



No. 12-014068- -00000-0000

Fecha: 2012-01-30 16:56:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 119

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO **POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR IX**
MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE **BAYER HEALTHCARE LLC**

DOMICILIO **NEW YORK, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

74. APODERADO **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**

22. BOGOTA, D.C., _____

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-014068- -00000-0000

Fecha: 2012-01-30 16:56:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 119

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

☒ Patente de Invención

SOLICITUD DE:

☐ Patente de Modelo de Utilidad☒ Capítulo I☐ Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **BAYER HEALTHCARE LLC**
Dirección: **555 White Plains Road, Tarrytown, New York 10591, USA**
Nacionalidad o domicilio: **NEW YORK, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**
Lugar de Constitución: **NEW YORK, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**
Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual: _____

Número:

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**
Dirección: **Avda. Carrera 24 No. 37 - 31 Of. 202**
BOGOTA D.C., COLOMBIA
Teléfono: **2444096** Fax: **2442496**
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cuál

Número: 19.270.955 T.P. 43.308 C.S.
BOGOTA

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre:
Dirección: **VER HOJA ANEXA**
Nacionalidad o Domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US10/044177**Fecha: **02 - 08 - 10**Publicación Internacional No. **WO 2011/014890 A1**Fecha: **03 - 02 - 11**

6

Título (54)

POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR IX MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS

7

Clasificación internacional (51) _____

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐**US****31/07/2009****61/230,551**

9

Comprobante de pago No.

Fecha:

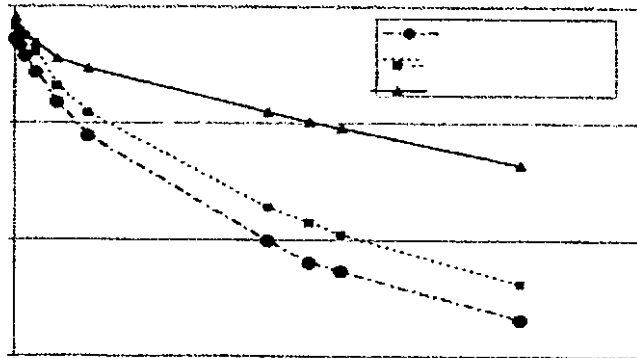
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

INVENTORES

- 1) **BROOKS, Alan**
8018 Kelok Way, Clayton,
California 94517, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Nacionalidad: Británica
- 2) **PATEL, Chandra**
540 Trinidad Lane, Foster City
California 94404, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Nacionalidad: Estadounidense
- 3) **JIANG, Xiaoqiao**
4525 Shellflower Court, Concord,
California 94518, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Nacionalidad: Estadounidense
- 4) **GRITZAN, Uwe**
D- , ALEMANIA
Nacionalidad: Alemana
- 5) **APELER, Heiner**
Neuer Triebel 71
42111 Wuppertal, ALEMANIA
Nacionalidad: Alemana
- 6) **WANG, Jun**
1828 Ivanhoe Avenue Lafayette,
California 94549, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Nacionalidad: Estadounidense

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12X12 cm.
- ☐ De ser el caso, información de otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas total o parcialmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional, Nuevas Reivindicaciones
- ☐ Otros: Informe de Búsqueda de Antecedentes Internacional junto con la traducción
- ☒ Publicación Internacional No. WO 2011/014890 A1

FIGURA CARACTERISTICA



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

FIRMA:

C.C. 19.270.955 BOGOTÁ T.P. 43.308 C.S.J.

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SANTOS, Fernando
800 Dwight Way
Berkeley, California 94710
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 02 September 2010 (02.09.2010)	
Applicant's or agent's file reference BHC 10 5 004	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2010/044177	International filing date (day/month/year) 02 August 2010 (02.08.2010)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 31 July 2009 (31.07.2009)
Applicant BAYER HEALTHCARE LLC et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
31 July 2009 (31.07.2009)	61/230,551	US	23 August 2010 (23.08.2010)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nora Lindner e-mail pt11.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 11
Facsimile No. +41 22 338 82 70	

AP 17033
COLOMBIA

The Undersigned Juan Pedro Vallejo, citizen, adult and living in Madrid, Spain, in my position of legal Representative of the company **Bayer HealthCare LLC** with headquarters in **555 White Plains Road, Tarrytown, New York, USA** which was initially incorporated at Japan, grant ample an sufficient power of attorney to: **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS** and/or **CLEMENCIA DELGADO VILLEGAS**, attorneys, adults, residing in Bogotá (Colombia), so that on our behalf and representation, carry out in Colombia and in any other Countries all types of errands an especial procedures for the registration and renewal of all kinds of Product and Service trademarks, deposits of name and commercial logotype, industrial models and drawings, invention patents, utility models, Integrated circuits, name of domain, Copyrights, plant varieties, agricultural, veterinary and sanitary registries, capacity certificates, renewal, modification, transfer, assignment and expansions and to be responsible as general attorneys, for the supervision of all matters related to industrial and Intellectual property, being empowered to present and withdraw objections, to present appeals, to request testimonies, to receive documents, to pay legal fees, to approve exploitations, to agree on transactions on trademark agreements with third parties of legal entities, to abandon action, to substitute and to carry out all the necessary actions before any administrative authority of the aforementioned purposes' in the event that such procedures shall be transferred unto a judicial field, the legal representatives are authorized to act as plaintiff or defendant before the competent authorities, having an ample power to settle, to submit to arbitration, to waive, to present appeals and all other necessary special faculties.

For that purpose, I kindly request to grant ample powers to our attorneys, who shall be able to exercise the functions independently or collectively.

The present power of attorney revokes and cancels any other previous powers of attorney given by the Company in the territory of the Colombian Republic.

Sincerely,

ID Card No.

issued in

Notarial Certificate:

The undersigned Notary Public certifies that the preceding signature reading Juan Pedro Vallejo is authentic: that signer is legal representative of **Bayer HealthCare LLC** and that he is empowered to grant this power, and that said Company exists and is duly organized in accordance with the laws of Japan.

All the foregoing facts are known to the Notary due to his having examined the respective documents to wich he, the Notary, attests.

Granted and signed, at Madrid, on April 06, 2011

Notary Public.

This Power of Attorney should be authenticated with the filed Notarial certificate and legalized by Apostille or by the Colombian Consulate.

Atentamente se dirige a usted Juan Pedro Vallejo,

TP 2 1110 4
061051M
Wot + AP
3015 722

mayor de edad y residente en Madrid, España, para manifestarle que en mi condición de Representante legal de la firma **Bayer HealthCare LLC** domiciliada en **555 White Plains Road, Tarrytown, New York, USA**, y constituida inicialmente en Japón, confiero poder general, amplio y suficiente a los Dres. **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**, y/o **CLEMENCIA DELGADO VILLEGAS**, Abogados, mayores y vecinos de Bogotá, D.C. (Colombia), para que en nuestro nombre y representación adelanten en Colombia y en otros países toda clase de diligencias y procedimientos especiales para el Registro y Renovación en su Despacho, de toda clase de Marcas de Producto y Servicio, Depósitos de Nombre y Enseña Comercial, Diseños Industriales y Patentes de Invención, Patentes modelo de Utilidad, Esquemas de Circuitos integrados, Nombres de dominio, Derechos de Autor, Variedades vegetales, registros agrícolas, veterinarios y sanitarios, certificados de capacidad, renovación, modificación, traspaso y ampliación de los mismos y atiendan como Apoderados generales todo asunto referente a la Propiedad Industrial e intelectual, quedando facultados para presentar y retirar Oposiciones, interponer recursos, solicitar testimonios, recibir documentos, cancelar costos legales, probar explotaciones, aceptar transacciones, llegar a acuerdos marcarios con terceras personas o entidades jurídicas, desistir, sustituir y hacer cuanto fuere necesario ante cualquier autoridad administrativa para los fines arriba indicados; y en caso de que el procedimiento debiera pasar a conocimiento judicial, quedan facultados para actuar como demandantes o demandados ante los Jueces que sean competentes, con poder amplio, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, interponer recursos y con todas las demás facultades especiales que fueren necesarias.

Con éste objeto, ruego le confieran personería suficiente a nuestros Apoderados quienes podrán obrar en forma conjunta o independiente e incluso sustituir el presente poder.

Atentamente,

DNI

expedido en

Certificación Notarial:

El infrascrito Notario Público certifica que la firma que antecede y dice Juan Pedro Vallejo es auténtica: que el firmante es representante legal de **Bayer HealthCare LLC** que tiene facultad para otorgar este poder y que dicha compañía existe y está debidamente organizada de conformidad con las Leyes de Japón.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado Madrid, el 06 de Abril de 2011.

Notario Público.

Autenticarlo ante Notario con el lleno de la Certificación Notarial y refrendarlo por Apostilla o Consulado.

TESTIMONIO DE LEGITIMACIÓN DE FIRMA EN VIRTUD
DEL ARTÍCULO 207 DEL REGLAMENTO NOTARIAL.- Yo,
SALVADOR MIRAS GÓMEZ, Notario de Madrid, LEGITIMO
la firma y rúbrica que antecede de: -----

-----DON JUAN PEDRO VALLEJO LÓPEZ,-----

, estampada en el documento que antecede y declarando que la
misma es la suya, del que ha quedado constancia por acta auto-
rizada por mi conforme al artículo 207 del Reglamento Notarial
el día doce de abril de dos mil once, bajo el número 722 de
orden de mi Protocolo. -----

Madrid, a trece de abril de dos mil once. -----

SELLO DE
LEGITIMACIONES Y
LEGALIZACIONES



0152569224

El presente folio es el agregado al documento en el que figura la firma de
D./D^a D. Salvador Miras Gómez
de fecha 13/04/2011

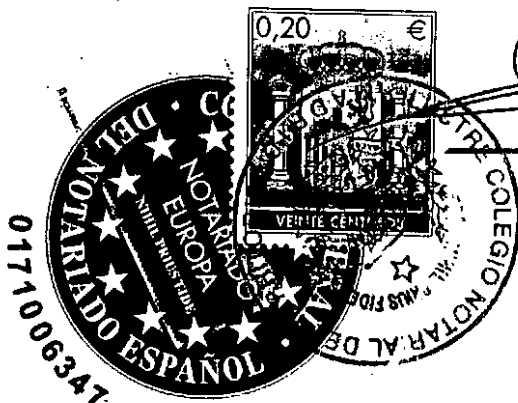


Apostille (o legalización única)
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: España
El presente documento público
2. Ha sido firmado por
D. Salvador Miras Gómez
3. Actuando en calidad de NOTARIO
4. Se halla sellado/timbrado con el de su Notaría
5. En Madrid
6. El 13 de Mayo de 2011
7. Por el Decano del Colegio Notarial de Madrid
8. Con el numero
9. Sello/timbre
10. Firma:

CERTIFICADO

36021



Don Ángel Sanz Iglesias
Firma delegada del Decano

RJ8780315

POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR IX MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS**REFERENCIA CON SOLICITUDES RELACIONADAS**

La presente solicitud reivindica prioridad con respecto a la Solicitud
5 Provisional de los Estados Unidos N° de Serie 61/230.551 presentada el 31 de
julio del 2009 e incorporada en el presente documento por referencia para
todos los fines

CAMPO

La presente solicitud se refiere a polipéptidos del Factor IX modificados,
10 por ejemplo, polipéptidos del Factor IX que presentan actividad específica
aumentada y polipéptidos del Factor IX conjugados con polímeros. La presente
solicitud también se refiere a procedimientos para fabricar polipéptidos del
Factor IX modificados y conjugados de los mismos y a procedimientos para
usar polipéptidos del Factor IX modificados, por ejemplo, para tratar pacientes
15 que padecen hemofilia B.

ANTECEDENTES

La hemofilia B afecta a uno de 34.500 varones y se produce por diversos
defectos genéticos en el gen que codifica el Factor IX (FIX) de coagulación que
da como resultado la disminución o que no pueda detectarse la proteína FIX en
20 sangre (Kurachi, y col., Hematol. Oncol. Clin. North Am. 6:991-997, 1992;
Lillicrap, Haemophilia 4:350-357, 1998). Niveles insuficientes de FIX conducen
a defectos en la coagulación y a síntomas que son el resultado de un sangrado
no controlado. La hemofilia B se trata eficazmente por infusión intravenosa de
proteína FIX derivada de plasma o recombinante para detener el sangrado que
25 ya se ha iniciado o para prevenir que se produzca el sangrado (profilaxis)

Dargaud, y col., Expert Opin. Biol. Ther. 7:651-663; Giangrande, Expert Opin. Pharmacother. 6:15 17-1524, 2005). La profilaxis eficaz requiere el mantenimiento de un nivel de concentración mínima de FIX de aproximadamente el 1% de niveles normales (Giangrande, Expert Opin. Pharmacother. 6:15 17-1524, 2005). Como la semivida de FIX nativo (derivado de plasma o recombinante) es de aproximadamente 18 a 24 horas, los niveles de FIX disminuyen a menos del 1% de los niveles normales entre 3 y 4 días después de la inyección en embolada lo que requiere repetir inyección sobre un promedio cada tres días para conseguir la profilaxis eficaz (Giangrande, Expert Opin. Pharmacother. 6:1517-1524, 2005). Dicha inyección intravenosa frecuente es problemática para los pacientes y es difícil de conseguir una profilaxis eficaz (Petrini, Haemophilia 13 Supl 2:16-22, 2007), especialmente en niños. Una proteína FIX con una actividad específica aumentada tiene el potencial de aumentar la duración de protección y por tanto, ser de beneficio médico significativo.

SUMARIO

La solicitud proporciona polipéptidos FIX (denominados también polipéptidos FIX modificados, muteínas FIX o variantes FIX) que comprenden secuencias de aminoácidos que se han modificado para mejorar la actividad específica de FIX. En algunas realizaciones, se han introducido una o más sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, los polipéptidos tienen actividad coaguladora. En algunas realizaciones, los polipéptidos FIX modificados pueden comprender al menos una sustitución en los restos de aminoácidos 85, 86, 87, 338 y 410.

Los polipéptidos FIX modificados pueden generarse por la introducción

de una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, por sustitución con cualquier aminoácido. Las realizaciones ejemplares incluyen polipéptidos FIX que comprenden una o más sustituciones, tales como, pero sin limitación:

- (a) D85F; D85G; D85H; D85I; D85M; D85N; D85R; D85S; D85W; D85Y; V86A; V86D; V86E; V86G; V86H; V86I; V86L; V86M; V86N; V86P; V86Q; V86R; V86S; V86T; T87F; T87I; T87K; T87M; T87R; T87V; T87W; R338A; R338F; R338I; R338L; R338M; R338S; R338T; R338V; R338W; E410N; E410Q;
- (b) D85W y T87R; D85F y T87I; D85W y T87W; D85R y T85R; D85I y T87R; D85Y y T87F; D85I y T87M; D85F y T87R; D85F y T87V; D85R y T87K; D85H y T87I; D85I y T87I; D85Y y T87K; D85S y T87R; D85Y y T87R; D85G y T87K; D85H y T87W; D85H y T87K; D85F y T87K; D85H y T87V; D85M y T87I; D85H y T87M; R338A y E410N; R338A y E410Q;
- (c) D85W, V86A y T87R; D85F, V86A y T87I; D85W, V86A y T87W; D85R, V86A y T85R; D85I, V86A y T87R; D85Y, V86A y T87F; D85I, V86A y T87M; D85F, V86A y T87R; D85F, V86A y T87V; D85R, V86A y T87K; D85H, V86A y T87I; D85I, V86A y T87I; D85Y, V86A y T87K; D85S, V86A y T87R; D85Y, V86A y T87R; D85G, V86A y T87K; D85H, V86A y T87W; D85H, V86A y T87K; D85F, V86A y T87K; D85H, V86A y T87V; D85M, V86A y T87I; D85H, V86A y T87M;
- (d) D85W, V86A, T87R y R338A; D85F, V86A, T87I y R338A; D85W, V86A, T87W y R338A; D85R, V86A, T85R y R338A; D85I, V86A, T87R y R338A; D85Y, V86A, T87F y R338A; D85I, V86A, T87M y R338A; D85F, V86A, T87R y R338A; D85F, V86A, T87V y R338A; D85R, V86A, T87K y R338A; D85H, V86A, T87I y R338A; D85I, V86A, T87I y R338A; D85Y, V86A, T87K y R338A; D85S, V86A, T87R y R338A; D85Y, V86A, T87R y R338A; D85G, V86A, T87K

y R338A; D85H, V86A, T87W y R338A; D85H, V86A, T87K y R338A; D85F, V86A, T87K y R338A; D85H, V86A, T87V y R338A; D85M, V86A, T87I y R338A; D85H, V86A, T87M y R338A;

(e) D85W, V86A, T87R, R338A y E410N; D85F, V86A, T87I, R338A y E410N;

- 5 D85W, V86A, T87W, R338A y E410N; D85R, V86A, T85R, R338A y E410N; D85I, V86A, T87R, R338A y E410N; D85Y, V86A, T87F, R338A y E410N; D85I, V86A, T87M, R338A y E410N; D85F, V86A, T87R, R338A, y E410N; D85F, V86A, T87V, R338A y E410N; D85R, V86A, T87K, R338A, y E410N; D85H, V86A, T87I, R338A, y E410N; D85I, V86A, T87I, R338A y E410N; D85Y, V86A, T87K, R338A y E410N; D85S, V86A, T87R, R338A y E410N; D85Y, V86A, T87R, R338A y E410N; D85G, V86A, T87K, R338A y E410N; D85H, V86A, T87W, R338A y E410N; D85H, V86A, T87K, R338A y E410N; D85F, V86A, T87K, R338A y E410N; D85H, V86A, T87V, R338A y E410N; D85M, V86A, T87I, R338A y E410N; D85H, V86A, T87M, R338A y E410N; D85W, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85F, V86A, T87I, R338A y E410Q; D85W, V86A, T87W, R338A, y E410Q; D85R, V86A, T85R, R338A y E410Q; D85I, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85Y, V86A, T87F, R338A y E410Q; D85I, V86A, T87M, R338A y E410Q; D85F, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85F, V86A, T87V, R338A y E410Q; D85R, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87I, R338A y E410Q; D85I, V86A, T87I, R338A y E410Q; D85Y, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85S, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85Y, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85G, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87W, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85F, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87V, R338A y E410Q; D85M, V86A, T87I, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87M, R338A y E410Q; y cualquier

combinación de los mismos.

La solicitud también proporciona conjugados de polipéptidos FIX que comprenden secuencias de aminoácidos que se han modificado para mejorar la actividad específica de FIX y uno o más restos poliméricos unidos covalentemente al polipéptido FIX. En algunas realizaciones, los restos poliméricos están unidos covalentemente a restos de azúcar en el polipéptido FIX, en el que los restos de azúcar se unen de manera natural al péptido durante la expresión en células de mamíferos.

La solicitud también proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos FIX modificados y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La solicitud también proporciona procedimientos para tratar la hemofilia B que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de las preparaciones farmacéuticas descritas en el presente documento.

La solicitud también proporciona secuencias de ADN que codifican polipéptidos modificados, así como células huéspedes eucariotas transfectadas con las secuencias de ADN.

La solicitud también proporciona procedimientos para producir polipéptidos FIX modificados que comprenden (i) la modificación de la secuencia de aminoácidos del polipéptido introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos; (ii) la expresión del polipéptido, por ejemplo, en una línea celular de mamífero; y (iii) la purificación del polipéptido.

La solicitud también proporciona un conjugado que comprende a) un polipéptido del factor IX que comprende una secuencia de aminoácidos que se

ha modificado introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos, en la que al menos una sustitución de aminoácido es en el resto 338; b) uno o más restos de azúcar unidos a dicho uno o más sitios de glucosilación y c) uno o más restos poliméricos unidos covalentemente a uno o más restos de azúcar.

- 5 La solicitud también proporciona un procedimiento para mejorar la conjugación de un resto polimérico con un polipéptido que comprende: a) proporcionar un polipéptido que posea uno o más sitios de glucosilación, en el que el sitio de glucosilación comprenda uno o más ácidos siálicos; b) oxidar dichos ácidos siálicos de dicho polipéptido; c) proporcionar un catalizador y d)
- 10 unir covalentemente un resto polimérico, que comprenda un grupo amino-oxi funcional, a dichos ácidos siálicos oxidados.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa un gráfico que muestra un perfil farmacocinético de dosis normalizada de FIX-R338A glucoPEGilado, FIX-R338 y FIX de tipo

15 silvestre recombinante en ratas normales.

La Figura 2 representa un gráfico que muestra un perfil farmacocinético de FIX-R338A glucoPEGilado, FIX-R338A y rFIX en ratones con Hemofilia B.

