



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 036**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09004646 .7**  
96 Fecha de presentación : **06.05.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2077121**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.07.2009**

54 Título: **Proteínas quiméricas VII-Fc del factor de coagulación para el tratamiento de un trastorno hemostático.**

30 Prioridad: **06.05.2003 US 468837**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.06.2011**

73 Titular/es: **SYNTONIX PHARMACEUTICALS, Inc.**  
**9 Fourth Avenue**  
**Waltham, Massachusetts 02451, US**

72 Inventor/es: **Rivera, Daniel S.;**  
**Peters, Robert T. y**  
**Bitonti, Alan J.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 361 036 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Proteínas quiméricas VII-Fc del factor de coagulación para el tratamiento de un trastorno hemostático.

## Campo de la Invención

5 La invención se relaciona de manera general con el campo de los terapéuticos para trastornos hemostáticos. Más específicamente, la invención se relaciona con una proteína quimérica para el tratamiento de un trastorno hemostático.

## Antecedente de la Invención

10 Los trastornos hemostáticos se caracterizan por sangrado no controlado que resulta de la incapacidad o capacidad reducida para formar coágulos de fibrina. Los trastornos hemostáticos pueden resultar de un defecto genético o se pueden adquirir como un resultado de una afección médica no relacionada (por ejemplo, enfermedad autoinmune, quimioterapia relacionada y cáncer) (Kasper 2000, Hemophilia 6(Supp): 13; Cohen et al. 1996, Bailliere's Clinical Hematology 9(2):331). Típicamente, los trastornos hemostáticos resultan de la deficiencia de un factor de coagulación sanguíneo específico. Ejemplos clásicos de los trastornos hemostáticos incluyen hemofilia A, que resulta de una deficiencia en el factor VIII; hemofilia B (Enfermedad de Christmas), que resulta de una deficiencia en el factor IX; y enfermedad de von Willebrand, que resulta en un defecto en un factor de von Willebrand. El factor de Von Willebrand circula con la asociación del factor VIII y lo estabiliza. Este media la adherencia de las plaquetas una con la otra y a las paredes de vasos sanguíneos lesionados. Otros, trastornos hemostáticos menos comunes incluyen la deficiencia del factor XI (deficiencia PTA), deficiencia del factor XII, así como también deficiencias o anomalías estructurales en el fibrinógeno, protrombina, factor V, factor VII, factor X, o factor XIII (Kasper 2000, Hemophilia 6(Supp):13).

25 Los factores de coagulación actúan en conjunto uno con el otro en una cascada de coagulación que finalmente resulta en la formación de un coágulo de fibrina (Figura 1). Estos factores pueden existir en un estado de reposo como una proenzima o zimógeno o en un estado enzimático activado cuando se estimulan para formar un coágulo. La estimulación de estos factores puede ocurrir mediante dos rutas distintas, la ruta intrínseca y la ruta extrínseca. La ruta intrínseca se refiere a aquellas reacciones que conducen a la formación de coágulos a través de la utilización de factores que se presentan solo en el plasma. En contraste, la ruta extrínseca se refiere a aquellas reacciones que conducen a la formación de coágulos que se liberan del factor de tejido vinculado a la membrana luego de la interrupción del endotelio de vaso.

30 El Factor VII participa en ambas rutas que dividen el factor X dentro del factor Xa activado en conjunto con el factor de tejido en la ruta extrínseca o que interactúa con el factor IXa en la ruta intrínseca. El factor VII actúa en la en la dirección anterógrada e independientemente de factores VIII y IX cuando actúa a través de la ruta extrínseca, así evitando la necesidad de estos factores de coagulación. Este es, por lo tanto, un candidato terapéutico atractivo para tratar los trastornos hemostáticos, especialmente Hemofilia A y B. (Patente Estadounidense No. 6,310,183; WO 01/58935).

35 El Factor VII es una proteína dependiente de vitamina K sintetizada en el hígado y se secreta dentro de la sangre como una glucoproteína monocatenaria con un peso molecular de 53 kDa (Broze et al. 1980, J. Biol. Chem. 255:1242). El zimógeno de factor VII se convierte en una forma activada (FVIIa) mediante división proteolítica en un sitio único, Arg152-Ile153, que resulta en dos cadenas, pesada (254 aminoácidos) y liviana (154 aminoácidos) ligada por un enlace de disulfuro único (Hagen et al. 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83:2412). La forma activada del factor VII se une al factor de tejido, que luego convierte el factor X al factor Xa. Se requiere que el Factor Xa convierta la protrombina a trombina, que convierta el fibrinógeno a fibrina como una etapa final en la formación de un coágulo de fibrina.

45 El Factor VII experimenta modificaciones post-traduccionales, incluyendo carboxilación dependiente de vitamina K que resulta en diez residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico en la región de terminal N de la molécula. Otras modificaciones post-traduccionales incluyen adhesión del grupo funcional de azúcar en dos sitios de glicosilación ligados a N de ocurrencia natural en la posición 145 y 322, respectivamente, y en dos sitios de glicosilación de ocurrencia natural ligados a O en la posición 52 y 60, respectivamente (WO 01/58935).

