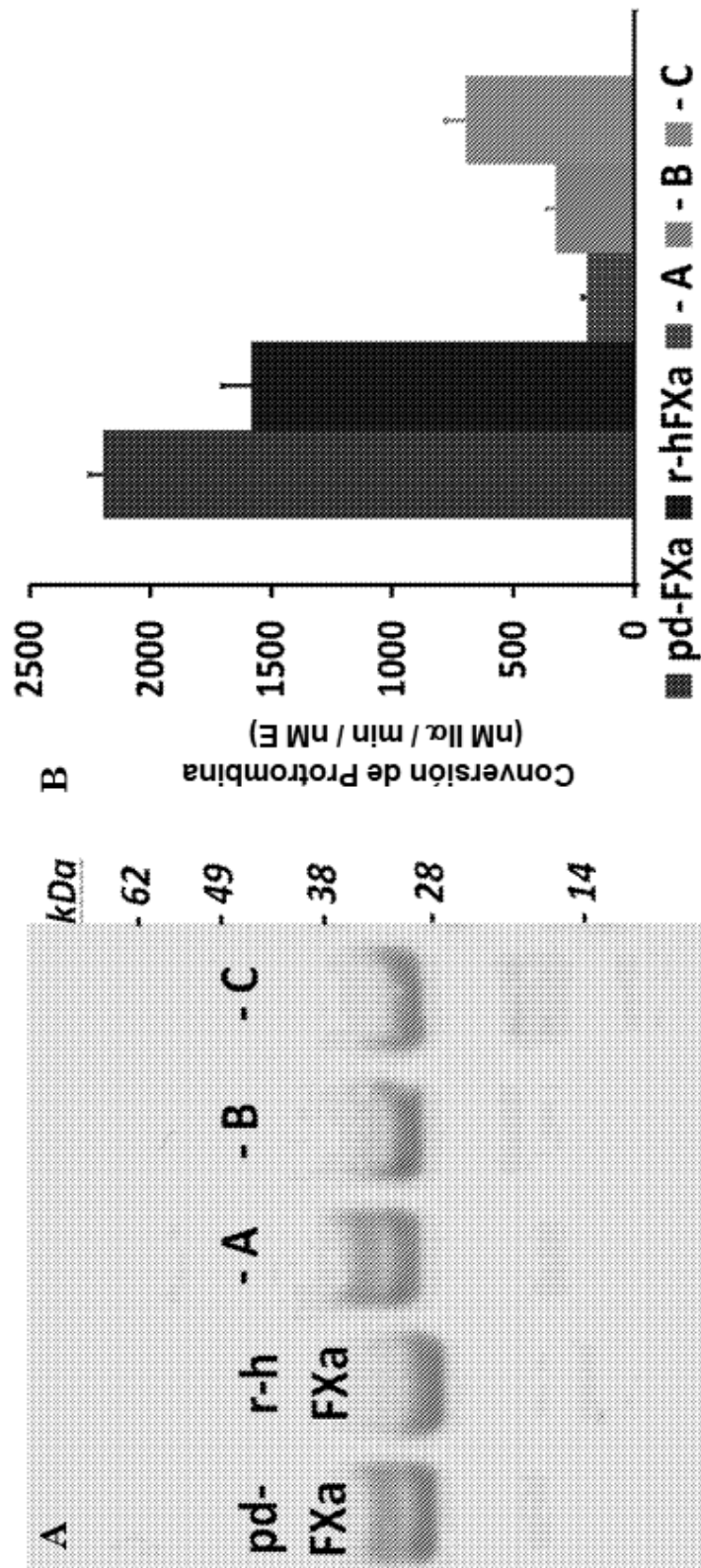


Figura 11