La Figura 3 representa un gráfico que muestra una actividad de FIX en el plasma de ratones con Hemofilia B después de inyección intravenosa de rFIX,

20 FIX-R338A o FIX-R338A glucoPEGilado.

La Figura 4 muestra un análisis de evolución en el tiempo por SDS-PAGE de la reacción de PEGilación con y sin catalizador.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente solicitud proporciona polipéptidos FIX que incluyen una o

25 más sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, los polipéptidos FIX

modificados pueden comprender al menos una sustitución en los restos de aminoácidos 85, 86, 87, 338 y 410. Los polipéptidos FIX modificados pueden tener una actividad específica aumentada que proporcionaría, por ejemplo, un límite de protección prolongado contra el sangrado en pacientes con hemofilia

- 5 B. Los polipéptidos FIX modificados permitirían, a los pacientes con hemofilia B, conseguir una protección contra el sangrado con menos inyecciones de FIX de las que son posibles en comparación con la terapia actualmente disponible de proteína FIX de tipo silvestre.

El Factor VII (FVII) activado inicia el proceso hemostático normal
10 mediante la formación de un complejo con el factor tisular (FT), expuesto como resultado de una lesión en la pared de los vasos. El complejo posteriormente activa a FIX; la forma activa se denomina FIXa. La activación del péptido de FIX se elimina por escisión proteolítica en dos sitios mediante el Factor XIa (FXIa) o el complejo factor tisular (FT)/Factor VIIa para generar la molécula
15 catalíticamente activa, el Factor IXa (FIXa). FIXa y el Factor VIIIa (FVIIIa) convierten al FX en Factor Xa (FXa), que a su vez convierte la protrombina en trombina. Después la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina dando como resultado la formación de un coágulo de fibrina.

Como el FIX de tipo silvestre posee numerosas modificaciones post-
20 traduccionales, se ha sugerido que algunas de estas desempeñan una función en el perfil farmacocinético *in vivo*. Una vez producido, FIX debe conservar la actividad enzimática e interactuar con FVIII, FXI y FX para ser un tratamiento eficaz para la hemofilia B. La introducción de aminoácidos sustituidos no debe perturbar estas interacciones y función. La solicitud proporciona, en parte,
25 modificaciones de FIX que probablemente den como resultado una actividad

específica aumentada con una mínima perturbación de función. Las modificaciones que potencian la actividad específica de FIX pueden compensar el potencial de pérdida de la actividad de coagulación y también prolongar potencialmente la eficacia de las moléculas modificadas otorgando eficacia a niveles de proteína más bajos.

Polipéptidos FIX Modificados

La solicitud proporciona polipéptidos FIX que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos, es decir, polipéptidos FIX modificados. El "Factor IX", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína FIX que es un miembro de la ruta de coagulación intrínseca y es esencial para la coagulación sanguínea. Debe entenderse que esta definición incluye formas nativas así como recombinantes de la proteína FIX. A menos que se especifique o se indique de otra manera, como se usa en el presente documento, FIX significa cualquier molécula de proteína FIX humana funcional y su función normal en la coagulación, incluyendo cualquier fragmento, análogo, variante y derivado de la misma. Los términos "fragmento", "derivado", "análogo", "muteína" y "variante", cuando se refiere a los polipéptidos de la solicitud, significan fragmentos, derivados, análogos, muteínas y variantes de los polipéptidos que conservan sustancialmente la misma función o actividad biológica.

Los ejemplos no limitantes de polipéptidos FIX incluyen FIX, FIXa y versiones truncadas de FIX que poseen actividad FIX. Los fragmentos, variantes de delección, variantes de sustitución o variantes de adición biológicamente activos de cualquiera de los anteriores, que conservan al menos algún grado de actividad FIX, también pueden servir como un

polipéptido FIX. En algunas realizaciones, los polipéptidos FIX pueden comprender una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos aproximadamente un 70, 80, 90 o 95% con la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, los polipéptidos FIX modificados son biológicamente activos. La actividad biológica puede determinarse, por ejemplo, mediante ensayos de coagulación descritos en el presente documento.

Los polipéptidos FIX modificados pueden contener sustituciones conservativas de aminoácidos. En la técnica una sustitución conservativa se reconoce como una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que posee propiedades similares e incluye, por ejemplo, los cambios de alanina por serina; arginina por lisina; asparagina por glutamina o histidina; aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparagina; glutamato por aspartato; glicina por prolina; histidina por asparagina o glutamina; isoleucina por leucina o valina; leucina por valina o isoleucina; lisina por arginina; metionina por leucina o isoleucina; fenilalanina por tirosina, leucina o metionina; serina por treonina; treonina por serina; triptófano por tirosina; tirosina por triptófano o fenilalanina y valina por isoleucina o leucina. En algunas realizaciones, los polipéptidos FIX de la SEC ID N°: 1 comprenden de 1-30, de 1-20 o de 1-10 sustituciones conservativas de aminoácidos.

Para un aminoácido particular, la abreviatura de una sola letra, su correspondiente aminoácido y la abreviatura de tres letras son las siguientes: A, alanina (Ala); C, cisteína (Cys); D, ácido aspártico (Asp); E, ácido glutámico (Glu); F, fenilalanina (Phe); G, glicina (Gly); H, histidina (His); I, isoleucina (Ile); K, lisina (Lys); L, leucina (Leu); M, metionina (Met); N, asparagina (Asn); P, prolina (Pro); Q, glutamina (Gln); R, arginina (Arg); S, serina (Ser); T, treonina

(Thr); V, valina (Val); W, triptófano (Trp); Y, tirosina (Tyr) y norleucina (Nle).

- Los polipéptidos FIX modificados también pueden estar glucosilados. La glucosilación de polipéptidos está típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión de un resto carbohidrato en la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas Asn-X-Ser y Asn-X-Thr, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de Asn. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación ligado a N.
- Un sitio de glucosilación ligado a N ejemplar puede representarse de la siguiente manera X1-Asn-X2-X3-X4; en el que X1 es opcionalmente Asp, Val, Glu, Gly o Ile; X2 es cualquier aminoácido excepto Pro; X3 es Ser o Thr y X4 es opcionalmente Val, Glu, Gly, Gln o Ile. La adición de sitios de glucosilación ligados a N en un polipéptido FIX se consigue modificando la secuencia de aminoácidos de manera que se introducen una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente.

- La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más normalmente a serina o treonina, aunque también es posible la unión a 5-hidroxiprolina o a 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glucosilación ligados a O a un polipéptido FIX puede conseguirse modificando la secuencia de aminoácidos de manera que se introducen uno o más restos de Ser o Thr.

- Los sitios de glucosilación pueden introducirse, por ejemplo, por delección de uno o más restos de aminoácidos, por sustitución de uno o más restos de aminoácidos FIX endógenos con otro aminoácido (o aminoácidos) o por adición

de uno o más restos de aminoácidos. La adición de un resto de aminoácido puede ser bien entre dos restos de aminoácidos existentes o bien en el extremo N- o C- terminal de la molécula FIX nativa.

La terminología usada para las sustituciones de aminoácidos es la siguiente. La primera letra representa el resto de aminoácido presente de manera natural en una posición de FIX humano. El siguiente número representa la posición en la secuencia de aminoácidos FIX humana madura (SEC ID N°: 1). La segunda letra representa la sustitución del aminoácido diferente para (reemplazar/sustituir) el aminoácido natural. Como ejemplo, V86A significa que el resto de Val en la posición 86 de la SEC ID N°: 1 se ha reemplazado por un resto de Ala.

El sistema numérico de restos FIX usado en el presente documento se refiere al de la proteína FIX humana madura en la que el resto 1 representa el primer aminoácido del polipéptido FIX maduro después de la eliminación de la secuencia de señal y del propéptido. La molécula de FIX nativa o de tipo silvestre es la molécula de FIX humana madura de longitud completa como se muestra en la SEC ID N°: 1.

Puede ser deseable comparar las propiedades de los polipéptidos FIX modificados, que poseen una o más sustituciones de aminoácidos, con un polipéptido de control. Las propiedades para la comparación incluyen, por ejemplo, solubilidad, actividad, semivida en plasma y propiedades de unión. Dentro del ámbito de un experto en la materia se incluye el seleccionar el polipéptido de control más apropiado para la comparación. En algunas realizaciones, el polipéptido de control puede ser idéntico al polipéptido modificado excepto por la una o más sustituciones de aminoácidos. Los

polipéptidos ejemplares incluyen el polipéptido FIX de tipo silvestre y polipéptidos FIX que comprenden una o más sustituciones de activación, tales como R338A y/o V86A.

Un aspecto de la solicitud proporciona polipéptidos FIX modificados que poseen actividad específica aumentada en comparación con un polipéptido de control. La especificidad específica aumentada puede ser deseable para reducir la frecuencia de dosificación que es necesaria para conseguir la eficacia terapéutica. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los polipéptidos FIX poseen una actividad específica aumentada en aproximadamente un 20, 30, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ó 1000% con respecto a una proteína de control.

La expresión "semivida", como se usa en el presente documento en el contexto de administrar un fármaco polipeptídico a un paciente, se define como el tiempo necesario para que la concentración en plasma de un fármaco en un paciente se reduzca a la mitad. Los procedimientos para el análisis y la determinación de la semivida y estabilidad *in vivo* serán familiares para los expertos en la materia. Pueden encontrarse detalles en Kenneth, y col., Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y en Peters, y col., Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics," M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª edición rev. (1982) que describe parámetros farmacocinéticos tales como semividas t-alfa y t-beta y el área bajo la curva (AUC).

La actividad de los polipéptidos FIX modificados puede describirse bien como un valor absoluto, tal como en unidades, o bien como un porcentaje de la

- actividad de un polipéptido de control. La actividad específica de FIX puede definirse como la capacidad de funcionar en la cascada de coagulación, que induce la formación de FXa mediante la interacción con FVIIIa sobre una plaqueta activada, o dar soporte a la formación de un coágulo sanguíneo. La actividad puede evaluarse *in vitro* por técnicas tales como análisis de coagulación, como se describe, por ejemplo, en McCarthy y col., (Thromb. Haemost. 87:824-830, 2002) y otras técnicas conocidas por los expertos en la materia. La actividad también puede evaluarse *in vivo* usando una de las diversas líneas animales que se han generado intencionalmente con una mutación genética para la hemofilia B tal como un animal producido a partir de dicha línea que es deficiente para FIX. Dichas líneas están disponibles a partir de diversas fuentes tales como, sin limitación, the Division of Laboratories and Research, Department of Public Health de Nueva York, Albany, N.Y. y el Department of Pathology, Universidad del Norte de Carolina, Chapel Hill, N.C.
- Estas dos fuentes proporcionan, por ejemplo, cánidos que padecen hemofilia B canina. Como alternativa, también existen disponibles ratones deficientes en FIX (Sabatino, y col., Blood 104:2767-2774, 2005). Para ensayar la actividad de FIX, se inyecta un polipéptido de ensayo en el animal enfermo, se realiza un pequeño corte y se compara el tiempo de sangrado con el de un control sano.
- El FIX humano de tipo silvestre tiene una actividad específica de aproximadamente 200 unidades por mg. Se ha definido una unidad de FIX como la cantidad de FIX presente en un mililitro de plasma humano normal (agrupado) (correspondiente a un nivel FIX del 100%). En algunas realizaciones, los polipéptidos FIX modificados pueden tener una actividad específica de al menos aproximadamente 200 unidades, 300 unidades, 400

unidades, 500 unidades o más por mg de polipéptido FIX. En algunas realizaciones, los polipéptidos FIX modificados pueden tener una actividad específica de al menos aproximadamente 500 unidades, 600 unidades, 700 unidades, 750 unidades o más por mg de polipéptido FIX. En algunas realizaciones, la actividad específica de FIX puede medirse usando el ensayo TTPA o tiempo de tromboplastina parcial activado (descrito, por ejemplo, por Proctor y col., Am. J. Clin. Pathol. 36:212, 1961).

Cuando se expresa en células, tales como células hepáticas o renales, la maquinaria celular puede sintetizar el polipéptido FIX, que experimenta una modificación post-traducciona l y después se secreta por las células en el medio extracelular. La cantidad de polipéptido FIX secretada desde las células depende por tanto del proceso de traducción de las proteínas y de la secreción extracelular. En algunas realizaciones, los polipéptidos FIX modificados pueden secretarse en una cantidad que no se reduce más de aproximadamente un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ó 80% con respecto a la cantidad secretada de una proteína de control. Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado puede secretarse en una cantidad que no se reduce más de aproximadamente un 80% con respecto a un polipéptido FIX de control, si el polipéptido modificado se secreta en una cantidad de al menos aproximadamente el 20% en comparación con el control. La cantidad del polipéptido FIX secretada puede medirse, por ejemplo, determinando los niveles de proteína en el medio extracelular usando cualquier procedimiento conocido en la materia. Las metodologías tradicionales para la cuantificación de proteínas incluyen electroforesis bidimensional en geles, espectrometría de masas y unión a anticuerpos. Los procedimientos ejemplares para evaluar los niveles de

proteína en una muestra biológica incluyen técnicas basadas en anticuerpos, tales como inmunotransferencia (transferencia de Western), ensayo inmunohistológico, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA).

- 5 En algunas realizaciones, los polipéptidos FIX modificados interaccionan con al menos uno de FVIII, FXI o FX a un nivel no reducido más de aproximadamente el 40, 50, 60, 60 u 80% con respecto a la interacción de una proteína de control con al menos uno de FVIII, FXI o FX. Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado puede interaccionar con al menos uno de FVIII, FXI
- 10 o FX a un nivel no reducido más de aproximadamente el 80% con respecto a un polipéptido FIX de control, si el polipéptido modificado interacciona con al menos uno de FVIII, FXI o FX a un nivel de al menos aproximadamente el 20% con el control. La unión de FIX a otros miembros de la cascada de coagulación puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido por un experto
- 15 en la materia, incluyendo, por ejemplo, los procedimientos descritos en Chang, y col., (J. Biol. Chem. 273:12089-12094, 1998).

La solicitud proporciona, en parte, polipéptidos FIX que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, se proporcionan polipéptidos FIX que comprenden una o más sustituciones

20 seleccionadas de D85F; D85G; D85H; D85I; D85M; D85N; D85R; D85S; D85W; D85Y; V86A; V86H; V86E; V86G; V86H; V86I; V86L; V86M; V86N; V86P; V86Q; V86R; V86S; V86T; T87F; T87I; T87K; T87M; T87R; T87V; T87W; R338A; R338F; R338I; R338L; R338M; R338S; R338T; R338V; R338W; E410N; E410Q; o cualquier combinación de las mismas.

- 25 En algunas realizaciones, se proporcionan polipéptidos FIX que comprenden

una o más sustituciones seleccionadas de D85W y T87R; D85F y T87I; D85W y T87W; D85R y T85R; D85I y T87R; D85Y y T87F; D85I y T87M; D85F y T87R; D85F y T87V; D85R y T87K; D85H y T87I; D85I y T87I; D85Y y T87K; D85S y T87R; D85Y y T87R; D85G y T87K; D85H y T87W; D85H y T87K;

5 D85F y T87K; D85H y T87V; D85M y T87I; D85H y T87M; R338A y E410N; R338A y E410Q o cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, se proporcionan polipéptidos FIX que comprenden una o más sustituciones seleccionadas de D85W, V86A y T87R; D85F, V86A y T87I; D85W, V86A y T87W; D85R, V86A y T85R; D85I, V86A y T87R; D85Y, V86A, y T87F; D85I, V86A y T87M; D85F, V86A y T87R; D85F, V86A y T87V; D85R, V86A y T87K; D85H, V86A y T87I; D85I, V86A y T87I; D85Y, V86A y T87K; D85S, V86A y T87R; D85Y, V86A y T87R; D85G, V86A y T87K; D85H, V86A y T87W; D85H, V86A y T87K; D85F, V86A y T87K; D85H, V86A y T87V; D85M, V86A y T87I; D85H, V86A y T87M o cualquier

10 15 combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, se proporcionan polipéptidos FIX que comprenden una o más sustituciones seleccionadas de D85W, V86A, T87R y R338A; D85F, V86A, T87I y R338A; D85W, V86A, T87W y R338A; D85R, V86A, T85R y R338A; D85I, V86A, T87R y R338A; D85Y, V86A, T87F y R338A; D85I, V86A, T87M y R338A; D85F, V86A, T87R y R338A; D85F, V86A, T87V y R338A; D85R, V86A, T87K y R338A; D85H, V86A, T87I y R338A; D85I, V86A, T87I y R338A; D85Y, V86A, T87K y R338A; D85S, V86A, T87R y R338A; D85Y, V86A, T87R y R338A; D85G, V86A, T87K y R338A; D85H, V86A, T87W y R338A; D85H, V86A, T87K y R338A; D85F, V86A, T87K y R338A; D85H, V86A, T87V y R338A; D85M, V86A, T87I y R338A; D85H, V86A, T87M y

20 25

R338A o cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, se proporcionan polipéptidos FIX que comprenden una o más sustituciones seleccionadas de D85W, V86A, T87R, R338A y E410N; D85F, V86A, T87I, R338A y E410N; D85W, V86A, T87W, R338A y

5 E410N; D85R, V86A, T85R, R338A y E410N; D85I, V86A, T87R, R338A y E410N; D85Y, V86A, T87F, R338A y E410N; D85I, V86A, T87M, R338A y E410N; D85F, V86A, T87R, R338A y E410N; D85F, V86A, T87V, R338A y E410N; D85R, V86A, T87K, R338A y E410N; D85H, V86A, T87I, R338A y E410N; D85I, V86A, T87I, R338A y E410N; D85Y, V86A, T87K, R338A y

10 E410N; D85S, V86A, T87R, R338A y E410N; D85Y, V86A, T87R, R338A y E410N; D85G, V86A, T87K, R338A y E410N; D85H, V86A, T87W, R338A y E410N; D85H, V86A, T87K, R338A y E410N; D85F, V86A, T87K, R338A y E410N; D85H, V86A, T87V, R338A y E410N; D85M, V86A, T87I, R338A y E410N; D85H, V86A, T87M, R338A y E410N; D85W, V86A, T87R, R338A y

15 E410Q; D85F, V86A, T87I, R338A y E410Q; D85W, V86A, T87W, R338A y E410Q; D85R, V86A, T85R, R338A y E410Q; D85I, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85Y, V86A, T87F, R338A y E410Q; D85I, V86A, T87M, R338A y E410Q; D85F, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85F, V86A, T87V, R338A y E410Q; D85R, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87I, R338A y

20 E410Q; D85I, V86A, T87I, R338A y E410Q; D85Y, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85S, V86A, T87R, R338A, y E410Q; D85Y, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85G, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87W, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85F, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87V, R338A y E410Q; D85M, V86A, T87I, R338A y E41

25 0Q; D85H, V86A, T87M, R338A y E410Q y cualquier combinación de las

mismas.

En algunas realizaciones, se proporcionan polipéptidos FIX que comprenden una o más sustituciones seleccionadas de

- (a) D85F; D85G; D85H; D85I; D85M; D85N; D85R; D85S; D85W; D85Y; V86A; V86D ; V86E; V86G; V86H; V86I; V86L; V86M; V86N; V86P; V86Q; V86R; V86S; V86T; T87F; T87I; T87K; T87M; T87R; T87V; T87W; R338A; R338F; R338I; R338L; R338M; R338S; R338T; R338V; R338W; E410N; E410Q;
- (b) D85W y T87R; D85F y T87I; D85W y T87W; D85R y T85R; D85I y T87R; D85Y y T87F; D85I y T87M; D85F y T87R; D85F y T87V; D85R y T87K; D85H y T87I; D85I y T87I; D85Y y T87K; D85S y T87R; D85Y y T87R; D85G y T87K; D85H y T87W; D85H y T87K; D85F y T87K; D85H y T87V; D85M y T87I; D85H y T87M;
- (c) D85W, V86A y T87R; D85F, V86A y T87I; D85W, V86A y T87W; D85R, V86A y T85R; D85I, V86A y T87R; D85Y, V86A y T87F; D85I, V86A y T87M; D85F, V86A y T87R; D85F, V86A y T87V; D85R, V86A y T87K; D85H, V86A y T87I; D85I, V86A y T87I; D85Y, V86A y T87K; D85S, V86A y T87R; D85Y, V86A y T87R; D85G, V86A y T87K; D85H, V86A y T87W; D85H, V86A y T87K; D85F, V86A y T87K; D85H, V86A y T87V; D85M, V86A y T87I; D85H, V86A y T87M; R338A y E410N; R338A y E410Q;
- (d) D85W, V86A, T87R y R338A; D85F, V86A, T87I y R338A; D85W, V86A, T87W y R338A; D85R, V86A, T85R y R338A; D85I, V86A, T87R y R338A; D85Y, V86A, T87F y R338A; D85I, V86A, T87M y R338A; D85F, V86A, T87R y R338A; D85F, V86A, T87V y R338A; D85R, V86A, T87K y R338A; D85H, V86A, T87I y R338A; D85I, V86A, T87I y R338A; D85Y, V86A, T87K y R338A; D85S, V86A, T87R y R338A; D85Y, V86A, T87R y R338A; D85G, V86A, T87K

y R338A; D85H, V86A, T87W y R338A; D85H, V86A, T87K y R338A; D85F, V86A, T87K y R338A; D85H, V86A, T87V, y R338A; D85M, V86A, T87I y R338A; D85H, V86A, T87M y R338A;

(e) D85W, V86A, T87R, R338A y E410N; D85F, V86A, T87I, R338A y E410N;

- 5 D85W, V86A, T87W, R338A y E410N; D85R, V86A, T85R, R338A y E410N; D85I, V86A, T87R, R338A y E410N; D85Y, V86A, T87F, R338A y E410N; D85I, V86A, T87M, R338A y E410N; D85F, V86A, T87R, R338A y E410N; D85F, V86A, T87V, R338A y E410N; D85R, V86A, T87K, R338A y E410N; D85H, V86A, T87I, R338A y E410N; D85I, V86A, T87I, R338A y E410N; D85Y, V86A, T87K, R338A y E410N; D85S, V86A, T87R, R338A y E410N; D85Y, V86A, T87R, R338A y E410N; D85G, V86A, T87K, R338A y E410N; D85H, V86A, T87W, R338A y E410N; D85H, V86A, T87K, R338A y E410N; D85F, V86A, T87K, R338A y E410N; D85H, V86A, T87V, R338A y E410N; D85M, V86A, T87I, R338A y E410N; D85H, V86A, T87M, R338A y E410N; D85W, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85F, V86A, T87I, R338A y E410Q; D85W, V86A, T87W, R338A y E410Q; D85R, V86A, T85R, R338A y E410Q; D85I, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85Y, V86A, T87F, R338A y E410Q; D85I, V86A, T87M, R338A y E410Q; D85F, V86A, T87R, R338A, y E410Q; D85F, V86A, T87V, R338A y E410Q; D85R, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87I, R338A y E410Q; D85I, V86A, T87I, R338A y E410Q; D85Y, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85S, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85Y, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85G, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87W, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85F, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87V, R338A y E410Q; D85M, V86A, T87I, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87M, R338A y E410Q; y cualquier

combinación de las mismas.