50 La terapia tradicional para trastornos hemostáticos se llama reemplazo parenteral de los factores de coagulación deficientes tal como factor VII, factor VIII o factor IX (ver, por ejemplo, Patente Estadounidense Nos. 6,310,183 y 4,784,950). El tratamiento frecuentemente implica administrar los factores de coagulación para tratar las hemorragias agudas así como también administrar factores de coagulación para determinar profilácticamente la ocurrencia de las hemorragias agudas futuras. Se ha encontrado que la profilaxis reduce el riesgo de desarrollar problemas de articulaciones y artritis asociada con las hemorragias agudas frecuentes (Petrini 2001, Hemofilia 7:99; Fischer et al. 2002, Blood 99(7):2337).

5 Las terapias tradicionales, sin embargo, tienen muchos problemas asociados. Los factores de coagulación actuales se pueden administrar parenteralmente con el fin de lograr dosis efectivas debido a que a la fecha los métodos no invasivos no han sido exitosos en lograr los niveles terapéuticos. Los problemas asociados con la administración parenteral incluyen la oclusión del sitio de inyección, dolor e infección. El uso de un catéter en línea incrementa el riesgo de todos estos eventos. Los problemas específicos asociados con la administración parenteral de los factores de coagulación en bebés y niños pequeños que incluyen acceso venoso central. Adicionalmente, la administración parenteral de los factores de coagulación corre el riesgo de precipitar una hemorragia. Estos problemas son particularmente relevantes cuando el paciente experimenta la administración profiláctica regular de un factor de coagulación.

10 Los factores de coagulación tal como factor IX y factor VIII se pueden dar frecuentemente y en grandes dosis que resultan en el desarrollo de anticuerpos inhibidores contra el factor de coagulación en un número significativo de pacientes (ver, por ejemplo, Nilsson 1992, Transfusion Medicine Review 6(4):285; Cohen et al. 1996, *Bailliere's Clinical Hematology* 9(2):331).

15 Un aspecto de la invención proporciona un tratamiento efectivo más seguro para trastornos hemostáticos. Otro aspecto de la invención proporciona semivida de suero incrementada y biodisponibilidad incrementada de los terapéuticos administrados a través de medios no invasivos para el tratamiento de los trastornos hemostáticos que reduce por lo tanto el riesgo de incurrir en una hemorragia, infección y oclusión del sitio de inyección asociado con la administración parenteral. Otro aspecto de la invención proporciona terapia para trastornos hemostáticos con riesgo reducido, comparado con las terapias actuales, de desarrollo de anticuerpos inhibidores contra el factor de coagulación. Todavía otro aspecto de la invención proporciona un tratamiento profiláctico de un trastorno hemostático.

Los aspectos de la invención proporcionan una proteína quimérica comprendida de por lo menos un factor de coagulación y por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, en donde el factor de coagulación es capaz de promover la coagulación de la sangre y/o la formación de coágulos de fibrina.

25 Las proteínas quiméricas que comprenden una porción Fc de una inmunoglobulina se conocen (ver, por ejemplo, Patente Estadounidense Nos. 6,030,613, 6,086,875, 6,485,726, y Solicitud PCT No. US/02/21335) y mientras que las proteínas quiméricas comprendidas de factores mutantes de coagulación sin actividad de coagulación, y las inmunoglobulinas se han descrito previamente (WO 01/02439), las proteínas quiméricas que comprende un factor de coagulación (es decir, que tienen actividad de coagulación) y no se ha descrito por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina. El factor de coagulación como se define adelante y como se utiliza aquí se refiere a cualquier molécula con actividad de coagulación.

35 La EP 0464533 describe construcciones de fusión quimérica y proteínas purificadas de tromboplastina (factor de tejido TF que es un factor de coagulación sanguíneo) con la región constante de inmunoglobulina Fc pero no describe ninguna de las fusiones Fc del factor VII/VIIa. La WO 01/02439 describe construcciones de fusión quimérica y proteínas de fusión purificadas del Factor VII con la región constante de inmunoglobulina Fc pero no enseña ningún uso médico de sus productos en el tratamiento de los trastornos hemostáticos. La WO 01/02440 describe construcciones de fusión quimérica y proteínas de fusión purificadas del TF truncado (factor III) con la región constante de inmunoglobulina Fc pero no describe ninguna de las fusiones Fc del factor VII/VIIa. La WO 2004/006962 describe construcciones de fusión quiméricas y proteínas de fusión quiméricas purificadas del Factor VII tipo natural con la región constante de inmunoglobulina Fc pero es inactivo para el uso de las fusiones en el tratamiento de trastornos hemofílicos.