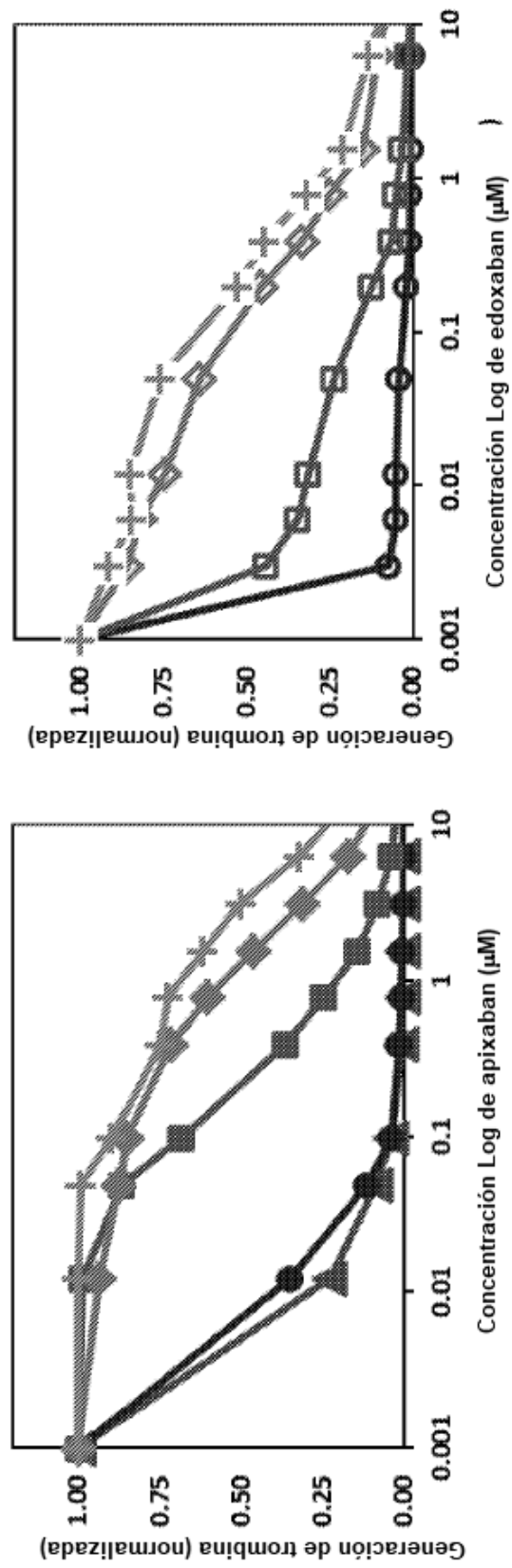


Figura 12

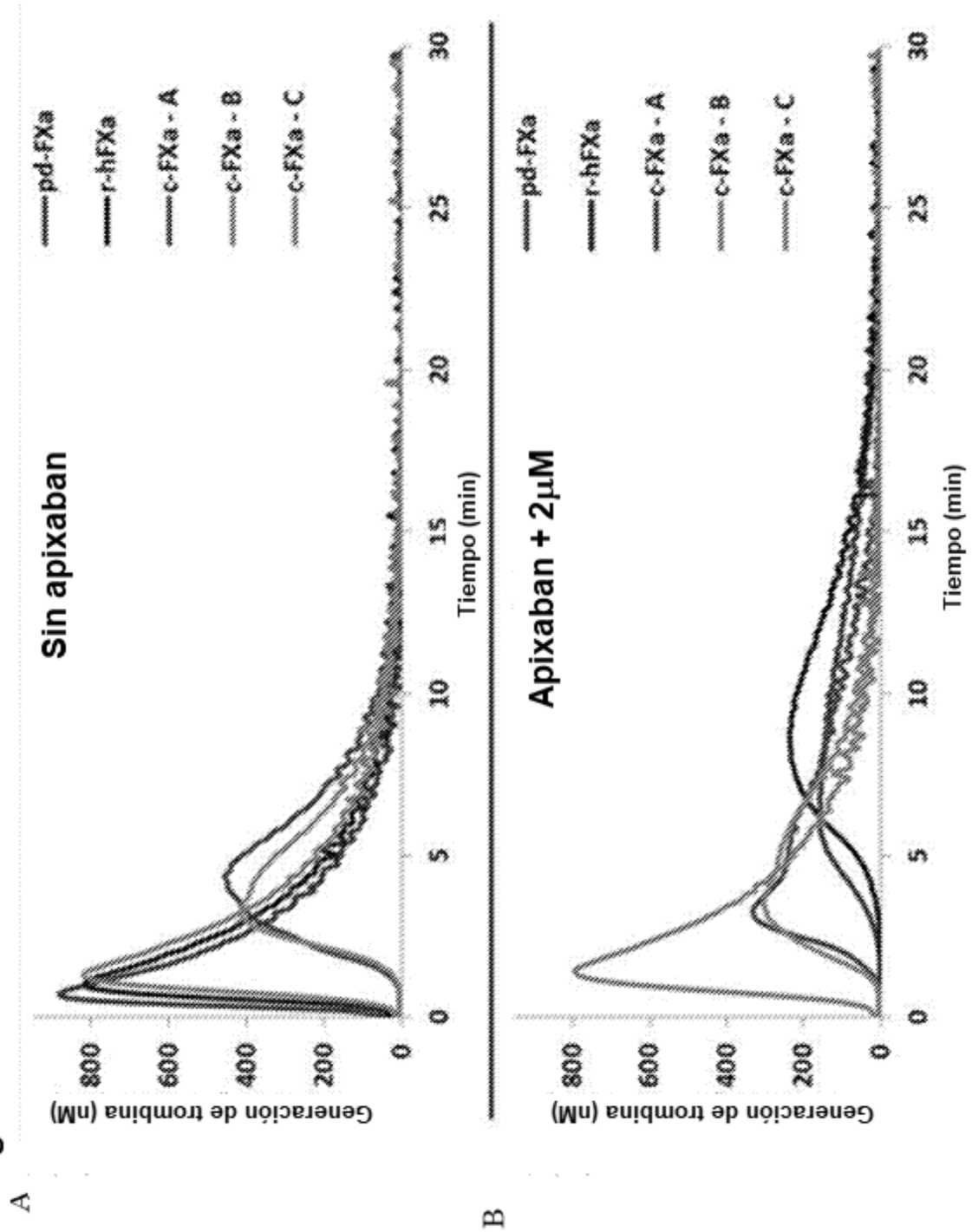