Un aspecto adicional de la solicitud proporciona polipéptidos FIX con actividad específica aumentada. En algunas realizaciones, los polipéptidos pueden tener una actividad específica de al menos aproximadamente 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 4000, 6000, 8000 o más unidades por mg de polipéptido. La actividad específica puede determinarse, como se ha descrito anteriormente, tal como, por ejemplo, usando el ensayo TTPA. Estos polipéptidos son útiles como agentes terapéuticos, particularmente en pacientes que padecen hemofilia B. Estos polipéptidos pueden comprender sustituciones o modificaciones adicionales, tales como los sitios de glucosilación descritos en el presente documento.

Un aspecto de la solicitud proporciona polipéptidos del factor IX modificados que comprenden la siguiente secuencia de aminoácidos:

YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGD
 QCESNPCLNGGSCCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELX₈₅X₈₆X₈₇CNIKNGR
 CEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSL
 TRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP
 WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEH
 TEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTN
 IFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLX₃₃₈STKFTIYN
 NMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGK
 YGIYTKVSRVYNWIKX₄₁₀KTKLT (SEC ID N°: 2);

en la que X₈₅ se selecciona de D, F, G, H, I, M, N, R, S, W e Y;
 en la que X₈₆ se selecciona de A, D, E, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T y V;

en la que X_{87} se selecciona de F, I, K, M, R, T, V y W;

en la que X_{338} se selecciona de A, F, I, L, M, R, S, T, V y W;

en la que X_{410} se selecciona de E, N y Q.

La introducción de al menos una sustitución de aminoácidos es el
5 resultado de una sustitución en al menos una de las posiciones X. En algunas
realizaciones, el polipéptido modificado comprende adicionalmente entre
aproximadamente 1-30, 1-20 ó 1-10 cambios de aminoácidos conservativos y
conserva actividad FIX. En algunas realizaciones, el polipéptido modificado
tiene al menos aproximadamente una identidad de un 80, 85, 90, 95 ó 99% con
10 la SEC ID N°: 1 y conserva actividad FIX.

Producción de Polipéptidos FIX Modificados

La modificación de la secuencia de aminoácidos puede conseguirse
mediante una diversidad de técnicas, tales como, por ejemplo, modificando la
correspondiente secuencia de ácido nucleico por mutagénesis específica de
15 sitio. Las técnicas para la mutagénesis específica de sitio se conocen bien en la
materia y se describen, por ejemplo, en Zoller y col., (DNA 3:479-488, 1984) o
Horton y col., (Gene 77:61-68, 1989, páginas 61-68). Por tanto, usando las
secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de FIX, puede introducirse la
modificación (o modificaciones) de elección. Del mismo modo, los expertos en
20 la materia también conocen procedimientos para fabricar una construcción de
ADN usando la reacción en cadena de la polimerasa, que usa cebadores
específicos, (véase, por ejemplo, PCR Protocols, 1990, Academic Press, San
Diego, California, USA).

La construcción de ácido nucleico que codifica al polipéptido FIX también
25 puede fabricarse sintéticamente mediante procedimientos convencionales

- establecidos, por ejemplo, el procedimiento de fosforamidita descrito por Beaucage y col., (Gene Amplif. Anal. 3:1-26, 1983). De acuerdo con el procedimiento de fosforamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se hibridan, se ligan y se
- 5 clonan en vectores adecuados. Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos FIX también pueden fabricarse por reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos, como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.683.202; o por Saiki y col., (Science 239:487-491, 1988). Adicionalmente, la construcción de ácido nucleico puede
- 10 ser de origen sintético y genómico mixto, sintético y de ADNc mixto o genómico y de ADNc mixto preparada por ligamiento de fragmentos de origen sintético, genómico o ADNc (según sea apropiado), que corresponden a diversas partes de toda la construcción de ácido nucleico, de acuerdo con técnicas convencionales.
- 15 Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos FIX pueden insertarse en un vector recombinante usando procedimientos de ADN recombinante. La elección del vector dependerá, frecuentemente, de la célula huésped en la que va a introducirse el vector. El vector puede ser un vector que se replica de manera autónoma o un vector de integración. Un vector que se
- 20 replica de manera autónoma existe como una entidad extracromosómica y su replicación depende de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Un vector de integración es un vector que se integra en el genoma de la célula huésped y que se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el cual se ha integrado.
- 25 El vector puede ser un vector de expresión en el que la secuencia de

ADN que codifica al FIX modificado está unida operativamente a segmentos adicionales necesarios para la transcripción, traducción o procesamiento del ADN, tales como promotores, terminadores y sitios de poliadenilación. En general, el vector de expresión puede derivar de ADN plasmídico o viral, o
5 puede contener elementos de ambos. La expresión "unido operativamente" indica que los segmentos se disponen para actuar conjuntamente para sus fines pretendidos, por ejemplo, iniciar la transcripción en un promotor y procesarse a través de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido.

Los vectores de expresión para su uso en la expresión de polipéptidos
10 FIX pueden comprender un promotor capaz de dirigir la transcripción de un gen clonado o de ADNc. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede derivar de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas para la célula huésped.

15 Son ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica los polipéptidos FIX en células de mamíferos, por ejemplo, el promotor del SV40 (Subramani, y col., Mol. Cell Biol. 1:854-864, 1981), el promotor de la MT-I (gen de la metalotioneína) (Palmiter, y col., Science 222:809-814, 1983), el promotor del CMV (Boshart, y col., Cell 41:521-530,
20 1985) o el promotor tardío principal de adenovirus de tipo 2 (Kaufman y col., Mol. Cell Biol, 2:1304-1319, 1982).

Las secuencias de ADN que codifican el polipéptido FIX también pueden, si fuera necesario, estar conectadas operativamente a un terminador adecuado, tal como al terminador de la hormona del crecimiento humano
25 Palmiter, y col., Science 222:809-814, 1983) o a los terminadores TPI1 (Alber y

col., J. Mol. Appl. Gen. 1:419-434, 1982) o ADH3 (McKnight, y col., EMBO J. 4:2093-2099, 1985). Los vectores de expresión también pueden contener una señal de poliadenilación localizada aguas abajo del sitio de inserción. Las señales de poliadenilación incluyen la señal de poliadenilación temprana o tardía del SV40, la señal de poliadenilación de la región E1b de adenovirus 5, el terminador del gen de la hormona del crecimiento humano (DeNoto, y col., Nucl. Acids Res. 9:3719-3730, 1981) o la señal de poliadenilación del gen FIX humano. Los vectores de expresión también pueden incluir secuencias potenciadoras tales como el potenciador del SV40.

10 Para dirigir los polipéptidos FIX de la presente invención en la ruta secretora de las células huéspedes, puede usarse la secuencia de señal secretora de FIX nativa. Como alternativa, en el vector recombinante, puede proporcionarse una secuencia de señal secretora (conocida también como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre). La secuencia de señal secretora puede unirse a las secuencias de ADN que codifican a los análogos de FIX en la fase de lectura correcta. Las secuencias de señal secretoras se posicionan normalmente en sentido 5' con respecto a la secuencia de ADN que codifica el péptido. Las secuencias de señal ejemplares incluyen, por ejemplo, la secuencia de señal del MPIF-1 y la secuencia de señal de la estaniocalcina.

20 Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos FIX, el promotor y opcionalmente la secuencia de señal terminadora y/o secretora y para insertarlas en vectores adecuados que contengan la información necesaria para la replicación, son bien conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

25

Procedimientos de transfección de células de mamíferos y de expresión de secuencias de ADN introducidas en las células se describen, por ejemplo, en Kaufman, y col., (J. Mol. Biol. 159:601-621, 1982); Southern, y col., (J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341, 1982); Loyter, y col., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:422-426, 1982); Wigler, y col., (Cell 14:725-731, 1978); Corsaro, y col., (Somatic Cell Genetics 7:603-616, 1981), Graham, y col., (Virology 52:456-467, 1973); y Neumann, y col., (EMBO J. 1:841-845, 1982). Las secuencias de ADN clonadas pueden introducirse en células de mamífero cultivadas, por ejemplo, por lipofección, transfección mediada por DEAE-dextrano, microinyección, fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, administración retroviral, electroporación, sonoporación, radiación láser, magnetofección, transformación natural y transformación biolística (véase, por ejemplo, Mehier-Humbert, y col., Adv. Drug Deliv. Rev. 57:733-753, 2005). Generalmente, para identificar y seleccionar células que expresen el ADN exógeno, en las células se introduce un gen que confiere un fenotipo de selección (un marcador de selección) junto con el gen o el ADNc de interés. Los marcadores de selección incluyen, por ejemplo, genes que confieren resistencia a fármacos, tales como neomicina, puromicina, higromicina y metotrexato. El marcador de selección puede ser un marcador de selección amplificable, que permite la amplificación del marcador y del ADN exógeno cuando las secuencias están ligadas. Los marcadores de selección amplificables ejemplares incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y adenosina desaminasa. Se encuentra dentro del ámbito de un experto en la materia seleccionar marcadores de selección adecuados (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.238.820).

Después de haber transfectado las células con ADNc, se cultivan en un

medio de cultivo apropiado para expresar el gen de interés. Como se usa en el presente documento, la expresión "medio de cultivo apropiado", significa un medio que contiene nutrientes y otros componentes necesarios para el crecimiento de las células y la expresión de los polipéptidos FIX activos.

- 5 Los medios generalmente incluyen, por ejemplo, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, azúcares esenciales, vitaminas, sales, fosfolípidos, proteínas y factores de crecimiento y en el caso de proteínas dependientes de vitamina K, tal como FIX, también puede proporcionarse vitamina K. Después se aplica la selección del fármaco para
- 10 seleccionar el cultivo de células que van a expresar el marcador de selección de una manera estable. Para las células que se han transfectado con un marcador de selección amplificable la concentración del fármaco puede aumentarse para seleccionar un número de copias aumentadas de las secuencias clonadas, aumentando así los niveles de expresión. Los clones de
- 15 células transfectadas de manera estable se exploran después para determinar la expresión del polipéptido FIX.

Son ejemplos de líneas celulares de mamíferos, para su uso en la presente invención, las líneas celulares COS-1 (ATCC CRL 1650), de riñón de cría de hámster (BHK), HKB11 (Cho, y col., J. Biomed. Sci, 9:631-638, 2002) y

20 HEK-293 (ATCC CRL 1573; Graham, y col., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977).

Además, en la presente invención, pueden usarse diversas otras líneas celulares, que incluyen células Hep I de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Hep II de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK-1 (ATCC CCL 139), Hep-G2 (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO-K1

25 (ATCC CCL 61) y células CHO-DUKX (Urlaub y Chasm, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 77:4216-4220, 1980).

Los polipéptidos FIX pueden recuperarse del medio de cultivo celular y después purificarse mediante diversos procedimientos conocidos en la materia que incluyen, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, de intercambio
5 iónico, de afinidad, hidrófoba, cromatoenfoco y de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo enfoque isoeléctrico preparativo (EIP), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio)), extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, Janson y Lars Ryden, editors, VCH Publishers, Nueva York, 1989) o diversas combinaciones de los
10 mismos. En una realización ejemplar, los polipéptidos pueden purificarse por cromatografía de afinidad en una columna con anticuerpos anti-FIX. La purificación adicional puede conseguirse por medios de purificación químicos convencionales, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento. En la técnica se conocen otros procedimientos de purificación y pueden aplicarse a la
15 purificación de los polipéptidos FIX modificados (véase, por ejemplo, Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982).

Generalmente, "purificada" se referirá a una proteína o composición peptídica que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar otros componentes diversos y que conserva sustancialmente su actividad biológica
20 expresada. Cuando se usa la expresión "purificado sustancialmente", esta denominación se referirá a una composición en la que la proteína o el péptido forma el componente principal de la composición, tal como que constituye aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%,
25 aproximadamente 99% o más de las proteínas en la composición.

Los expertos en la materia conocen diversos procedimientos para cuantificar el grado de purificación del polipéptido. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa o evaluar la cantidad de polipéptidos dentro de una fracción por análisis SDS/PAGE. Un procedimiento ejemplar para evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, comparar la actividad con la actividad específica del extracto inicial y calcular de esta manera el grado de pureza, en el presente documento, evaluado mediante un "número de veces de purificación". Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo particular.

En algunas realizaciones, los polipéptidos FIX se expresan de manera recombinante en células de cultivo tisulares y la glucosilación es el resultado del funcionamiento celular post-traducciona normal de la célula huésped, tal como una célula de mamífero. En otros casos, para expresar una combinación de enzimas y polipéptidos deseados, las células se han modificado por ingeniería genética, de manera que la adición de un resto de azúcar deseado a un polipéptido expresado se produce dentro de la célula. Como alternativa, la glucosilación puede conseguirse mediante modificación química o enzimática (véase, por ejemplo, Lee, y col., J. Biol. Chem. 264:13848-13855, 1989). En la técnica se han propuesto diversos procedimientos para personalizar el modelo de glucosilación de un polipéptido (véanse, por ejemplo, los documentos WO 99/22764; WO 98/58964; WO 99/54342; la Publicación de Estados Unidos N° 2008/0050772; y la Patente de Estados Unidos N° 5.047.335).

Conjugación de Polímeros

Los polipéptidos FIX modificados pueden comprende adicionalmente

uno o más sitios de conjugación de polímeros que pueden usarse para unir un resto polimérico. En algunas realizaciones, los polipéptidos FIX pueden conjugarse con un polímero biocompatible. Los polímeros biocompatibles pueden seleccionarse para proporcionar la mejora deseada en cuanto a propiedades farmacocinéticas. Por ejemplo, para mejorar la semivida en circulación del polipéptido que posee actividad FIX o para disminuir la antigenicidad del polipéptido, sin ninguna disminución inaceptable en cuanto a la actividad, puede seleccionarse la identidad, el tamaño y la estructura del polímero.

10 El polipéptido FIX modificado puede incluir uno o más restos de azúcar que, durante la expresión en células de mamífero, están unidos de manera natural al péptido. En algunas realizaciones, estos restos de azúcar pueden servir como sitios de conjugación para unir un resto polimérico. En algunas realizaciones, el resto polimérico puede unirse al resto de azúcar usando
15 diversos engarces o procesos químicos de ligamiento. Por ejemplo, el resto polimérico puede conjugarse con el resto de azúcar mediante un ligamiento de hidrazona o un ligamiento amino-oxi.

Los ejemplos de polímeros útiles en la invención incluyen, pero sin limitación, poli(alquilenglicoles), tales como, polietilenglicol (PEG),
20 poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxetilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(alfa-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolina), ácido polisiálico, almidón hidroxietílico (HES), óxido de
25 polietileno, óxidos de alquil-polietileno, óxidos de bis-polietileno, copolímeros o

copolímeros en bloque de óxidos de polialquileno, poli(etilenglicol-co-propilenglicol), poli(N-2-(hidroxipropil)metilacrilamida) y dextrano.

El polímero no está limitado a ninguna estructura particular y puede ser lineal (por ejemplo, alcoxi PEG o PEG bifuncional) o no lineal tal como ramificado, bifurcado, multiarmado (por ejemplo, los PEG unidos a un núcleo de poliol) y dendríticos. Además, la estructura interna del polímero puede organizarse en cualquier número de modelos diferentes y puede seleccionarse del grupo que consiste en homopolímero, copolímero alternante, copolímero aleatorio, copolímero en bloque, tripolímero alterante, tripolímero aleatorio y tripolímero en bloque.

Los polímeros de PEG y otros solubles en agua (es decir, reactivos poliméricos) pueden activarse con un grupo activador adecuado apropiado para el acoplamiento a un sitio deseado en el polipéptido FIX. Por lo tanto, un reactivo polimérico poseerá un grupo reactivo para la reacción con el polipéptido FIX. Los reactivos poliméricos representativos y procedimientos para conjugar estos polímeros con un resto activo se conocen en la técnica y se describen adicionalmente en Zalipsky y col., ("Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Plenus Press, Nueva York (1992)), y en Zalipsky (Adv. Drug Rev. 16:157-182, 1995)

El peso molecular promedio en peso del polímero puede ser desde aproximadamente 100 Daltons a aproximadamente 150.000 Daltons. Sin embargo, los intervalos ejemplares, incluyen pesos moleculares promedio en peso en el intervalo de más de aproximadamente 5,000 Daltons a aproximadamente 100.000 Daltons, en el intervalo de desde aproximadamente

6.000 Daltons a aproximadamente 90.000 Daltons, en el intervalo de desde
aproximadamente 10.000 Daltons a aproximadamente 85.000 Daltons, en el
intervalo de más de aproximadamente 10.000 Daltons a aproximadamente
85.000 Daltons, en el intervalo de desde aproximadamente 20.000 Daltons a
5 aproximadamente 85.000 Daltons, en el intervalo de desde aproximadamente
53.000 Daltons a aproximadamente 85.000 Daltons, en el intervalo de desde
aproximadamente 25.000 Daltons a aproximadamente 120.000 Daltons, en el
intervalo de desde aproximadamente 29.000 Daltons a aproximadamente
120.000 Daltons, en el intervalo de desde aproximadamente 35.000 Daltons a
10 aproximadamente 120.000 Daltons, y en el intervalo de desde
aproximadamente 40.000 Daltons a aproximadamente 120.000 Daltons.

Los pesos moleculares promedio en peso ejemplares para los polímeros
biocompatibles incluyen aproximadamente 100 Daltons, aproximadamente 200
Daltons, aproximadamente 300 Daltons, aproximadamente 400 Daltons,
15 aproximadamente 500 Daltons, aproximadamente 600 Daltons,
aproximadamente 700 Daltons, aproximadamente 750 Daltons,
aproximadamente 800 Daltons, aproximadamente 900 Daltons,
aproximadamente 1.000 Daltons, aproximadamente 1.500 Daltons,
aproximadamente 2.000 Daltons, aproximadamente 2.200 Daltons,
20 aproximadamente 2.500 Daltons, aproximadamente 3.000 Daltons,
aproximadamente 4.000 Daltons, aproximadamente 4.400 Daltons,
aproximadamente 4.500 Daltons, aproximadamente 5.000 Daltons,
aproximadamente 5.500 Daltons, aproximadamente 6.000 Daltons,
aproximadamente 7.000 Daltons, aproximadamente 7.500 Daltons,
25 aproximadamente 8.000 Daltons, aproximadamente 9.000 Daltons,

aproximadamente 10.000 Daltons, aproximadamente 11.000 Daltons,
 aproximadamente 12.000 Daltons, aproximadamente 13.000 Daltons,
 aproximadamente 14.000 Daltons, aproximadamente 15.000 Daltons,
 aproximadamente 20.000 Daltons, aproximadamente 22.500 Daltons,
 5 aproximadamente 25.000 Daltons, aproximadamente 30.000 Daltons,
 aproximadamente 35.000 Daltons, aproximadamente 40.000 Daltons,
 aproximadamente 45.000 Daltons, aproximadamente 50.000 Daltons,
 aproximadamente 55.000 Daltons, aproximadamente 60.000 Daltons,
 aproximadamente 65.000 Daltons, aproximadamente 70.000 Daltons y
 10 aproximadamente 75.000 Daltons. También pueden usarse versiones
 ramificadas del polímero biocompatible (por ejemplo un polímero ramificado de
 40.000 Daltons que comprenda dos polímeros de 20.000 Daltons) que posean
 un peso molecular total de cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones, el polímero es PEG. El PEG es un polímero
 15 soluble en agua bien conocido que se encuentra disponible en el mercado o
 que puede fabricarse por polimerización de apertura en anillo de etilenglicol de
 acuerdo con procedimientos bien conocidos en la materia (Sandler y Karo,
 Polymer Synthesis, Academic Press, Nueva York, Vol. 3, páginas 138-161). El
 término "PEG" se usa ampliamente para incluir cualquier molécula de
 20 polietilenglicol, independientemente del tamaño o modificación en un extremo
 del PEG y puede representarse por la fórmula: $X-O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH$,
 en la que n es de 20 a 2300 y X es H o una modificación terminal, por ejemplo,
 un alquilo C₁₋₄. El PEG puede contener grupos químicos adicionales que son
 necesarios para las reacciones de unión, que dan como resultado la síntesis
 25 química de la molécula o que actúan como un espaciador para distanciar

partes óptimas de la molécula. Además, dicho PEG puede consistir en una o más cadenas laterales de PEG que están ligadas entre sí. Los PEG con más de una cadena de PEG se denominan PEG multiarmados o ramificados. Los PEG ramificados pueden fabricarse, por ejemplo, por la adición de óxido de polietileno a diversos polioles incluyendo glicerol, pentaeritriol y sorbitol. Por ejemplo, un PEG ramificado de cuatro brazos puede fabricarse a partir de pentaeritriol y óxido de etileno. Se describen ejemplos de PEG ramificados, por ejemplo, en la Solicitud Europea Publicada N° 473084A y en la Patente de Estados Unidos N° 5.932.462. Una forma de PEG incluye dos cadenas laterales de PEG (PEG2) ligadas mediante los grupos amino primarios de una lisina (Monfardini, y col., Bioconjugate Chem. 6:62-69, 1995).

En una realización, el polímero puede ser un polímero con protección terminal, es decir, un polímero que posee al menos un extremo protegido con un grupo relativamente inerte, tal como un grupo alcoxi C₁₋₆ inferior, aunque también puede usarse un grupo hidroxilo. Cuando el polímero es PEG, puede usarse, por ejemplo, un metoxi-PEG (denominado comúnmente mPEG) que es una forma lineal de PEG en la que un extremo del polímero posee un grupo metoxi (-OCH₃), mientras que los otros extremos son un hidroxilo u otro grupo funcional que opcionalmente puede modificarse químicamente.

Las moléculas de PEG multiarmadas o ramificadas, tales como las descritas en las Patente de Estados Unidos N° 5.932.462, también pueden usarse como el polímero de PEG. Además, el PEG puede comprender un PEG bifurcado (véase, por ejemplo la Publicación PCT N° WO 1999/45964, que describe diversas estructuras PEG bifurcadas que pueden usarse en una o más realizaciones de la presente invención). La cadena de átomos que unen

los grupos funcionales Z al átomo de carbono ramificante sirve como un grupo de contacto y pueden comprender, por ejemplo, cadenas alquilo, cadenas éter, cadenas éster, cadenas amida y combinaciones de las mismas.

El polímero PEG también puede comprender una molécula de PEG colgante que posee grupos reactivos, tales como carboxilo, unidos covalentemente a lo largo de la longitud del PEG en lugar de al extremo de la cadena de PEG. Los grupos reactivos colgantes pueden estar unidos al PEG directamente o mediante un resto espaciador, tal como un grupo alquileo.

Para efectuar la unión covalente de la molécula (o moléculas) polimérica al polipéptido, los grupos hidroxilo terminales de la molécula polimérica deben proporcionarse en forma activada, es decir, con grupos funcionales reactivos (cuyos ejemplos incluyen grupos amino primarios, hidrazida (HZ), tiol, succinato (SUC), succinimidil succinato (SS), succinimidil succinamida (SSA), succinimidil propionato (SPA), succinimidil butanoato (SBA), succinimidil carboximetilato (SCM), benzotriazol carbonato (BTC), N-hidroxisuccinimida (NHS), aldehído, nitrofenilcarbonato (NPC) y tresilato (TRES)). Las moléculas poliméricas adecuadamente activadas se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, NOF, Japón; Nektar Therapeutics, Inc., Huntsville, Ala.; PolyMASC Pharmaceuticals plc, UK; o SunBio Corporation, Anyang City, Corea del Sur. Como alternativa, las moléculas poliméricas pueden activarse mediante procedimientos convencionales conocidos en la materia (véase, por ejemplo el documento WO 90/13540). Los ejemplos específicos de moléculas poliméricas activadas lineales o ramificadas adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, NOF, Japón; Nektar Therapeutics, Inc., Huntsville, Ala. Ejemplos específicos de polímeros

PEG activados incluyen los siguientes PEG lineales: NHS-PEG, SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-PEG, SG-PEG, SCM-PEG, NOR-PEG, BTC-PEG, EPDX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, OPSS-PEG, IODO-PEG y MAL-PEG y PEG

5 ramificados, tales como PEG2-NHS, PEG2-MAL y los descritos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N^{os} 5.932.462 y 5.643.575, ambas de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

En una realización, el polímero posee un resto sulfidril reactivo que puede reaccionar con una cisteína libre en un polipéptido FIX para formar un

10 ligamiento covalente. Dichos restos sulfidril reactivos incluyen restos tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, S-piridilo o maleimida. Adicionalmente, las siguientes publicaciones, incorporadas en el presente documento por referencia, desvelan moléculas poliméricas y/o químicas de PEGilación útiles:

Patentes de Estados Unidos Nos 6.113.906; 7.199.223; 5.824.778; 5.476.653;

15 4.902.502; 5.281.698; 5.122.614; 5.219.564; 5.736.625; 5.473.034; 5.516.673; 5.629.384; 5.382.657; y documentos WO 97/32607; WO 92/16555; WO 94/04193; WO 94/14758; WO 94/17039; WO 94/18247; WO 94/28024; WO 95/00162; WO 95/1 1924; WO 95/13090; WO 95/33490; WO 96/00080; WO 97/18832; WO 98/41562; WO 98/48837; WO 99/32134; WO 99/32139; WO

20 99/32140; WO 96/40791; WO 98/32466; WO 95/06058; WO 97/03106; WO 96/21469; WO 95/13312; WO 98/05363; WO 96/41813; WO 96/07670; EP809996; EP921131; EP605963; EP510356; EP400472; EP183503; EP154316; EP229108; EP402378 y EP439508.

Para la PEGilación de restos de cisteína, antes de la PEGilación, el

25 polipéptido puede tratarse con un agente reductor, tal como ditioneitol (DDT).

Posteriormente, el agente reductor puede eliminarse mediante cualquier procedimiento convencional, tal como desalinización. La conjugación de PEG con un resto de cisteína típicamente tiene lugar en un tampón adecuado a pH 6-9 a temperaturas que varían de 4 °C a 25 °C durante periodos de hasta 16 horas aproximadamente. Los ejemplos de polímeros de PEG activados para el acoplamiento a restos de cisteína incluyen, por ejemplo, los siguientes PEG lineales y ramificados: vinilsulfona-PEG (VS-PEG), tal como vinilsulfona-mPEG (VS-mPEG); ortopiridil-disulfuro-PEG (OPSS-PEG), tal como ortopiridil-disulfuro-mPEG (OPSS-mPEG); y maleimida-PEG (MAL-PEG), tal como maleimida-mPEG (MAL-mPEG) y maleimida-mPEG2 ramificada (MAL-mPEG2).

En una realización, los polipéptidos FIX que poseen uno o más sitios de conjugación poliméricos introducidos pueden expresarse en cultivos de células en un medio de cultivo de células que contenga cisteínas que “protejan” los restos de cisteína del polipéptido mediante la formación de enlaces disulfuro. Para añadir un conjugado polimérico a los polipéptidos FIX, la protección con cisteína puede eliminarse por reducción leve que libere la protección y después se añade un reactivo polimérico específico de cisteína.

La solicitud también proporciona un procedimiento para la preparación de un polipéptido FIX conjugado con polímeros que comprende introducir un sitio de conjugación polimérico, es decir, un resto de cisteína, en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido FIX; expresar la secuencia de nucleótidos mutada para producir un polipéptido que comprenda un sitio de conjugación polimérico introducido; purificar el polipéptido; hacer reaccionar el polipéptido con un polímero biocompatible que se ha activado para reaccionar

con polipéptidos en los restos de cisteína reducidos de manera que se forme un conjugado; y purificar el conjugado. En otra realización, la solicitud proporciona un procedimiento para la PEGilación dirigida de una muteína del polipéptido FIX que comprende: (a) expresar un polipéptido FIX que comprende un sitio de conjugación polimérico introducido, es decir, un resto de cisteína introducido sobre la superficie expuesta del polipéptido FIX, en el que la cisteína se protege; (b) poner en contacto el polipéptido FIX con un reductor en condiciones que reduzca ligeramente la cisteína introducida y libere la protección; (c) retirar la protección y el reductor del polipéptido FIX y (d) al menos aproximadamente 5, 15 o 30 minutos después de retirar el reductor, tratar el polipéptido FIX con PEG que comprenda un resto de acoplamiento sulfidrilo en condiciones tales que se produzca el polipéptido FIX PEGilado. El resto de acoplamiento sulfidrilo del PEG se selecciona del grupo que consiste en restos tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, S-piridilo y maleimida.

A continuación se describe un procedimiento ejemplar para producir un polipéptido FIX PEGilado. Aproximadamente 1 μ M de un polipéptido FIX purificado, que comprende un resto de cisteína no nativo introducido, se reduce ligeramente con reductores, tales como Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 0,7 mM o ditioneitol (DTT) 0,07 mM durante 30 minutos a 4 °C para liberar la "protección". El reductor se retira junto con la "protección" mediante un procedimiento de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), tal como procesando la muestra a través de una columna spin, que permite que los disulfuros vuelvan a formarse dejando al mismo tiempo la cisteína libre introducida y reducida. Al menos 30 minutos después de la retirada del reductor, el polipéptido FIX se trata con un exceso molar de al menos 10 veces

de PEG-maleimida con tamaños que varían desde 5 a 85 kD durante al menos 1 hora a 4 °C.

La conjugación polimérica de FIX puede evaluarse mediante cualquiera de los procedimientos conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, FIX
5 conjugado con polímeros puede analizarse por electroforesis sobre un gel reductor de poliacrilamida SDS Tris-Glicina al 6%. Después de la electroforesis, el gel puede teñirse con Azul de Coomassie para identificar todas las proteínas o someterse a un protocolo de transferencia de Western convencional, para identificar cambios en la banda de peso molecular en comparación con
10 polipéptidos FIX no conjugados. La tinción con yoduro de bario, que es específica para PEG, puede usarse para confirmar que banda, con un cambio en el peso molecular comprenden una proteína PEGilada. Los polipéptidos FIX, antes y después de la conjugación polimérica, también pueden analizarse mediante espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por
15 matriz (MALDI) para determinar el grado y la eficacia de la conjugación polimérica.

En algunas realizaciones, la conjugación polimérica puede producirse en uno o más de los restos de azúcar unidos por glucosilación. En la técnica se conocen procedimientos de dicha conjugación polimérica y se han descrito, por
20 ejemplo, en los documentos W094/05332, U52009/0081188 y US 5.621.039, los cuales se incorporan por referencia. Cuando el polímero es PEG; también se denomina comúnmente glucoPEGilación.

En algunas realizaciones, la conjugación polimérica por unión química como se proporciona en el documento US 5.621.039 puede mejorarse
25 mediante la adición de un catalizador. En algunas realizaciones, el catalizador

es un catalizador químico. Por ejemplo, el catalizador químico puede ser anilina, que puede usarse para aumentar la eficacia de una reacción entre un aldehído libre en azúcares y un grupo amino. En otras realizaciones, otros catalizadores químicos adecuados pueden ser derivados de anilina, tales como

5 o-Cl-, p-Cl-, o-CH₃O-, p-CH₃O- y p-CH₃-anilina.

En algunas realizaciones, la conjugación polimérica puede producirse en sitios de glucosilación de origen natural en FIX. El Factor IX de tipo silvestre tiene dos sitios de glucosilación ligados a N que contienen aproximadamente el 80% del contenido total del ácido siálico del Factor IX. Estos dos sitios ligados

10 a N (N157 y N167) se localizan dentro del péptido de activación que se escinde en dos sitios (R145-Ala146) y (R180-V181) para generar la molécula FIXa catalíticamente activa durante la propagación de la cascada de coagulación.

Además de la conjugación polimérica en los sitios de glucosilación de origen natural en FIX, puede ser deseable conjugar polímeros en sitios

15 alternativos localizados en diferentes dominios de la proteína FIX. Esto puede conseguirse eliminando primero los sitios de glucosilación de origen natural ligados a N en las posiciones N157 y N167 cambiando, por ejemplo, N157 por A157 y N167 por A167 y en segundo lugar introduciendo en cualquier parte en la molécula un sitio de glucosilación ligado a N, nuevo y funcional, por ejemplo,

20 en el dominio catalítico o en uno de los dos dominios del EGF. Dichos sitios de glucosilación ligados a N, nuevos y funcionales, se han descrito previamente en el documento PCT US2009/040813.

Composiciones Farmacéuticas

Basándose en ensayos bien conocidos, usados para determinar la

25 eficacia para el tratamiento de las afecciones identificadas anteriormente en

43

mamíferos y por comparación de estos resultados con los resultados de medicamentos conocidos que se usan para tratar estas afecciones, la dosificación eficaz de los polipéptidos de la presente invención puede determinarse fácilmente para el tratamiento de cada indicación deseada. La

5 cantidad del principio activo a administrar en el tratamiento de una de estas afecciones puede variar ampliamente de acuerdo con consideraciones tales como el polipéptido particular y la unidad de dosificación empleada, el modo de administración, el periodo de tratamiento, la edad y el sexo del paciente tratado y la naturaleza y grado de la afección a tratar.

10 La solicitud proporciona, en parte, composiciones que comprenden polipéptidos FIX con una o más sustituciones de aminoácidos como se describe en el presente documento. Las composiciones pueden ser adecuadas para la administración *in vivo* y son apirógenas. Las composiciones también pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión

15 "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras perjudiciales cuando se administran a un animal o a un ser humano. Como se usa en el presente documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión,

20 revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de absorción y similares. En la materia se conoce bien el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. En las composiciones también pueden incorporarse principios activos complementarios.

25 Las composiciones de la presente invención incluyen preparaciones

farmacéuticas clásicas. La administración de estas composiciones de acuerdo con la presente invención puede ser mediante cualquier vía común. Las composiciones farmacéuticas pueden introducirse en el sujeto mediante cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, mediante administración

5 intravenosa, intradérmica, intramuscular, subcutánea o transdérmica. El tratamiento puede consistir en una sola dosis o en una pluralidad de dosis durante un periodo de tiempo.

Los compuestos activos pueden prepararse para la administración como soluciones de bases libres o sales en agua farmacológicamente aceptables.

10 Las dispersiones también pueden prepararse en polietilenglicoles líquidos. En condiciones de almacenamiento y uso normales, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas, adecuadas para el uso en inyectables, incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la

15 preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La forma debe ser estéril y debe ser líquida hasta el grado de que pueda inyectarse fácilmente mediante una jeringa. Debe ser estable en las condiciones de preparación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El

20 vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) sacarosa, L-histidina, polisorbato 80 o mezclas adecuadas de los mismos. La prevención de la acción de microorganismos puede realizarse mediante diversos agentes antibacterianos y

25 antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico,

timerosal y similares. Las composiciones inyectables pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse usando agentes retardadores de la absorción en las composiciones.

- 5 Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos (por ejemplo polipéptidos FIX) en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con diversos otros principios indicados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración.

- 10 Generalmente, las dispersiones pueden prepararse incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contenga el medio de dispersión básico y los otros principios necesarios a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles, para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación incluyen, por ejemplo, técnicas de secado al vacío y de secado por congelación
15 que producen un polvo del principio activo más cualquier principio adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estéril de la misma.

- 20 La composición también puede incluir un agente antimicrobiano para prevenir o impedir el crecimiento microbiano. Los ejemplos no limitantes de agentes antimicrobianos adecuados para la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, tirmesol y combinaciones de los mismos.

- 25 En la composición también puede estar presente un antioxidante. Los antioxidantes pueden usarse para prevenir la oxidación, previniendo así el deterioro de la preparación. Los antioxidantes adecuados para su uso en la

presente invención incluyen, por ejemplo, ascorbil palmitato, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hidrofosforoso, monotioglicerol, propil galato, bisulfito de sodio, formaldehído sulfoxilato de sodio, metabisulfito formaldehído sulfoxilato de sodio y combinaciones de los mismos.

- 5 Como excipiente puede estar presente un tensioactivo. Los tensioactivos ejemplares incluyen: polisorbatos, tales como, Tween®-20 (monolaurato de polioxietilensorbitan) y Tween®-80 (monooleato de polioxietilensorbitan) y plurónicos tales como F68 y F88 (ambos de los cuales se encuentran disponibles a partir de BASF, Mount Olive, N.J.); ésteres de sorbitán; lípidos
- 10 tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides tales como colesterol; y agentes quelantes tales como EDTA, cinc y otros cationes adecuados.

- En la composición los ácidos o bases pueden estar presentes como un
- 15 excipiente. Los ejemplos no limitantes de ácidos que pueden usarse incluyen ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen, sin limitación, hidróxido de sodio,
- 20 acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, formato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumarato de potasio y combinaciones de los mismos.

- La cantidad de cualquier excipiente individual en la composición puede
- 25 variar dependiendo de la actividad del excipiente y de las necesidades

particulares de la composición. Típicamente, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual puede determinarse mediante experimentación rutinaria, es decir, preparando composiciones que contengan diversas cantidades del excipiente (variando de altas a bajas), examinar la estabilidad y otros
5 parámetros y después determinar el intervalo en el cual se consigue el rendimiento óptimo sin efectos adversos significativos. Generalmente, en la composición, el excipiente puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 99%, desde aproximadamente el 5% a aproximadamente el 98% en peso, desde aproximadamente el 15 a
10 aproximadamente el 95% en peso del excipiente, con concentraciones menores del 30% en peso. Los anteriores excipientes farmacéuticos, junto con otros excipientes, se describen en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy," ed. 19, Williams & Williams, (1995); the "Physician's Desk Reference," ed. 52, Medical Economics, Montvale, N.J. (1998); y Kibbe, A. H.,
15 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

Después de la formulación, las soluciones pueden administrarse de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz"
20 se usa en el presente documento para referirse a la cantidad de un polipéptido que es necesaria para proporcionar un nivel del polipéptido deseado en la corriente sanguínea o en el tejido diana. La cantidad exacta dependerá de numerosos factores, por ejemplo, del polipéptido FIX particular, de los componentes y características físicas de la composición terapéutica, de la
25 población de pacientes a la que se dirige, del modo de administración, de las

consideraciones individuales del paciente y similares y basándose en la información proporcionada en el presente documento, un experto en la materia puede determinarla.

Las formulaciones pueden administrarse fácilmente en una diversidad de formas de dosificación, tales como soluciones inyectables y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debería tamponarse adecuadamente, si fuera necesario, y en primer lugar el diluyente líquido se vuelve isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal.

Las dosificaciones de FIX se expresan normalmente en unidades. Una unidad de FIX por kg de peso corporal puede generar niveles en plasma de 0,01 U/ml, es decir, el 1%. Por otro lado, pacientes sanos poseen una unidad de FIX por ml de plasma, es decir el 100%. Los casos leves de hemofilia B se definen por concentraciones de FIX en plasma entre el 6-60%, los casos moderados entre el 1-5% y los casos graves, que representan aproximadamente la mitad de los casos de hemofilia B, poseen menos del 1% de FIX. El tratamiento profiláctico, o el tratamiento de hemorragia de menor importancia, normalmente requiere elevar los niveles de FIX a entre el 15-30%. El tratamiento de hemorragia moderada normalmente requiere elevar los niveles a entre el 30-50%, mientras que el tratamiento de traumatismo importante puede requerir elevar los niveles desde el 50 al 100%. El número total de unidades necesarias para elevar un nivel en la sangre del paciente puede determinarse de la siguiente manera: $1,0 \text{ unidades/kg} \times \text{peso corporal (kg)} \times \text{aumento en porcentaje deseado (\%normal)}$. La administración parenteral

puede realizarse con un bolo inicial seguido de infusión continua para mantener los niveles terapéuticos circulantes del producto farmacológico. En algunas realizaciones, puede administrarse entre 15 a 150 unidades/kg de polipéptido FIX. Los expertos habituales en la materia optimizarán fácilmente dosificaciones eficaces y regímenes de administración determinados por la buena práctica médica y la afección clínica del paciente individual.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de los agentes y de las vías de administración. Dependiendo de la vía de administración y de la dosificación deseada, la formulación farmacéutica óptima puede determinarla un experto en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 20ª edición, 2000, incorporada en el presente documento por referencia). Dichas formulaciones pueden ejercer influencia en el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de eliminación *in vivo* de los agentes administrados. Dependiendo de la vía de administración, puede calcularse una dosis adecuada de acuerdo con el peso corporal, área superficial corporal o tamaño del órgano. Los expertos habituales en la técnica, sin excesiva experimentación, realizan rutinariamente ajustes adicionales de los cálculos que son necesarios para determinar la dosis de tratamiento apropiada, especialmente a la luz de la información y ensayos con respecto a la dosificación divulgados en el presente documento, así como de los datos farmacocinéticos observados en estudios clínicos realizados en seres humanos y en animales. Los programas de dosificación ejemplares incluyen, sin limitación, la administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la

semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes y cualquier combinación de las mismas.