Figura 13

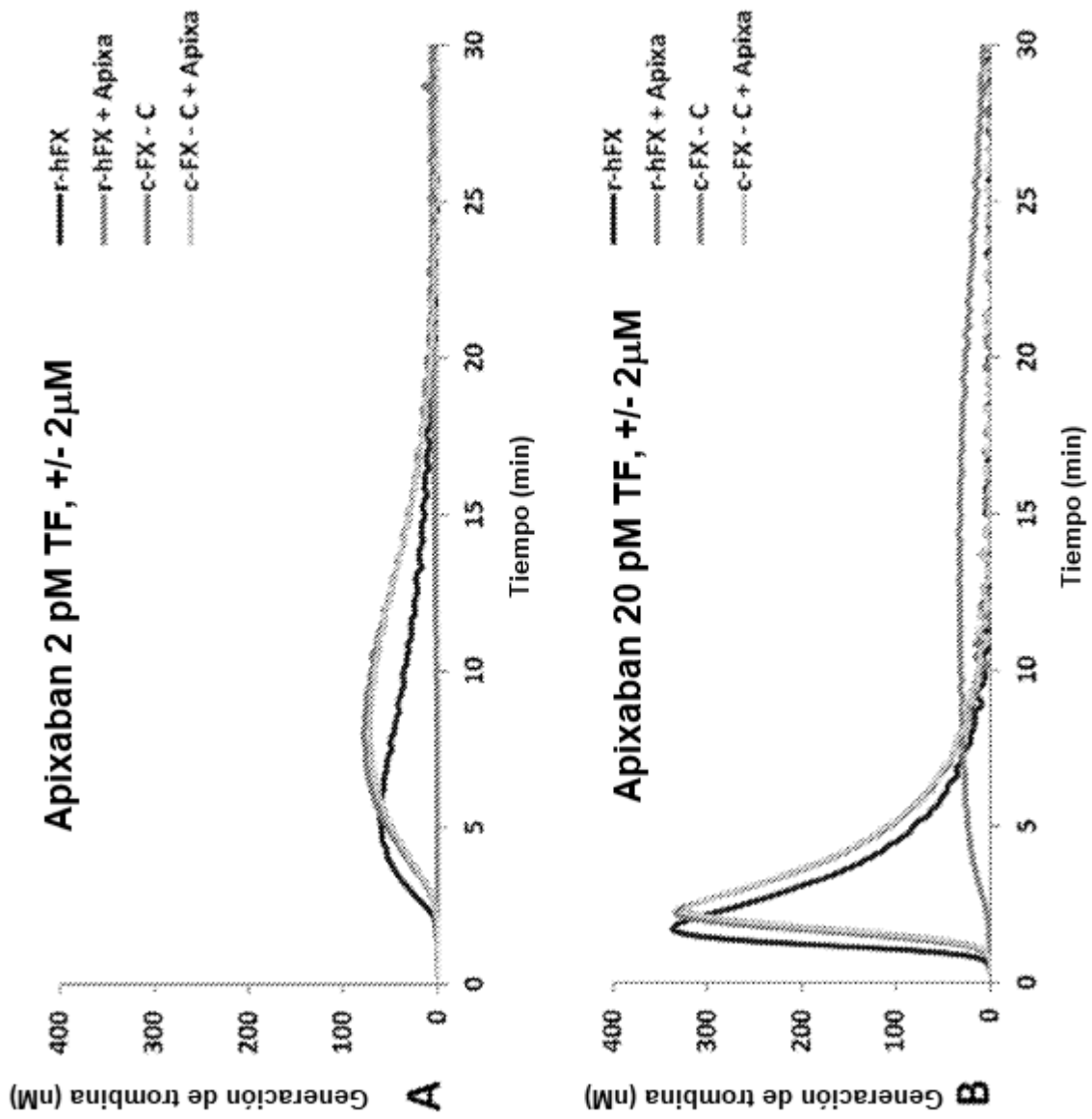


Figura 14