Las dosificaciones apropiadas pueden averiguarse con el uso de ensayos establecidos para determinar los niveles de coagulación en sangre
5 junto con los datos de respuesta a la dosis de interés. El régimen de dosificación final puede determinarlo el médico tratante, teniendo en cuenta los factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la actividad específica del fármaco, la gravedad de la lesión y la respuesta del paciente, la edad, la afección, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad
10 de cualquier infección, el tiempo de administración y otros factores clínicos.

Usos Ejemplares

Las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para tratar cualquier trastorno por sangrado asociado con defectos funcionales de FIX o con déficits de FIX, tales como, semivida de FIX reducida *in vivo*,
15 propiedades de unión de FIX modificadas, defectos genéticos de FIX y una concentración de FIX reducida en plasma. Los defectos genéticos de FIX comprenden, deleciones, adiciones y/o sustituciones de bases en la secuencia de nucleótidos que codifica a FIX. En una realización, el trastorno por sangrado puede ser hemofilia B. Los síntomas de dichos trastornos por sangrado
20 incluyen, por ejemplo, epistaxis grave, sangrado de la mucosa oral, hemartrosis, hematoma, hematuria persistente, sangrado gastrointestinal, sangrado retroperitoneal, sangrado lingual/retrofaríngeo, sangrado intracraneal y sangrado asociado con traumatismo.

Las composiciones de la presente invención pueden usarse para
25 aplicaciones profilácticas. En algunas realizaciones, los polipéptidos FIX

modificados pueden administrarse a un sujeto susceptible a, o de otra manera en riesgo de, una patología o lesión para potenciar la capacidad coagulativa del propio sujeto. Dicha cantidad puede definirse que es una "dosis profilácticamente eficaz". La administración de los polipéptidos FIX modificados para la profilaxis incluyen situaciones en las que un paciente, que padece hemofilia B, va a someterse a cirugía y el polipéptido se administra entre una a cuatro horas antes de la cirugía. Además, los polipéptidos se adaptan para su uso como un agente profiláctico contra el sangrado no controlado, opcionalmente en pacientes que no padecen hemofilia. Por tanto, el polipéptido puede administrarse, por ejemplo, antes de la cirugía a un paciente que está en riesgo de sangrado no controlado.

Los polipéptidos, materiales, composiciones y procedimientos descritos en el presente documento pretenden ser ejemplos representativos de la invención y se entenderá que el ámbito de la invención no está limitado por el ámbito de los ejemplos. Los expertos en la materia reconocerán que la invención puede llevarse a la práctica con variaciones de los polipéptidos, materiales, composiciones y procedimientos descritos y que dichas variaciones se consideran dentro del ámbito de la invención.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la invención descrita en el presente documento, pero de ninguna manera deben interpretarse como limitantes del ámbito de la invención..

EJEMPLOS

Para que la presente invención se entienda mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos poseen únicamente un fin ilustrativo y de ninguna manera debe interpretarse como que limitan el ámbito de la presente invención. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

Ejemplo 1: Clonación del ADNc del Factor IX humano

A partir de la secuencia de ADNc publicada (NM_000133), se diseñó un par de cebadores PCR complementarios a las secuencias en los extremos 5' y 3' de la región codificante del ADNc de FIX humano. El cebador 5' (FIXF1; ATCATAAGCTTGCCCACCATGCAGCGCGTGAACATG (SEC ID N°: 3), el codón de inicio de FIX se indica en negrita) contiene los 18 nucleótidos primeros de la región codificante de FIX que incluye el codón de inicio ATG precedido por una secuencia Kozak consenso (subrayada) y un sitio de restricción HindIII. El cebador 3' (FIXR3, ATCATAAGCTTGATTAGTTAGTGAGAGGCCCTG) (SEC ID N°: 4) contiene 22 nucleótidos de la secuencia de FIX que consiste en 45 nucleótidos del extremo 3' de la región codificante de FIX precedida por un sitio HindIII. La amplificación de la primera cadena de ADNc a partir de hígado humano normal (Stratagene, San Diego, CA) usando estos cebadores y la polimerasa de alta fidelidad correctora de errores (Invitrogen, Carlsbad, CA) dio como resultado una sola banda del tamaño esperado para el ADNc de FIX humano (1464 pb). Después de la digestión con HindIII, el producto PCR se purificó en gel y después se clonó en el sitio HindIII del plásmido pEAKfcmv. Los clones, en los que se insertó el ADNc de FIX en orientación directa con respecto al promotor del

CMV en el vector, se identificaron por digestión de restricción. La secuenciación del ADN bicatenario se realizó para el inserto de varios clones y el alineamiento de la secuencia derivada con respecto a la secuencia de FIX demostró que el ADNc codifica el FIX humano con la treonina en el aminoácido 148 de la proteína madura. Este plásmido se denominó pEAKflcmv-FIX.

Ejemplo 2: Generación de Polipéptidos del Factor IX Modificados

Para cambiar diversos aminoácidos dentro de la secuencia de FIX humana, se diseñó un par de cebadores usando el programa de diseño de cebadores Quickchange™ (Stratagene, San Diego, CA). Estos cebadores se usaron para generar mutaciones en el plásmido pEAKflcmv-FIX empleando el kit de mutagénesis dirigida Quickchange™ II XL (Stratagene, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los clones que contenían la mutación deseada se identificaron por secuenciación de ADN de toda la región codificante de FIX. En la Tabla 1 se muestra la secuencia del oligonucleótido de cadena con sentido usada para crear las mutaciones.

TABLA 1

Sustitución	Secuencia de Oligonucleótidos de Cadena con Sentido
V86A	d: AGGAAAGAACTGTGAATTAGATGCCACATGTAACATTAAGAATGGCA (SEC ID Nº: 5) i: TGCCATTCTTAATGTTACATGTGGCATCTAATTCACAGTTCTTTCT (SEC ID Nº: 6)
V86P	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATCCCACATGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 7) i: CTGCCATTCTTAATGTTACATGTGGGATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 8)
V86E	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATGAGACCTGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 9) i: CTGCCATTCTTAATGTTACAGGTCTCATCTAATTCACAGTTCTTT CC (SEC ID Nº: 10)
V86S	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATAGCACCTGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 11) i: CTGCCATTCTTAATGTTACAGGTGCTATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 12)

(continuación)

Sustitución	Secuencia de Oligonucleótidos de Cadena con Sentido
V86I	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATATCACCTGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 13) i: CTGCCATTCTTAATGTTACAGGTGATATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 14)
V86R	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATAGAACCTGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 15) i: CTGCCATTCTTAATGTTACAGGTTCTATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 16)
V86Q	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATCAGACATGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 17) i: CTGCCATTCTTAATGTTACATGTCTGATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 18)
V86T	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATACCACCTGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 19) i: CTGCCATTCTTAATGTTACAGGTGGTATCT AATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 20)
V86D	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATGACACCTGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 21) i: CTGCCATTCTTAATGTTACAGGTGTCATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 22)
V86H	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATCACACCTGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 23) i: CTGCCATTCTTAATGTTACAGGTGTGATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 24)
V86N	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATAACACCTGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 25) i: CTGCCATTCTTAATGTTACAGGTGTTATCTAATTCACAGTTCTTT CC (SEC ID Nº: 26)
V86L	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATCTGACATGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 27) i: CTGCCATTCTTAATGTTACATGTCAGATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 28)
V86M	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATATGACCTGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 29) i: CTGCCATTCTTAATGTTACAGGTCATATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 30)
V86Y	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATTACACCTGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 31) i: CTGCCATTCTTAATGTTACAGGTGTAATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 32)
V86K	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATAAGACATGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 33) i: CTGCCATTCTTAATGTTACATGTCTTATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 34)
V86F	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATTTACCTGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 35) i: CTGCCATTCTTAATGTTACAGGTGAAATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 36)
V86C	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATTGCACCTGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 37) i: CTGCCATTCTTAATGTTACAGGTGCAATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 38)
V86W	d: GGAAAGAACTGTGAATTAGATTGGACCTGTAACATTAAGAATGGCAG (SEC ID Nº: 39) i: CTGCCATTCTTAATGTTACAGGTCCAATCTAATTCACAGTTCTTTCC (SEC ID Nº: 40)

(continuación)

Sustitución	Secuencia de Oligonucleótidos de Cadena con Sentido
V86G	d: GAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGGCACCTGTAACATTAAGAATGGCAGATGCG (SEC ID Nº: 41) i: CGCATCTGCCATTCTTAATGTTACAGGTGCCATCTAATTCACAGTTCTTTCCTTC (SEC ID Nº: 42)
E410N	d: TCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGAACAAAACAAAGCTCACTTAATGAAAG (SEC ID Nº: 43) i: CTTTCATTAAGTGAGCTTTGTTTTGTTCTTAATCCAGTTGACATACCGGGA (SEC ID Nº: 44)
E410Q	d: TCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGCAGAAAACAAAGCTCACTTAATGAAAG (SEC ID Nº: 45) i: CTTTCATTAAGTGAGCTTTGTTTTCTGCTTAATCCAGTTGACATACCGGGA (SEC ID Nº: 46)
N157A	CTGTTTTCTGATGTGGACTACGTAGCCTCTACTGAAGCTGAAACCATCT (SEC ID Nº: 47)
N167A	GAAGCTGAAACCATCTAGATGCCATCACTCAAAGCACCCAATC (SEC ID Nº: 48)
R338A	CTTGTTGACCGAGCCACATGCCTTG <u>GCAT</u> CTACAAAGTTCACCATC (SEC ID Nº: 49)
R338L	CTTGTTGACCGAGCCACATGCCTT <u>CTG</u> TCTACAAAGTTCACCATC (SEC ID Nº: 50)
R338V	GACCGAGCCACATGCCTT <u>GTG</u> TCTACAAAGTTCACCATC (SEC ID Nº: 51)
R338I	GTTGACCGAGCCACATGCCTT <u>ATCT</u> CTACAAAGTTCACCATCTATAAC (SEC ID Nº: 52)
R338F	GTTGACCGAGCCACATGCCTT <u>TTCT</u> CTACAAAGTTCACCATCTATAAC (SEC ID Nº: 53)
R338W	CTTGTTGACCGAGCCACATGCCTT <u>TGGT</u> CTACAAAGTTCACCATC (SEC ID Nº: 54)
R338M	CACTTGTTG ACCGAGCCACATGCCTT <u>ATGT</u> CTACAAAGTTCACCATC (SEC ID Nº: 55)
R338S	CTTGTTG ACCG AGCC AC ATGCCTT <u>AGCT</u> CTACAAAGTTCACCATC (SEC ID Nº: 56)
R338T	GTTGACCGAGCCACATGCCTT <u>ACCT</u> CTACAAAGTTCACCATC (SEC ID Nº: 57)

Ejemplo 3: Expresión de Polipéptidos del Factor IX en Células HKB11

Para determinar si los genes de FIX con secuencias de proteína modificadas podrían expresarse y secretarse a partir de células de mamífero y para determinar el efecto de estas sustituciones sobre la actividad de coagulación de FIX, se transfectaron plásmidos de expresión, que codificaban estas variantes de FIX, en células HKB11. HKB11 es una línea celular humana generada por la fusión de células HEK293 y un linfoma de linfocitos B.

Las células HKB11 se cultivaron en un cultivo de suspensión sobre un agitador orbital (100-125 rpm) en una incubadora con CO₂ (5%) a 37 °C en medio asérico complementado con vitamina K₃ soluble 10 ng/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se conservaron a una densidad entre 0,25 y 1,5 x 10⁶ células/ml.

Para la transfección las células se recogieron por centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos y después se resuspendieron en Medio de Expresión FreeStyle™ 293 (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 1,1 x 10⁶ células/ml. Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos (4,6 ml/pocillo) y se incubaron sobre un rotor orbital (125 rpm) en una incubadora con CO₂ a 37 °C. Para cada pocillo, se mezclaron 5 µg de ADN de plásmido con 0,2 ml de medio Opti-MEM® I (Invitrogen). Para cada pocillo, se mezclaron solamente 7 µl de reactivo 293fectin™ (Invitrogen) con 0,2 ml de medio Opti-MEM® I y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadió 293fectin™ diluido a la solución de ADN diluida, se mezcló suavemente, se incubó a temperatura ambiente durante 20-30 minutos y después se añadió a cada pocillo que se había sembrado con 5 x 10⁵ células HKB11 (4,6 ml). Después las células se incubaron sobre un rotor orbital (125 rpm) en una incubadora con CO₂ a 37 °C

durante 3 días, después de los cuales, las células se sedimentaron por centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante y se conservó a 4 °C.

Ejemplo 4: Expresión de Polipéptidos de Factor IX en Células BHK21

- 5 Para determinar si los genes de FIX con secuencias de proteína modificadas podrían expresarse y secretarse a partir de células de mamífero y para determinar el efecto de estas sustituciones sobre la actividad de coagulación de FIX, se transfectaron plásmidos de expresión que codificaban estas variantes de FIX en células BHK21.
- 10 Las células BHK21 se cultivaron en un cultivo de suspensión sobre un agitador orbital (100-125 rpm) en una incubadora con CO₂ al 5% a 37 °C en un medio asérico apropiado complementado con 10 ng/ml de vitamina K3 soluble (Menadione, Sigma) y se conservó a una densidad entre 0,25 y 1,5 x 10⁶ células/ml.
- 15 Para la transfección, las células se recogieron por centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos y después se resuspendieron a 1 x 10⁶ células/ml.
 Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (4,6 ml/pocillo) y se incubaron en un rotor orbital (125 rpm) en una incubadora con CO₂ a 37 °C. Para cada pocillo, se mezclaron 5 µg de ADN de plásmido con 0,2 ml de medio
20 Opti-MEM I (Invitrogen). Para cada pocillo, se mezclaron suavemente, 7 µl de reactivo 293Fectin (Invitrogen) con 0,2 ml de medio Opti-MEM I y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadió 293Fectin diluido a la solución de ADN diluida, se mezcló suavemente, se incubó a temperatura ambiente durante 20-30 minutos y después se añadió a cada pocillo que se
25 había sembrado con 5 x 10⁶ (4,6 ml) células BHK21. Después las células se

incubaron sobre un rotor orbital (125 rpm) en una incubadora con CO₂ a 37 °C durante 3 días, después de los cuáles, las células se sedimentaron por centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se recogió y se conservó a 4 °C.

5 ***Ejemplo 5: Transferencia de Western para el Factor IX.***

El sobrenadante del cultivo celular (50 µl) se mezcló con colorante de carga SDS-PAGE 4x 20 µl, se calentó a 95 °C durante 5 minutos, se cargó sobre geles SDS-PAGE al 4-12% NuPAGE® y después se transfirió a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear con leche en polvo al 5% durante 30 minutos, las membranas se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra marcado con HRP contra FIX humano (US Biological, Swampscott, Massachusetts, Catálogo N° F0017-07-13) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con solución salina tamponada con fosfato con tampón Tween®-20 al 0,1%, se detectó la señal de la HRP usando SuperSignal® Pico (Pierce, Rockford, IL) y exposición a película de rayos x.

10

15

Ejemplo 6: ELISA para el Factor IX

Los niveles de antígeno FIX en los sobrenadantes de cultivo celular se determinaron usando un kit de ELISA para FIX (Hyphen Biomed/Aniara, Mason, OH). El sobrenadante de cultivo celular se diluyó en tampón de diluyente de muestra (proporcionado en el kit) para conseguir una señal en el intervalo de la curva patrón. Para crear una curva patrón de 100 ng/ml a 0,2 ng/ml, se usó la proteína FIX purificada de plasma humano (Hyphen Biomed/Aniara, N° de Catálogo RK 032A, actividad específica 196 U/mg) diluida en el diluyente de muestra. Las muestras diluidas y los patrones se añadieron a la placa ELISA que estaba previamente revestida con un

20

25

anticuerpo de captura anti-FIX policlonal. Después de añadir el anticuerpo de detección policlonal, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavó bien, se reveló después usando sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), como se describía en el kit del fabricante, y la señal se midió a 450 nM usando un lector de placa SpectraMax® (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La curva patrón se ajustó a una representación gráfica de 2 componentes y los valores desconocidos se extrapolaron a partir de la curva.

Los niveles de expresión de FIX también se cuantificaron usando reactivos ELISA para FIX disponibles en el mercado (Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Placas MaxiSorp™ (Nunc™, Rochester, NY) de 384 pocillos se revistieron con aglutinina de germen de trigo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los pocillos se bloquearon, se lavaron y después se añadió sobrenadante. Después del lavado adicional, se realizó la detección usando anticuerpo anti-FIX policlonal acoplado a HRP ((Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen, Alemania).

Ejemplo 7. Ensayo de Coagulación del Factor IX

La actividad de coagulación de FIX se determinó usando un ensayo TTPa (Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado) en plasma humano carente de FIX procesado sobre un analizador de coagulación automático Electra™ 1800C (Beckman Coulter, Fullerton, CA). En resumen, el instrumento creó tres diluciones de muestras de sobrenadante en diluyente de coagulación y después se mezclaron 100 µl con 100 µl de plasma carente de FIX (Aniara, Mason, OH) y 100 µl de reactivo TTPa automatizado (fosfolípido de cerebro de conejo y sílice micronizada) bioMérieux, Inc., Durham, NC). Después de la adición de 100 µl de solución de CaCl₂ 25 mM, se registró el tiempo de

formación de coágulo. Se generó una curva patrón para cada proceso usando diluciones en serie del mismo FIX humano purificado (Hyphen Biomed/Aniara) usado como el patrón en el ensayo ELISA. La curva patrón fue habitualmente una línea recta con un coeficiente de correlación de 0,95 o mejor y se usó para

5 determinar la actividad de FIX de las muestras desconocidas. En la Tabla 2 se muestra la actividad para los polipéptidos FIX que comprenden una sustitución de aminoácido en la posición 86. En las Tablas 3 y 4 se muestra la actividad para los polipéptidos FIX que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos.

10

TABLA 2

Sustitución Factor IX	Expresión de proteína (% de tipo silvestre)	Actividad (% de tipo silvestre)	Actividad específica (% de tipo silvestre)
Factor IX de tipo Silvestre	100	100	100
V86A	31	142	458
V86P	58	231	399
V86E	103	241	233
V86S	98	164	167
V86I	39	59	153
V86Q	88	109	123
V86G	102	122	115
V86R	78	82	105
V86T	181	60	74

(continuación)

Sustitución Factor IX	Expresión de proteína (% de tipo silvestre)	Actividad (% de tipo silvestre)	Actividad específica (% de tipo silvestre)
V86D	68	45	67
V86H	71	41	57
V86N	89	42	47
V86L	90	26	28
V86M	72	19	26
V86K	68	12	17

TABLA 3

Sustitución Factor IX	Expresión de proteína (% de tipo silvestre)	Actividad (% de tipo silvestre)	Actividad específica (% de tipo silvestre)
FIX de tipo Silvestre	100	100	100
R338A	95	395	450
V86A	120	205	180
R338A/V86A	55	550	1200
R338A/V86P	72	727	999
R338A/V86E	110	554	492
R338A/V86S	140	544	360
R338A/V86A/E410N	79	2150	2700
R338A/V86A/E410Q	66	2350	3550

TABLA 4

Sustitución de aminoácidos		Actividad en veces sobre R338A/V86A
85	87	
W	R	3,15
F	I	2,30
W	W	2,30
R	R	2,21
I	R	2,06
Y	F	1,98
I	M	1,97
F	R	1,94
F	V	1,88
R	K	1,79
H	I	1,72
I	I	1,72
Y	K	1,71
S	R	1,71
Y	R	1,71
G	K	1,62
H	W	1,55
H	K	1,46
F	K	1,45
H	V	1,42
N	T	1,39
M	I	1,36
H	M	1,17

Ejemplo 8: Medición de FIX Circulante

La semivida de los polipéptidos FIX circulantes se midió usando un ensayo *in vitro*. Este ensayo se basó en la capacidad de FIX, *in vivo* e *in vitro*, para mediar la acumulación de adenovirus (Ad) en hepatocitos. En resumen, se demostró que FIX podía unir el dominio del botón de la fibra de Ad y proporcionar un puente para captar el virus a través de los proteoglicanos de heparán sulfato (PGHS) de la superficie celular (Shayakhmetov, et al., J. Virol 79:7478-749 1, 2005). Un mutante vectorial de adenovirus, el Ad5mut, que contiene mutaciones en el dominio del botón de la fibra no se une a FIX. El Ad5mut posee una capacidad para infectar células hepáticas y una toxicidad hepática *in vivo*, significativamente reducidas, lo que demuestra que FIX desempeña un papel principal en el direccionamiento de vectores Ad a células hepáticas (Shayakhmetov, et al., 2005). La capacidad de FIX para dirigir vectores de Ad a células hepáticas puede bloquearse por inhibidores de interacciones proteína- PGHS (Shayakhmetov, et al., 2005).

Además, la captación de FIX mediada por PGHS contribuye significativamente a eliminar FIX y por lo tanto, interferir con la interacción PGHS que se espera para aumentar la semivida de FIX. Por lo tanto, se mide la captación *in vitro* de FIX y/o de variantes de FIX en hepatocitos y se espera que las variantes con captación reducida posean una semivida *in vivo* aumentada.

Para medir la semivida de FIX *in vitro*, se incubaron células de mamífero con adenovirus en presencia o ausencia de FIX o de variantes de FIX. La captación viral está medida por FIX de tipo silvestre y se mide por la expresión del gen indicador codificado en el genoma viral, por ejemplo, expresión de la

proteína fluorescente verde (PFV) o luciferasa. La captación reducida de adenovirus, en presencia de variantes de FIX, se mide como la expresión del gen indicador reducida, por ejemplo, una actividad enzimática de fluorescencia de la PFV o luciferasa reducida en comparación con la de FIX de tipo silvestre.

- 5 La semivida circulante de FIX se mide *in vivo* usando técnicas convencionales bien conocidas por los expertos habituales en la materia. En resumen, la dosis respectiva de FIX o variantes de FIX se administra a un sujeto por inyección intravenosa. Después de la inyección se extraen muestras de sangre a diversos momentos y la concentración de FIX se determina
- 10 mediante un ensayo apropiado (por ejemplo, ELISA). Para determinar la semivida, es decir, el tiempo en el cual la concentración de FIX es la mitad de la concentración de FIX inmediatamente después de la dosificación, la concentración de FIX, a los diversos momentos, se compara con la concentración de FIX esperada o medida inmediatamente después de
- 15 administrar la dosis de FIX. Se espera una correlación entre captación celular reducida, en el ensayo *in vitro*, y semivida aumentada en el ensayo *in vivo*.

Ejemplo 9: GlucoPEGilación de FIX modificado

- Aproximadamente 5 mg de una proteína FIX modificada se intercambiaron a un Tampón de Reacción (HEPES 25 mM, pH 7,7, NaCl 50
- 20 mM, CaCl₂ 10 mM, TWEEN-80 0,01%) para eliminar la sacarosa y los aminoácidos que interferían con las reacciones de conjugación, después se cargaron sobre una columna de desalinización de 5 ml HiTrap (Sephadex G25) con un sistema de cromatografía AKTA-FPLC (GE) a un caudal de 1 ml/min usando un asa de muestra de 1-ml (Tampón de Reacción como fase móvil).
- 25 Las fracciones de proteína se recogieron y se agruparon (~2 ml) en un tubo

tapado a rosca. A esta solución FIX (~2,1 mg/ml) se añadió una solución madre de meta-peryodato de sodio (Sigma nº 311448, Pm 213,89, NaIO_4) (solución acuosa 400 mM, recién preparada) para conseguir una $[\text{NaIO}_4]$ final de 2 mM por oxidación leve, produciendo aldehídos reactivos en los restos de
5 carbohidrato de FIX. La mezcla se incubó a 4 °C durante 60 minutos en la oscuridad sobre un rotor. También fueron eficaces concentraciones de meta-peryodato de sodio tan bajas como 0,5 mM.

Después, la etapa de oxidación finalizó inactivando el NaIO_4 residual con una solución acuosa de glicerol 2 M (a una concentración final de glicerol 20
10 mM) en una incubación adicional de 15 minutos a 4 °C. La mezcla de reacción de oxidación (~2 ml) se cargó directamente sobre la columna G25, de nuevo como se ha descrito anteriormente, para separar el FIX recombinante oxidado del resto de NaIO_4 , glicerol y gliceraldehídos que, por otro lado, podrían interferir con la siguiente reacción de PEGilación.

15 A la solución FIX oxidada resultante en el Tampón de Reacción (~0,95 mg/ml, 4,3 mg en 4,5 ml) se añadieron 80 mg de Hidracina-PEG30 (exceso molar 40x, NOF Catálogo nº SUNBRIGHT ME-300HZ) y anilina 10 mM (solución madre 1 M en EtOH al 100%) y la reacción de PEGilación se realizó durante una noche, sobre una plataforma giratoria, a 4°C. Se encontró que la
20 condición óptima para la reacción de PEGilación era de 0,3 a 0,9 mg/ml de [FIX], con Hidracina-PEG30 añadida a un exceso molar de 5 a 40 veces sobre [FIX]. El tiempo de PEGilación pudo optimizarse adicionalmente para modificar la proporción de FIX monoPEGilado con respecto a FIX diPEGilado.

La amplia caracterización de FIX glucoPEGilado por SDS-PAGE, azul
25 de Coomassie, tinción de yodo, análisis de transferencia de Western y

cromatografía por exclusión de tamaño, demostró que FIX glucoPEGilado contenía aproximadamente FIX mono-PEGilado al 70% y FIX di-PEGilado al 30%. La optimización adicional del método de glucoPEGilación para FIX se consiguió reduciendo la concentración de metaperyodato de sodio a 0,5 mM, usando un exceso molar de 5 veces de amino-oxi-PEG a una concentración del Factor IX de 0,6 mg/ml, optimizando el tiempo de reacción de PEGilación y la purificación sobre una columna de heparina seguido de una columna de exclusión de tamaño. Usando condiciones optimizadas fue posible conseguir una especie PEGilada homogénea al 98,7%. La tasa y grado de oxidación de carbohidratos por el peryodato puede controlarse por el tiempo de reacción, pH, temperatura y concentración de peryodato, como se describe, por ejemplo, para los anticuerpos por Wolfe y Hage, 1995 18. Se describió que los restos de ácido siálico en glucoproteínas podían oxidarse específicamente con peryodato de sodio (NaIO₄) usando peryodato 1 mM y una temperatura de 0 °C. La especificidad de sitio de la glucopegilación de FIX pudo optimizarse usando peryodato 1 mM o incluso concentraciones más bajas. La optimización de la etapa de inactivación también podría conseguirse. Finalmente la etapa de PEGilación podría optimizarse, por ejemplo, mediante el uso de PEG con diferentes pesos moleculares, por ejemplo 5K, 10K, 15K, 20K, 30K, 40K, 60K o hasta 150K. También podrían usarse polímeros alternativos, como se describe anteriormente en la introducción. La química de engarce alternativa que utiliza grupos reactivos alternativos unidos al resto de PEG u otro polímero también puede usarse, como se describe anteriormente en la introducción, incluyendo, por ejemplo, amino-oxi-PGE o Hidroxi-PEG-Amina.

Ejemplo 10: GlucoPEGilación de FIX-R338A usando PEG-hidrazida

Usando procedimientos convencionales, se generó una línea celular BHK21 que expresaba el Factor IX Humano que contenía la mutación R338A (FIX-R338A) y se fabricó a escala para fermentación en un reactor de perfusión a escala de 15 l. La proteína FIX-R338A secretada en el medio se purificó a una pureza del 98% por cromatografía de intercambio iónico. La proteína resultante se sometió a glucoPEGilación usando Hidrazina-PEG de 40 kDa, como se describe anteriormente en la sección "Procedimientos". La producción de FIX-R338A PEGilado pudo aumentarse desde aproximadamente el 10% a aproximadamente el 50% por la inclusión de anilina como un catalizador durante la reacción de PEGilación. Se realizó PEGilación a gran escala sobre 5 mg de FIX-R338A y la proteína resultante se ensayó para determinar la actividad de coagulación *in vitro* mediante el ensayo TTPa (usando ácido elágico como activador) o en un kit comercial de ensayo cromogénico. Ambos ensayos usados comercialmente produjeron FIX de tipo silvestre recombinante (rFIX) para generar una curva patrón. En cada ensayo se procesaron controles del material de partida (FIX-R338A) y rFIX. Los datos mostrados en la Tabla 5 indican que el FIX-R338A glucoPEGilado tuvo entre el 47% y el 60% de la actividad del material de partida pero entre el 184% y el 189% de la actividad de rFIX.

Tabla 5: actividad de coagulación *in vitro* de FIX-R338A GlucoPEGilado

Proteína	Actividad específica mediante ensayo TTPa (IU/mg)	Actividad específica mediante ensayo Cromogénico (IU/mg)
rFIX	321	196
FIX-R338A	1270	621
FIX-R338A GlucoPEGilado	591	370
rFIX GlucoPEGilado	no determinada	122
Actividad específica como porcentaje de proteína no PEGilada		
% de rFIX con respecto a FIX-R338A GlucoPEGilado	184%	189%
% de FIX-R338A con respecto a FIX-R338A GlucoPEGilado	47 %	60%
% de rFIX con respecto a rFIX GlucoPEGilado		62%

Combinando la PEGilación sobre azúcares en el péptido de activación con una variante de FIX de mayor actividad fue posible generar un FIX PEGilado con una actividad específica aproximadamente 2 veces mayor que la de la proteína FIX de tipo silvestre recombinante. Cuando rFIX se sometió al mismo procedimiento de glucoPEGilación y purificación el rFIX glucoPEGilado resultante tuvo una actividad específica de 122 IU/mg mediante el ensayo cromogénico que es el 59% de la actividad específica de rFIX no modificado.

Por tanto, comparado con el FIX de tipo silvestre recombinante glucoPEGilado, el R338A glucoPEGilado tuvo una actividad específica 3 veces mayor lo que permitiría conseguir el mismo beneficio terapéutico con 3 veces menos de proteína.

- 5 El análisis en gel del FIX-R338A glucoPEGilado indicó que la proteína contenía una mezcla de FIX-R338A PEGilado solo en un sitio (mono-PEGilado) o en dos sitios (di-PEGilado). El gel teñido con Coomassie, que tiñe proteínas, indicó la presencia de dos bandas principales PEGiladas indicativas de FIX-R338A mono-PEGilado y di-PEGilado. La forma mono-PEGilada pareció ser la forma predominante.

Ejemplo 11: GlucoPEGilación de FIX modificado usando amino-oxi-PEG

- En primer lugar el tampón del Factor IX (FIX) purificado se intercambió a un Tampón de Reacción (HEPES 25 mM, pH 7,7, NaCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween-80 al 0,01% p/v) usando una columna de desalinización de 5 ml HiTrap (GE Healthcare) en un sistema de cromatografía AKTA-FPLC (GE Healthcare) a un caudal de 1 ml/min. Las fracciones de proteína se recogieron y se agruparon. El FIX se oxidó añadiendo metaperyodato de sodio (NaIO₄) (Sigma) recién preparado a partir de una solución madre acuosa de 400 mM hasta una concentración final de 2 mM. La oxidación de FIX produce aldehídos reactivos en los restos de carbohidrato de FIX que pueden modificarse por amino-oxi-PEG o hidracina-PEG. La mezcla se incubó a 4 °C durante 60 minutos en la oscuridad sobre un rotor. El NaIO₄ se inactivó por la adición de glicerol 2 M a una concentración final de glicerol 20 mM e incubación adicional durante 15 minutos a 4 °C. La mezcla de reacción de oxidación se cargó directamente sobre la columna de desalinización, de nuevo como se ha descrito

anteriormente, para separar el FIX oxidado del exceso de NaIO_4 , glicerol y gliceraldehído, lo que podría interferir con la siguiente PEGilación. A la solución resultante de FIX oxidado (concentración de FIX $\sim 0,5$ mg/ml), se añadió un exceso molar de 40 veces de metoxi-PEG-30-oxamina sólida (NOF cat nº 5 SUNBRIGHT ME-300CA) y anilina 10 mM (solución madre 1 M en EtOH al 100%). La reacción de PEGilación se realizó durante una noche, sobre una plataforma giratoria a 4 °C. Se encontró que la condición óptima de la reacción de PEGilación era de 0,3 - 0,9 mg/ml de FIX con un exceso molar de PEG de 20- 40 veces. El tiempo de PEGilación pudo optimizarse adicionalmente para 10 modificar la proporción de FIX mono-PEGilado con respecto a FIX di-PEGilado.

La mezcla de la reacción de PEGilación se diluyó a 1:1 con Tampón de Reacción y se cargó sobre una columna de 1 ml de Heparina HP HiTrap™ (GE) usando un sistema de cromatografía AKTA a un caudal de 0,5 ml/min para purificar el FIX PEGilado. El PEG libre no se unió a la columna de heparina. El 15 FIX PEGilado se separó del FIX no PEGilado por elución en gradiente (Tampón B del 0-100% durante 20 minutos). El Tampón A fue Tampón de Reacción y el Tampón B fue HEPES 25 mM, pH 7,7, NaCl 500 mM, CaCl_2 20 mM, Tween-80 al 0,01% p/v). El FIX PEGilado se eluyó primero, seguido por la elución del FIX no PEGilado. Las fracciones que contenían el FIX PEGilado se agruparon y se 20 sometieron a eliminación de endotoxinas. Las posibles endotoxinas se eliminaron usando una columna Endotrap de 1-ml rellena con perlas HD EndoTrap Profos® AG usando H_2O apirógena. La columna se unió al sistema AKTA usando tubos esterilizados. Todo el recubrimiento del instrumento AKTA y la columna se esterilizó con NaOH 1 N en Etanol al 20% durante 1 hora 25 seguido de Ácido Acético 0,1 N, Etanol al 20% durante 2 horas. Después, la

columna se lavó bien con agua Milli-Q. A la columna se aplicó primero Tampón de Regeneración (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 1 M, EDTA 2 mM), después, la columna se equilibró con Tampón B al 50% (HEPES 25 mM, pH 7,7, NaCl 500 mM, CaCl₂ 20 mM, Tween-80 al 0,01%) a 1 ml/min. El FIX PEGilado de la
5 columna de heparina se cargó sobre la columna Endotrap a 0,5 ml/min y el caudal a través de la fracción, que contenía FIX, se recogió en un envase estéril apirógeno.

El FIX PEGilado purificado y sin endotoxinas se concentró, se cambió el tampón 6 veces a tampón de Formulación (NaCl 0,234%, histidina 8 mM,
10 sacarosa al 0,8%, glicina 208 mM, Tween-80 al 0,004%) por ultrafiltración (límite de PM de 10K), se dividió en alícuotas y después de congelar rápidamente, se conservó a -80 °C. La concentración de proteína de FIX GlucoPEG se determinó midiendo el valor A₂₈₀ (coeficiente de extinción de 13,3 (mg/ml)⁻¹cm⁻¹). La actividad específica se calculó a partir de la concentración de
15 la proteína y de los ensayos cromogénico y de TTPa (usando ácido elágico como activador). También se evaluó la posible contaminación con FIXa y endotoxinas mediante los ensayos de detección de endotoxinas y cromogénico de FIXa. También se realizó una caracterización bioquímica adicional de FIX GlucoPEGilado (SDS-PAGE con tinción de Azul de Coomassie y yodo, análisis
20 de transferencia de Western, cromatografía de exclusión de tamaño), que demostró que el FIX GlucoPEGilado (Pico 1) contiene FIX monoPEGilado al 60% y FIX diPEGilado al 40%. Se calculó la eficacia de PEGilación al 50% y una recuperación total al 30%.

Ejemplo 12: GlucoPEGilación de FIX-R338A usando amino-oxi-PEG

25 Usando procedimientos generales se generó una línea celular BHK21

que expresaba el Factor IX Humano que contenía la mutación R338A (FIX-R338A) y se fabricó a escala para fermentación en un reactor de perfusión a escala de 15 l. La proteína FIX-R338A secretada en el medio se purificó a una pureza del 98% por cromatografía de intercambio iónico. La proteína FIX-R338A resultante se sometió a glucoPEGilación usando un amino-oxi-PEG de 30 kDa, como se ha descrito anteriormente. Se realizó una PEGilación sobre 5 mg de FIX-R338A y la proteína resultante se ensayó para determinar la actividad de coagulación *in vitro* mediante el ensayo de TTPa (usando ácido elágico como activador) o en un kit de ensayo cromogénico comercial. Ambos ensayos, usados comercialmente, produjeron FIX de tipo silvestre recombinante para generar una curva patrón. En cada ensayo se procesaron controles del material de partida (FIX-R338A) y de rFIX. Los datos mostrados en la Tabla 6 indican que el FIX-R338A glucoPEGilado tuvo entre el % y el % de la actividad del material de partida pero ente el % y el % de la actividad de rFIX.

Tabla 6: Actividad de coagulación *in vitro* de FIX-R338A GlucoPEGilado y de rFIX GlucoPEGilado generados usando amino-oxi PEG

Proteína	Actividad específica mediante ensayo TTPa (IU/mg)	Actividad específica mediante ensayo cromogénico(IU/mg)
rFIX	246	279
FIX-R338A	1623	1326
FIX-R338A GlucoPEGilado	661	970
rFIX GlucoPEGilado	120	198

(continuación)

Proteína	Actividad específica mediante ensayo TTPa (IU/mg)	Actividad específica mediante ensayo cromogénico(IU/mg)
Actividad específica como porcentaje		
% de FIX-R338A con respecto a FIX-R338A GlucopEGilado	41 %	73 %
% de rFIX con respecto a FIX-R338A GlucopEGilado	268 %	347 %
% de rFIX con respecto a rFIX GlucopEGilado	48%	70%
% de rFIX GlucopEGilado con respecto a FIX-R338A GlucopEGilado	551 %	489 %

Ejemplo 13: GlucoPEGilación de FIX-R338A usando amino-oxi-PEG en condiciones optimizadas para producir FIX-R338A monoPEGilado homogéneo

5 Usando procedimientos convencionales, se generó una línea celular BHK21 que expresaba el Factor IX Humano que contenía la mutación R338A (FIX-R338A) y se fabricó a escala para fermentación en un reactor de perfusión a escala de 15 l. La proteína FIX-R338A secretada presente en el medio se purificó a una pureza del 98% por cromatografía de intercambio iónico. En
10 primer lugar 10 mg de la proteína FIX-R338A se intercambiaron de tampón a

un Tampón de Reacción (HEPES 25 mM, pH 7,7, NaCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween-80 al 0,01% p/v) usando una columna de desalinización de 5 ml HiTrap (GE Healthcare) sobre un sistema de cromatografía AKTA-FPLC (GE Healthcare) a un caudal de 1 ml/min. Las fracciones de proteína se recogieron y se agruparon. El FIX se oxidó añadiendo metaperyodato de sodio (NaIO₄) (Sigma) recién preparado a partir de una solución madre acuosa 400 mM a una concentración final de 0,5 mM. La oxidación de FIX produce aldehídos reactivos en los restos de carbohidrato de FIX que pueden modificarse por amino-oxi-PEG. La mezcla se incubó a 4 °C durante 60 minutos en la oscuridad en un rotor. El NaIO₄ se inactivó por la adición de glicerol 2 M a una concentración final de glicerol 20 mM e incubación adicional durante 15 minutos a 4 °C. La mezcla de reacción de oxidación se cargó directamente sobre la columna de desalinización, de nuevo como se ha descrito anteriormente, para separar el FIX oxidado del exceso de NaIO₄, glicerol y gliceraldehído, lo que podría interferir con la siguiente PEGilación. A la solución FIX resultante oxidada (concentración FIX ~ 0,6 mg/ml) se añadió un exceso molar de 5 veces sobre la proteína FIX de metoxi-PEG-30-oxiamina sólida (NOF cat nº SUNBRIGHT ME-300CA) y anilina 10 mM (solución madre 1 M en EtOH al 100%). La reacción de PEGilación se realizó durante 2 horas sobre una plataforma giratoria a 4 °C. La mezcla de reacción de PEGilación se diluyó a 1:1 con Tampón de Reacción y se cargó sobre una columna de 1 ml de Heparina HP HiTrap™ (GE) usando un sistema de cromatografía AKTA a un caudal de 0,5 ml/min para purificar el FIX PEGilado. El PEG libre no se unió a la columna de heparina. El FIX PEGilado se separó del FIX no PEGilado por elución en gradiente (Tampón B del 0-100% durante 20 min). El Tampón A era

el Tampón de Reacción y el Tampón B era HEPES 25 mM, pH 7,7, NaCl 500 mM, CaCl₂ 20 mM, Tween-80 al 0,01% p/v). Primero se eluyó el FIX PEGilado, seguido de elución del FIX no PEGilado. Las fracciones que contenían principalmente el FIX monoPEGilado se agruparon y se sometieron a

5 cromatografía de exclusión de tamaño (SD200) para separar adicionalmente el FIX-R338A monoPEGilado, el FIX-R338A diPEGilado y el FIX-R338A libre. Las fracciones que contenían el FIX monoPEGilado homogéneo al 95% se recogieron, se concentraron y se dializaron de nuevo en un tampón de

10 formulación (NaCl 0,234%, histidina 8 mM, sacarosa al 0,8%, glicina 208 mM, Tween-80 al 0,004%), se dividieron en alícuotas y después de congelar rápidamente se conservaron a -80 °C. La concentración de proteína de FIX-R338A GlucoPEGilada se determinó midiendo el valor A_{280} (coeficiente de

extinción de $13,3 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{cm}^{-1}$). La actividad específica se calculó a partir de la concentración de proteína y de los ensayos cromogénico y de TTPa para

15 FIX (usando ácido elágico como activador). Ambos ensayos, usados comercialmente, produjeron FIX de tipo silvestre recombinante para generar la curva patrón. Controles del material de partida (FIX-R338A). Los datos mostrados en la Tabla 7 indican que el FIX-R338A glucoPEGilado tuvo entre el 34% y el 80% de la actividad del material de partida, dependiendo del ensayo.

Tabla 7: Actividad de coagulación *in vitro* de FIX-R338A GlucoPEGilado homogéneo al 95% usando amino-oxi PEG y condiciones optimizadas

Proteína	Actividad específica mediante ensayo TTPa (IU/mg)	Actividad específica mediante ensayo cromogénico(IU/mg)
FIX-R338A	1512	1174
FIX-R338A GlucoPEGilado	519	942
Actividad específica como porcentaje		
% de FIX-R338A con respecto a FIX-R338A GlucoPEGilado	34 %	80 %

Ejemplo 14: Perfil farmacocinético de FIX-R338A glucoPEGilado

5 Se administró FIX-R338A glucoPEGilado, FIX-R338A o FIX de tipo silvestre recombinante (rFIX) a ratas normales o a ratones con Hemofilia B por inyección intravenosa. El nivel de proteína FIX circulante se midió a lo largo del tiempo usando un ensayo basado en ELISA. En ratas normales el perfil farmacocinético de FIX-R338A glucoPEGilado mejoró significativamente en
10 comparación tanto con FIX-R338A como con rFIX (Figura 1).

En ratones con Hemofilia B el perfil farmacocinético de FIX-R338A glucoPEGilado también mejoró significativamente en comparación tanto con FIX-R338A como con rFIX (Figura 2).

15 A partir de estos estudios los parámetros farmacocinéticos calculados (Tablas 8 y 9) indican que FIX-R338A glucoPEGilado tuvo una mejora en la semivida (T1/2) terminal de aproximadamente 1,4 veces en ratas y de 1,5

veces en ratones. La eliminación (EL) global se redujo de 3 a 4 veces en ratas y de 6 a 8 veces en ratones. Tanto el área bajo la curva normalizada en relación con la dosis (ABCnorm) como el tiempo de residencia medio (TRM) también aumentaron en las dos especies.

5 **Tabla 8: Parámetros farmacocinéticos para FIX-R338A glucoPEGilado en ratas**

Proteína	T1/2 (h)	EL (ml/h/kg)	Vss(ml/kg)	ABCnorm (kg/h/l)	TRM (h)
rFIX	11	22	195	47	9
FIX-R338A	11	32	240	31	7.5
FIX-R338A GlucoPEGilado	15	8	156	130	20,5

Tabla 9: Parámetros farmacocinéticos para FIX-R338A glucoPEGilado en ratones con Hemofilia B

Proteína	T1/2 (h)	EL (ml/h/kg)	Vss(ml/kg)	ABCnorm (kg/h/l)	TRM (h)
rFIX	17,5	32,6	535	30,7	16,4
FIX-R338A	17,2	42,6	661	23,5	15,5
FIX-R338A GlucoPEGilado	26,5	5,31	188	188	35,3

10

La actividad de FIX también se determinó en muestras de plasma procedentes de los ratones con hemofilia B a diferentes tiempos después de

inyección intravenosa de cualquiera de rFIX, FIX-R338A o FIX-R338A glucoPEGilado, como se muestra en la Figura 3. Para la molécula FIX-R338A PEGilada, estos datos demuestran un perfil farmacocinético significativamente mejorado por la actividad.

5 **Ejemplo 15: La anilina como catalizador para la PEGilación del Factor IX**

Para evaluar la anilina como un catalizador para la conjugación de restos poliméricos, tales como PEG, a azúcares sobre proteínas, incluyendo FIX, la proteína FIX de tipo silvestre recombinante se PEGiló, como se describe en el ejemplo 11, excepto que se realizó una reacción que contenía anilina 10 mM
10 mientras que se realizó una segunda reacción idéntica sin la adición de anilina. La evolución de la reacción de PEGilación se controló por análisis sobre SDS-PAGE (Figura 4). En presencia de anilina, la eficacia de la PEGilación, como se pone de manifiesto por la conversión de la proteína FIX libre de 55 kDa a formas de mayor peso molecular, aumentó. La cuantificación de gel indicó que
15 después de una reacción de 18 horas solamente el 18% de FIX libre se PEGiló en ausencia de anilina mientras que el 73% de FIX libre se PEGiló en presencia de anilina, lo que demuestra que la anilina mejora la tasa de conjugación de PEG.

20 **Ejemplo 16: Conjugación polimérica específica de sitio en azúcares del Factor IX por mutación en N157 o en N167**

El Factor IX contiene dos sitios de glucosilación ligados a N localizados en N157 y en N167 y durante la expresión de las proteínas en células de mamíferos, los glucanos que se añaden en estos sitios contienen la mayoría de los restos de ácido siálico presentes en los glucanos totales del Factor IX. La
25 conjugación de polímeros, tales como PEG, a los ácidos siálicos del Factor IX,

como se describe en los ejemplos 9 a 15, puede producirse en cualquiera o en ambos de los glucanos unidos a N157 y a N167. Sería deseable, desde una perspectiva farmacéutica, producir un Factor IX conjugado con polímeros en el que el polímero esté unido solo a uno de los dos sitios de glucosilación ligados a N porque dicho producto sería más homogéneo. El Factor IX que contiene la mutación R338A se mutó para cambiar cualquiera de N157 a A157 o N167 a A167, eliminando así cada uno de los sitios de glucosilación ligados a N. Se predijo que N157Q y N167Q eran mutaciones alternativas que eliminaban los sitios de glucosilación ligados a N respectivos debido a la similitud estructural entre los restos de asparagina (N) y de glutamina (Q). La expresión de R338A-N157A y R338A-N167A en células BHK21 y la medición del nivel de antígeno por ELISA y la actividad mediante ensayo TTPa en los sobrenadantes de cultivo celulares demostró que la muteína N167A tenía una actividad específica similar (expresada como UI por mg de proteína FIX) a la de la proteína parental FIX-R338A (Tabla 10). Por otro lado, la muteína N157A mostró una actividad específica 1,7 veces mayor que la de la proteína FIX-R338A parental (Tabla 10). Una actividad específica similar 1,7 veces mayor se midió para la proteína FIX-R338A-N157A purificada en comparación con la proteína FIX-R338A (Tabla 10). Por lo tanto, la mutación de N157, tal como N157A o N157Q, para eliminar el sitio de glucosilación ligado a N en N157 y por tanto permitir la conjugación polimérica preferencialmente en N167 se prefiere sobre mutaciones en N167 con el fin de generar una proteína homogénea del Factor IX conjugada con polímeros.

Tabla 10: Actividad específica de muteínas N157A y N167A en sobrenadantes de cultivo celular y proteínas purificadas (NE: no ensayada)

Fuente de proteína	Proteína FIX	Actividad Específica (IU/mg)	Veces R338A
Cultivo celular Sobrenadantes	FIX-R338A	319	-
	FIX-R338A-N167A	320	0,99
	FIX-R338A-N157A	529	1,66
Proteína purificada	FIX-R338A	1297	-
	FIX-R338A-N167A	NE	-
	FIX-R338A-N157A	2230	1,72

- 5
- Todas las publicaciones y patentes mencionadas anteriormente en la memoria descriptiva se incorporan, por referencia, en el presente documento. Para los expertos en la materia serán evidentes diversas modificaciones y variaciones de los procedimientos descritos de la invención sin alejarse del ámbito y espíritu de la misma.
- 10
- Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas, debe entenderse que la invención que se reivindica no debe limitarse solamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que las diversas modificaciones de los modos descritos anteriormente, para realizar la invención, que sean obvias a los expertos en el campo de la bioquímica o en
- 15
- campos relacionados, están incluidas dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar, usando solo experimentación rutinaria, muchos equivalentes para las

realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento.
Se pretende que dichos equivalentes estén incluidas en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido del Factor IX que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha modificado introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos.
5
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en el resto 86.
- 10 3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de los restos de aminoácidos 85, 86 y 87.
4. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido
15 comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de los restos de aminoácidos 85, 86, 87, 338 y 410.
5. El polipéptido de la reivindicación 4, en el que la una o más sustituciones de aminoácidos se seleccionan de: D85F; D85G; D85H; D85I; D85M; D85N;
20 D85R; D85S; D85W; D85Y; V86A; V86D; V86E; V86G; V86H; V86I; V86L; V86M; V86N; V86P; V86Q; V86R; V86S; V86T; T87F; T87I; T87K; T87M; T87R; T87V; T87W; R338A; R338F; R338I; R338L; R338M; R338S; R338T; R338V; R338W; E410N; E410Q; D85W y T87R; D85F y T87I; D85W y T87W; D85R y T85R; D85I y T87R; D85Y y T87F; D85I y T87M; D85F y T87R; D85F y
25 T87V; D85R y T87K; D85H y T87I; D85I y T87I; D85Y y T87K; D85S y T87R;

D85Y y T87R; D85G y T87K; D85H y T87W; D85H y T87K; D85F y T87K;
D85H y T87V; D85M y T87I; D85H y T87M; R338A y E410N; R338A y E410Q;
D85W, V86A y T87R; D85F, V86A y T87I; D85W, V86A y T87W; D85R, V86A y
T85R; D85I, V86A y T87R; D85Y, V86A y T87F; D85I, V86A y T87M; D85F,
5 V86A y T87R; D85F, V86A y T87V; D85R, V86A y T87K; D85H, V86A y T87I;
D85I, V86A y T87I; D85Y, V86A y T87K; D85S, V86A y T87R; D85Y, V86A y
T87R; D85G, V86A y T87K; D85H, V86A y T87W; D85H, V86A y T87K; D85F,
V86A y T87K; D85H, V86A y T87V; D85M, V86A y T87I; D85H, V86A y
T87M; D85W, V86A, T87R y R338A; D85F, V86A, T87I y R338A; D85W, V86A,
10 T87W y R338A; D85R, V86A, T85R y R338A; D85I, V86A, T87R y R338A;
D85Y, V86A, T87F y R338A; D85I, V86A, T87M y R338A; D85F, V86A, T87R y
R338A; D85F, V86A, T87V y R338A; D85R, V86A, T87K y R338A; D85H,
V86A, T87I y R338A; D85I, V86A, T87I y R338A; D85Y, V86A, T87K y R338A;
D85S, V86A, T87R y R338A; D85Y, V86A, T87R y R338A; D85G, V86A, T87K
15 y R338A; D85H, V86A, T87W y R338A; D85H, V86A, T87K y R338A; D85F,
V86A, T87K y R338A; D85H, V86A, T87V y R338A; D85M, V86A, T87I y
R338A; D85H, V86A, T87M y R338A; D85W, V86A, T87R, R338A y E410N;
D85F, V86A, T87I, R338A y E410N; D85W, V86A, T87W, R338A y E410N;
D85R, V86A, T85R, R338A y E410N; D85I, V86A, T87R, R338A y E410N;
20 D85Y, V86A, T87F, R338A y E410N; D85I, V86A, T87M, R338A y E410N;
D85F, V86A, T87R, R338A y E410N; D85F, V86A, T87V, R338A y E410N;
D85R, V86A, T87K, R338A y E410N; D85H, V86A, T87I, R338A y E410N;
D85I, V86A, T87I, R338A y E410N; D85Y, V86A, T87K, R338A y E410N;
D85S, V86A, T87R, R338A y E410N; D85Y, V86A, T87R, R338A y E410N;
25 D85G, V86A, T87K, R338A y E410N; D85H, V86A, T87W, R338A y E410N;

D85H, V86A, T87K, R338A y E410N; D85F, V86A, T87K, R338A y E410N;
D85H, V86A, T87V, R338A y E410N; D85M, V86A, T87I, R338A y E410N;
D85H, V86A, T87M, R338A y E410N; D85W, V86A, T87R, R338A y E410Q;
D85F, V86A, T87I, R338A y E410Q; D85W, V86A, T87W, R338A y E410Q;
5 D85R, V86A, T85R, R338A y E410Q; D85I, V86A, T87R, R338A y E410Q;
D85Y, V86A, T87F, R338A y E410Q; D85I, V86A, T87M, R338A y E410Q;
D85F, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85F, V86A, T87V, R338A y E410Q;
D85R, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87I, R338A y E410Q;
D85I, V86A, T87I, R338A y E410Q; D85Y, V86A, T87K, R338A y E410Q;
10 D85S, V86A, T87R, R338A y E410Q; D85Y, V86A, T87R, R338A y E410Q;
D85G, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85H, V86A, T87W, R338A y E410Q;
D85H, V86A, T87K, R338A y E410Q; D85F, V86A, T87K, R338A y E410Q;
D85H, V86A, T87V, R338A y E410Q; D85M, V86A, T87I, R338A y E410Q;
D85H, V86A, T87M, R338A y E410Q; y cualquier combinación de las mismas.

15

6. Un polipéptido del Factor IX que comprende la secuencia de aminoácidos

YNSGKLEEFVQGNLERECMEEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGD
QCESNPCLNGGSCCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELX₈₅X₈₆X₈₇CNIKNGR
20 CEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSL
TRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP
WQVVLNGKVD AFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEH
TEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTN
IFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLX338STKFTIY
25 NNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKG

KYGIYTKVSRVYNWIKX₄₁₀KTKLT (SEC ID N°: 2);

en la que X₈₅ se selecciona de D, F, G, H, I, M, N, R, S, W e Y;

en la que X₈₆ se selecciona de A, D, E, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T y V;

5 en la que X₈₇ se selecciona de F, I, K, M, R, T, V y W;

en la que X₃₃₈ se selecciona de A, F, I, L, M, R, S, T, V y W;

en la que X₄₁₀ se selecciona de E, N y Q.

7. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que
10 comprende adicionalmente uno o más sitios de glucosilación.

8. Una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido del Factor IX de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15

9. Un procedimiento para el tratamiento de la hemofilia B que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la preparación farmacéutica de la reivindicación 8.

20 10. Una secuencia de ADN que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

11. Una célula huésped eucariota transfectada con la secuencia de ADN de acuerdo con la reivindicación 10 de manera que permita a la célula huésped
25 expresar un polipéptido del Factor IX.

12. Un procedimiento para producir un polipéptido del Factor IX que comprende (i) modificar la secuencia de aminoácidos del polipéptido introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos; (ii) expresar el polipéptido en una línea celular y (iii) purificar el polipéptido.

5

13. El polipéptido de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente uno o más restos de azúcar unidos a dicho uno o más sitios de glucosilación.

14. El polipéptido de la reivindicación 13, en el que el uno o más restos de
10 azúcar es ácido siálico.

14. Un conjugado que comprende a) el polipéptido de la reivindicación 13 o 14 y b) uno o más restos poliméricos unidos covalentemente al mismo.

15 15. El conjugado de la reivindicación 14, en el que el uno o más restos poliméricos están unidos covalentemente a uno o más restos de azúcar.

16. El conjugado de la reivindicación 15, en el que el uno o más restos poliméricos se seleccionan del grupo que consiste en un poli(alquilenglicol),
20 poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefinico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxi alquilmetacrilamida), poli(hidroxi alquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(alfa-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acrilolmorfolina), ácido polisiálico, almidón hidroxietílico (HES), óxido de
25 polietileno, óxidos de alquil-polietileno, óxidos de bispolietileno, copolímeros o

copolímeros en bloque de óxidos de polialquileno, poli(etilenglicol-co-propilenglicol), poli(N-2-(hidroxipropil)metilacrilamida) y dextrano.

17. El conjugado de la reivindicación 16, en el que el uno o más restos
5 poliméricos son poli(alquilenglicol).

18. El conjugado de la reivindicación 17, en el que el poli(alquilenglicol) es polietilenglicol (PEG).

10 19. Un conjugado que comprende:

a) un polipéptido del Factor IX que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha modificado introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos, en la que al menos una sustitución de aminoácidos está en el resto 338;

15 b) uno o más restos de azúcares unidos a dicho uno o más sitios de glucosilación; y

c) uno o más restos poliméricos unidos covalentemente a uno o más restos de azúcar.

20 20. El conjugado de la reivindicación 19, en el que dicha sustitución en el resto 338 se selecciona del grupo que consiste en R338A, R338F, R338I, R338L, R338M, R338S, R338T, R338V y R338W.

21. El conjugado de la reivindicación 19 ó 20, en el que dicho polipéptido
25 comprende adicionalmente una o más sustituciones de aminoácidos

seleccionadas de los restos de aminoácidos 157 y 167.

22. El conjugado de la reivindicación 21, en el que dicha sustitución en el resto 157 se selecciona del grupo que consiste en N157A y N157Q.

5

23. El conjugado de la reivindicación 21, en el que dicha sustitución en el resto 167 se selecciona del grupo que consiste en N167A y N167Q.

24. Un procedimiento para mejorar la conjugación de un resto polimérico con un polipéptido que comprende: a) proporcionar un polipéptido con uno más sitios de glucosilación, en el que el sitio de glucosilación comprende uno más ácidos siálicos; b) oxidar dichos ácidos siálicos de dicho polipéptido; c) proporcionar un catalizador y d) unir covalentemente un resto polimérico que comprende un grupo amino-oxi funcional con dichos ácidos siálicos oxidados; por medio de lo cual la tasa de conjugación aumenta.

15

25. El procedimiento de la reivindicación 24 en el que dicho catalizador se selecciona del grupo que consiste en anilina y derivados de anilina tales como o-Cl-, p-Cl-, o-CH₃O-, p-CH₃O- y p-CH₃-anilina.

20

26. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que dicha tasa de conjugación está aumentada con relación a sin el catalizador.

RESUMEN

La invención se refiere a polipéptidos del Factor IX modificados tales como polipéptidos del Factor IX con una o más sustituciones de aminoácidos.

- 5 La invención también se refiere a procedimientos para fabricar polipéptidos del Factor IX modificados y a procedimientos para el uso de polipéptidos del Factor IX modificados, para tratar, por ejemplo, pacientes afectados de hemofilia B.

Figura 1

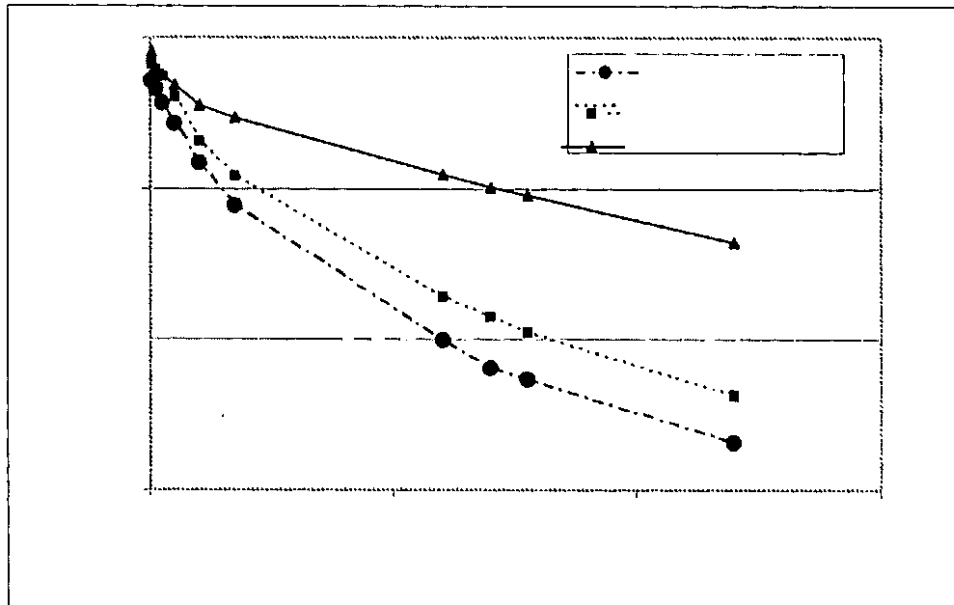


Figura 2

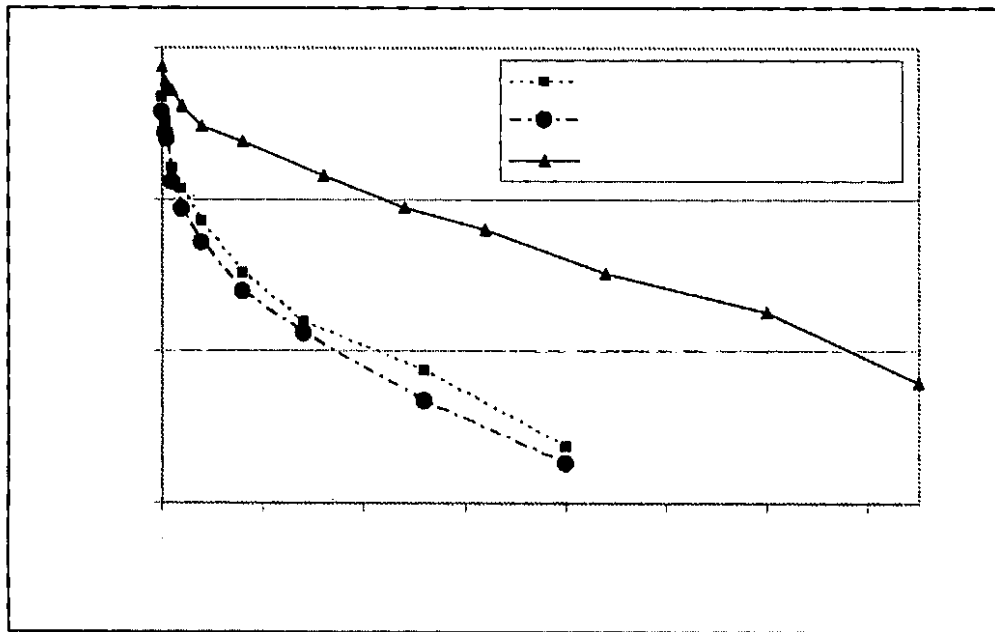


Figura 3

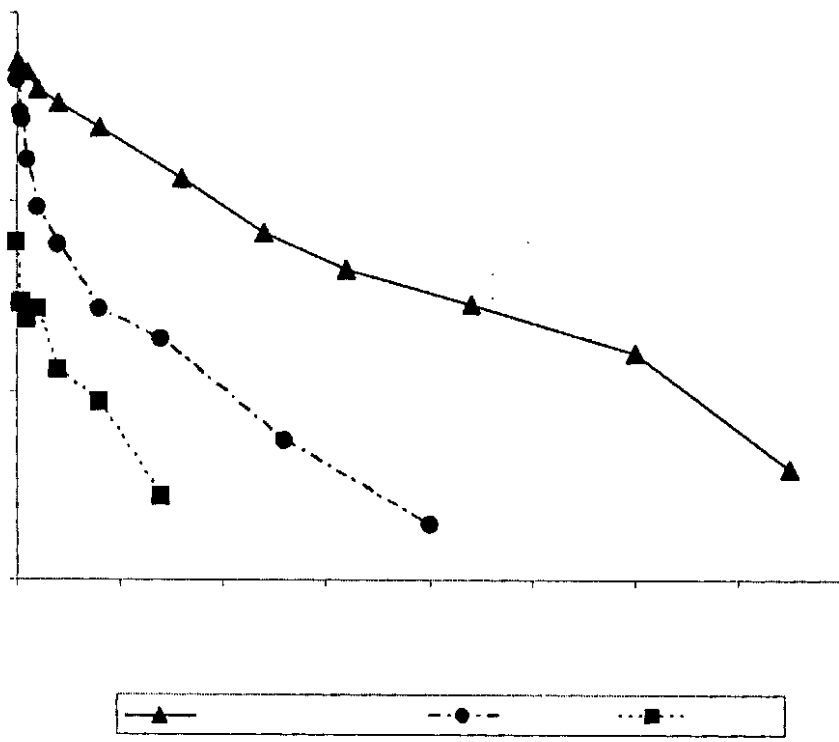
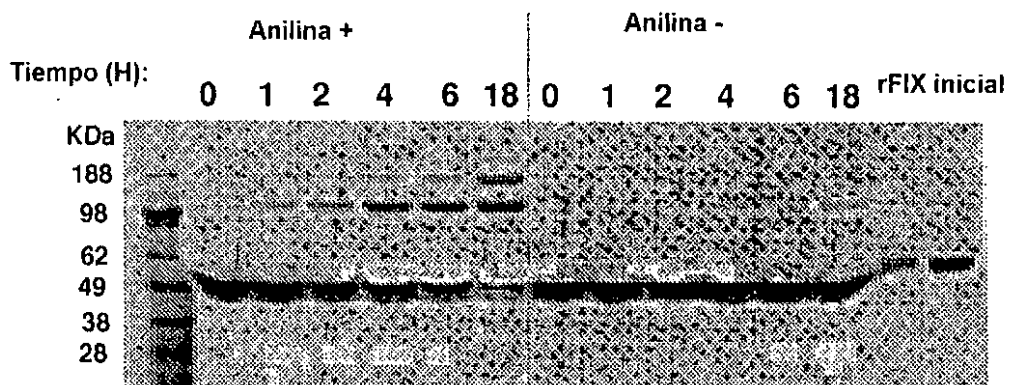


Figura 4



BHC105004_ST25
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer HealthCare LLC
Brooks, Alan
Patel, Chandra
Jiang, Xiaoqiao
Gritzan, Uwe
Apeler, Heiner
Wang, Jun

<120> POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR IX MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOs

<130> BHC 10 5 004

<150> US 61/230.551

<151> 31-07-2009

<160> 57

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 415

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30

Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
35 40 45

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

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65 70 75 80

Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
85 90 95

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
100 105 110

Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
115 120 125

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

BHC105004_ST25

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 145 150 155 160
 Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
 165 170 175
 Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 180 185 190
 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 195 200 205
 Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 210 215 220
 Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 225 230 235 240
 Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 245 250 255
 His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 260 265 270
 Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 275 280 285
 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 290 295 300
 Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 305 310 315 320
 Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 325 330 335
 Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
 340 345 350
 Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 355 360 365
 His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
 370 375 380
 Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
 385 390 395 400

100.

BHC105004_ST25

Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
405 410 415

<210> 2
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Variantes de FIX

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (85)..(85)
<223> X se selecciona de D, F, G, H, I, M, N, R, S, W e Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (86)..(86)
<223> X se selecciona de A, D, E, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T y
V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (87)..(87)
<223> X se selecciona de F, I, K, M, R, T, V y W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (338)..(338)
<223> X se selecciona de A, F, I, L, M, R, S, T, V y W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (410)..(410)
<223> X se selecciona de E, N y Q

<400> 2

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30

Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
35 40 45

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

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65 70 75 80

BHC105004_ST25

Asn Cys Glu Leu Xaa Xaa Xaa Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
 85 90 95
 Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
 100 105 110
 Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
 115 120 125
 Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
 130 135 140
 Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 145 150 155 160
 Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
 165 170 175
 Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 180 185 190
 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 195 200 205
 Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 210 215 220
 Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 225 230 235 240
 Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 245 250 255
 His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 260 265 270
 Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 275 280 285
 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 290 295 300
 Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 305 310 315 320
 Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 325 330 335

BHC105004_ST25

Leu Xaa Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
340 345 350

Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
355 360 365

His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
370 375 380

Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385 390 395 400

Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Xaa Lys Thr Lys Leu Thr
405 410 415

<210> 3
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador FIXF1 5'

<400> 3
atcataagct tgccaccatg cagcgcgtga acatg

35

<210> 4
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador FIXR3 3'

<400> 4
atcataagct tgattagtta gtgagaggcc ctg

33

<210> 5
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86A

<400> 5
aggaaagaac tgtgaattag atgccacatg taacattaag aatggca

47

<210> 6
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador V86A

<400> 6
tgccattctt aatgttacat gtggcatcta attcacagtt ctttcct 47

<210> 7
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86P

<400> 7
ggaaagaact gtgaattaga tcccacatgt aacattaaga atggcag 47

<210> 8
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86P

<400> 8
ctgccattct taatgttaca tgtgggatct aattcacagt tctttcc 47

<210> 9
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86E

<400> 9
ggaaagaact gtgaattaga tgagacctgt aacattaaga atggcag 47

<210> 10
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86E

<400> 10
ctgccattct taatgttaca ggtctcatct aattcacagt tctttcc 47

<210> 11
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86S

<400> 11

64

BHC105004_ST25

ggaaagaact gtgaattaga tagcacctgt aacattaaga atggcag 47

<210> 12
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86S

<400> 12
ctgccattct taatgttaca ggtgctatct aattcacagt tctttcc 47

<210> 13
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86I

<400> 13
ggaaagaact gtgaattaga taccacctgt aacattaaga atggcag 47

<210> 14
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86I

<400> 14
ctgccattct taatgttaca ggtgatctatct aattcacagt tctttcc 47

<210> 15
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86R

<400> 15
ggaaagaact gtgaattaga tagaacctgt aacattaaga atggcag 47

<210> 16
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86R

<400> 16
ctgccattct taatgttaca ggttctatct aattcacagt tctttcc 47

<210> 17
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86Q

<400> 17
ggaaagaact gtgaattaga tcagacatgt aacattaaga atggcag 47

<210> 18
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86Q

<400> 18
ctgccattct taatgttaca tgtctgatct aattcacagt tctttcc 47

<210> 19
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86T

<400> 19
ggaaagaact gtgaattaga taccacctgt aacattaaga atggcag 47

<210> 20
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86T

<400> 20
ctgccattct taatgttaca ggtggtatct aattcacagt tctttcc 47

<210> 21
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador V86D

<400> 21
ggaaagaact gtgaattaga tgacacctgt aacattaaga atggcag 47

<210> 22
<211> 47
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador V86D

<400> 22
ctgccattct taatgttaca ggtgtcatct aattcacagt tctttcc 47

<210> 23
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador V86H

<400> 23
ggaaagaact gtgaattaga tcacacctgt aacattaaga atggcag 47

<210> 24
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador V86H

<400> 24
ctgccattct taatgttaca ggtgtgatct aattcacagt tctttcc 47

<210> 25
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador V86N

<400> 25
ggaaagaact gtgaattaga taacacctgt aacattaaga atggcag 47

<210> 26
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador V86N

<400> 26
ctgccattct taatgttaca ggtgttatct aattcacagt tctttcc 47

<210> 27
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

BHC105004_ST25

<223> Cebador V86L

<400> 27

ggaaagaact gtgaattaga tctgacatgt aacattaaga atggcag

47

<210> 28

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador V86L

<400> 28

ctgccattct taatgtttaca tgtcagatct aattcacagt tctttcc

47

<210> 29

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador V86M

<400> 29

ggaaagaact gtgaattaga tatgacctgt aacattaaga atggcag

47

<210> 30

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador V86M

<400> 30

ctgccattct taatgtttaca ggctatatct aattcacagt tctttcc

47

<210> 31

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador V86Y

<400> 31

ggaaagaact gtgaattaga ttacacctgt aacattaaga atggcag

47

<210> 32

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador V86Y

<400> 32

BHC105004_ST25		
ctgccattct taatgttaca ggtgtaatct aattcacagt tctttcc		47
<210> 33		
<211> 47		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Cebador V86K		
<400> 33		
ggaaagaact gtgaattaga taagacatgt aacattaaga atggcag		47
<210> 34		
<211> 47		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Cebador V86K		
<400> 34		
ctgccattct taatgttaca tgtcttatct aattcacagt tctttcc		47
<210> 35		
<211> 47		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Cebador V86F		
<400> 35		
ggaaagaact gtgaattaga tttcacctgt aacattaaga atggcag		47
<210> 36		
<211> 47		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Cebador V86F		
<400> 36		
ctgccattct taatgttaca ggtgaaatct aattcacagt tctttcc		47
<210> 37		
<211> 47		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Cebador V86C		
<400> 37		
ggaaagaact gtgaattaga ttgcacctgt aacattaaga atggcag		47

<210>	38	
<211>	46	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador V86C	
<400>	38	
ctgccattct taatgtttaca ggtgcaatct aattcacagt tctttc		46
<210>	39	
<211>	47	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador V86W	
<400>	39	
ggaaagaact gtgaattaga ttggacctgt aacattaaga atggcag		47
<210>	40	
<211>	47	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador V86W	
<400>	40	
ctgccattct taatgtttaca ggtccaatct aattcacagt tctttcc		47
<210>	41	
<211>	55	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador V86G	
<400>	41	
gaaggaaaga actgtgaatt agatggcacc tgtaacatta agaatggcag atgcg		55
<210>	42	
<211>	55	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador V86G	
<400>	42	
cgcacatgcc attcttaatg ttacaggtgc catctaattc acagttcttt ccttc		55
<210>	43	
<211>	51	
<212>	ADN	

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador E410N

<400> 43

tcccggatg tcaactggat taagaacaaa acaaagctca cttaatgaaa g 51

<210> 44

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador E410N

<400> 44

ctttcattaa gtgagctttg ttttgttctt aatccagttg acataccggg a 51

<210> 45

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador E410Q

<400> 45

tcccggatg tcaactggat taagcagaaa acaaagctca cttaatgaaa g 51

<210> 46

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador E410Q

<400> 46

ctttcattaa gtgagctttg ttttctgctt aatccagttg acataccggg a 51

<210> 47

<211> 52

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 47

ctgtttttcc tgatgtggac tacgtagcct ctactgaagc tgaaaccatt ct 52

<210> 48

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

110

<223> Cebador
<400> 48
gaagctgaaa ccattctaga tgccatcact caaagcaccc aatc 44

<210> 49
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 49
cttggtgacc gagccacatg ccttgcatct acaaagttca ccatc 45

<210> 50
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 50
cttggtgacc gagccacatg ccttctgtct acaaagttca ccatc 45

<210> 51
<211> 39
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 51
gaccgagcca catgccttgt gtctacaaag ttcaccatc 39

<210> 52
<211> 48
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 52
gttgaccgag ccacatgcct tatctctaca aagttcacca tctataac 48

<210> 53
<211> 48
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 53

BHC105004_ST25
gttgaccgag ccacatgcct tttctctaca aagttcacca tctataac 48

<210> 54
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 54
cttggtgacc gagccacatg cctttggtct acaaagttca ccatc 45

<210> 55
<211> 47
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 55
cacttgttga ccgagccaca tgccttatgt ctacaaagtt caccatc 47

<210> 56
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 56
cttggtgacc gagccacatg ccttagctct acaaagttca ccatc 45

<210> 57
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 57
gttgaccgag ccacatgcct tacctctaca aagttcacca tc 42

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application BAYER HEALTHCARE LLC is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i)		BAYER HEALTHCARE LLC is entitled as employer of the inventor, BROOKS, Alan
VIII-2-1(i)		BAYER HEALTHCARE LLC is entitled as employer of the inventor, PATEL, Chandra
VIII-2-1(i)		BAYER HEALTHCARE LLC is entitled as employer of the inventor, JIANG, Xiaoqiao
VIII-2-1(i)		BAYER HEALTHCARE LLC was entitled as employer of the inventor, APELER, Heiner
VIII-2-1(i)		BAYER HEALTHCARE LLC was entitled as employer of the inventor, WANG, Jun

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	in relation to this international application BAYER HEALTHCARE LLC is entitled to claim priority of earlier application No. 61/230,551 by virtue of the following:
VIII-3-1(i)		BAYER HEALTHCARE LLC is entitled as employer of the inventor, BROOKS, Alan
VIII-3-1(i)		BAYER HEALTHCARE LLC is entitled as employer of the inventor, PATEL, Chandra
VIII-3-1(i)		BAYER HEALTHCARE LLC is entitled as employer of the inventor, JIANG, Xiaoqiao

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 008585
		Bogotá D.C., Enero 30 de 2012 - 13:16:11

RECIBIDO DE : MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA					NI 800.020.909
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	191660280	30/01/2012	4.340.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
16	50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00
				480.000.00
				\$480.000.00

SON: **CUATROCIENTOS OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-014068- -00000-0000
Fecha: 2012-01-30 16:58:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 119

*Este recibo debe ser utilizado
únicamente para tramitar el
Módulo de Echeverry e Hijos Ltd.
Código: PCT/032010/044177
Reivindicaciones*

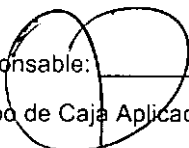
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 002837
		Bogotá D.C., Enero 12 de 2012 - 12:00:02

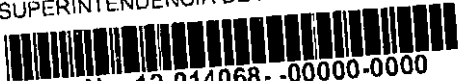
RECIBIDO DE : MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA					NI 800.020.909
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	191657981	12/01/2012	14.470.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00
=====				

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORP**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-014068 - 00000-0000

Fecha: 2012-01-30 16:56:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 119

*recibo debe ser utilizado
Únicamente para tramites de
Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda*

Marca: Pc1/022010 1064177

Expediente: _____

671

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO						
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES						
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS						
PATENTE DE INVENCION <u> X </u> PCT <u> X </u> MODELO DE UTILIDAD <u> </u> DISEÑO INDUSTRIAL <u> </u>						
(21) N° de solicitud:			(22) Fecha de solicitud:			
(51) Clasificación Internacional :						
(71) Solicitante (s) BAYER HEALTHCARE LLC						
(72) Inventor(es) BROOKS, Alan; PATEL, Chandra; JIANG, Xiaoqiao; GRITZAN, Uwe; APELER, Heiner; WANG, Jun						
(74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS						
(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
		61/230,551		31/07/2009		US
(85) Fecha inicio fase nacional: 01/03/2012					,m	Publicación internacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT					(87)	Fecha: 03 - 02 - 11 Fecha (dd/mm/aa)
Fecha de presentación de la solicitud: 02 - 08 - 10						N° publicación: WO 2011/014890 A1
No. de solicitud PCT/US10/044177						
(54) Título: POLIPEPTIDOS DEL FACTOR IX MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS						

148

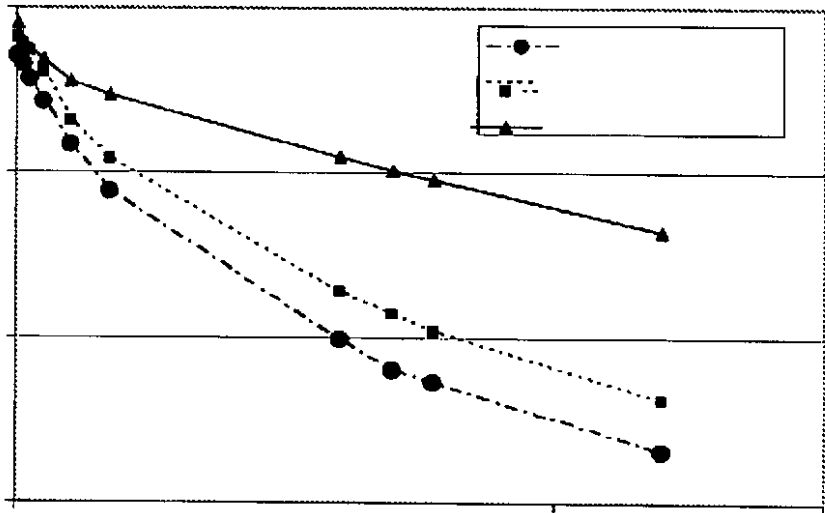
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO																
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES																
TARJETA ARCHIVO TEMATICO																
PATENTE DE INVENCION ☒ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐																
(21) N° de solicitud:			(22) Fecha de solicitud:													
(51) Clasificación Internacional:																
(71) Solicitante(s): BAYER HEALTHCARE LLC																
(72) Inventor(es): BROOKS, Alan; PATEL, Chandra; JIANG, Xiaoqiao; GRITZAN, Uwe; APELER, Heiner; WANG, Jun																
(74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS																
<table border="1"><thead><tr><th>Prioridad</th><th>(31)</th><th>No. Prioridad</th><th>(32)</th><th>Fecha</th><th>(33)</th><th>País</th></tr></thead><tbody><tr><td></td><td></td><td>61/230,551</td><td></td><td>31/07/2009</td><td></td><td>US</td></tr></tbody></table>						Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País			61/230,551	
Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País										
		61/230,551		31/07/2009		US										
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 01/03/2012			(87) Publicación internacional:													
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT			Fecha: 03 - 02 - 11													
Fecha de presentación de la solicitud: 02 - 08 -10			No.Publicación: WO 2011/014890 A1													
No. de solicitud PCT/US10/044177																
(54) Título: POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR IX MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS																
(57) Resumen: La invención se refiere a polipéptidos del Factor IX modificados tales como polipéptidos del Factor IX con una o más sustituciones de aminoácidos. La invención también se refiere a procedimientos para fabricar polipéptidos del Factor IX modificados y a procedimientos para el uso de polipéptidos del Factor IX modificados, para tratar, por ejemplo, pacientes afectados de hemofilia B.																

CONTINUA AL RESPALDO

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION					
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud:			(51) Int Cl: (71) Solicitante(s) BAYER HEALTHCARE LLC (72) Inventor(es) BROOKS, Alan; PATEL, Chandra; JIANG, Xiaoqiao; GRITZAN, Uwe; APELER, Heiner; WANG, Jun (74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS		
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) Pais		
	61/230,551	31/07/2009	US		
(85) Fecha limite inicio fase nacional:			(87) Publicación		
01/03/2012			Internacional		
Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT			Fecha (dd/mm/aa)		
Fecha de presentación de la solicitud:			03 - 02 - 11		
No. de solicitud			N° publicación:		
PCT/US10/044177			WO 2011/014890 A1		
(54) Título: POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR IX MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS					

Resumen:

La invención se refiere a polipéptidos del Factor IX modificados tales como polipéptidos del Factor IX con una o más sustituciones de aminoácidos. La invención también se refiere a procedimientos para fabricar polipéptidos del Factor IX modificados y a procedimientos para el uso de polipéptidos del Factor IX modificados, para tratar, por ejemplo, pacientes afectados de hemofilia B.





No. 12-014068- -00000-0000

Fecha: 2012-01-30 16:56:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACIÓN Folios: 119

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