#### Resumen de la invención

45 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde dicha proteína quimérica comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina que es un socio de unión FcRn, un factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste de análogos del Factor VII, Factor VIIa, y Factor VII o Factor VIIa que tiene por lo menos 70% de identidad para la porción del Factor VII del polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 4, y opcionalmente por lo menos un ligador, en donde dicha composición farmacéutica es para uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno hemostático o una hemorragia aguda.

50 La presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde dicha proteína quimérica comprende una proteína que es un análogo del Factor VII o Factor VIIa que tiene por lo menos 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1, en donde dicha composición farmacéutica es para uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno hemostático o un trastorno hemorrágico agudo.

- 5 La presente invención también proporciona una proteína quimérica que comprende: (i) por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina que es un socio de unión FcRn; (ii) un factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste de análogos del Factor VII, Factor VIIa, y Factor VII o Factor VIIa que tiene por lo menos 70% de identidad para la porción del Factor VII del polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 4; y opcionalmente (iii) por lo menos un ligador, para uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno hemostático o un trastorno hemorrágico agudo.
- Breve descripción de los dibujos
- La figura 1 es un diagrama que muestra la ruta intrínseca o extrínseca de la cascada de coagulación.
- La figura 2 es un diagrama de las formas activas o inactivas del factor VIIa-Fc.
- 10 La figura 3A es la secuencia de aminoácido de una proteína quimérica que comprende el factor VIIa y un fragmento Fc de una inmunoglobulina (SEQ ID NO:1).
- La figura 3B es la secuencia de aminoácido de un fragmento Fc de una inmunoglobulina (SEQ ID NO:2).
- La figura 3C es la secuencia de ácido nucleico de un fragmento Fc de una inmunoglobulina (SEQ ID NO:3).
- 15 La figura 3D es la secuencia de ácido nucleico de una proteína quimérica que comprende el factor VIIa y un fragmento Fc de una inmunoglobulina (SEQ ID NO:4).
- La figura 4 es un diagrama que resulta de un ensayo STA-CLOT que muestra el factor VIIa-Fc que tiene actividad de coagulación significativa.
- La figura 5 es un diagrama que muestra factor VIIa-Fc que se une al receptor neonatal Fc humano soluble (shFcRn).
- 20 La figura 6 demuestra los niveles de plasma durante el tiempo para administrar oralmente el factor VIIa-Fc en ratas neonatales.
- La figura 7 compara la captación oral en ratas neonatales de los híbridos de monómero/dímero del Factor VIIa-Fc que comprende dos cadenas de polipéptido, cada cadena comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina y en donde el factor VII se liga solo una de las dos cadenas versus homodímeros que comprenden dos cadenas de polipéptido en donde ambas cadenas comprenden por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina y ambas cadenas también comprenden el factor VII.
- 25 La figura 8A demuestra los niveles de plasma durante el tiempo del factor VIIa-Fc administrado intravenosamente a minicerdos, en donde el factor VIIa-Fc es un híbrido de monómero/dímero que comprende dos cadenas de polipéptido, cada cadena comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina y en donde el factor VII se liga a solo una de las dos cadenas.
- 30 La figura 8B demuestra actividad de coagulación durante el tiempo del factor VIIa-Fc administrado intravenosamente a minicerdos en donde el factor VIIa-Fc es un híbrido de monómero/dímero que comprende dos cadenas de polipéptido, cada cadena comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina y en donde el factor VII se liga a solo una de las dos cadenas.
- 35 La figura 9A es la secuencia de aminoácido de la proteína quimérica del Factor IX-Fc. Incluida en la secuencia está el péptido de señal (subrayado) que se divide mediante la célula y el propéptido (negrilla) que se reconoce por la carboxilasa y dependiente de la vitamina K que modifica el Factor IX para lograr la actividad completa. La secuencia se divide posteriormente mediante PACE para producir el Factor IX-Fc.
- 40 La figura 9B es la secuencia de ácido nucleico de la proteína quimérica Factor IX-Fc. Incluida en la secuencia está el péptido de señal (subrayado) y el propéptido (negrilla) que se reconoce por la carboxilasa y dependiente de vitamina K que modifica el Factor IX para lograr la actividad completa. La secuencia traducida se divide posteriormente mediante PACE para producir el Factor IX-Fc maduro.

## Resumen de las secuencias

Seq ID NO	Figura	Descripción
1	3A	secuencia de aminoácido de una proteína quimérica que comprende el factor VIIA y un fragmento Fc IgG
2	3B	secuencia de aminoácido de un fragmento Fc de IgG
3	3C	secuencia de ácido nucleico que corresponde a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2
4	3D	secuencia de ácido nucleico que corresponde a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 1

## Descripción de las realizaciones

## A. Definiciones

5 Etiqueta de afinidad, como se utiliza aquí, significa una molécula adherida a una segunda molécula de interés, capaz de interactuar con un socio de unión específico para el propósito de aislar o identificar dicha segunda molécula de interés.

10 Análogos de, o proteínas o péptidos o sustancialmente idénticos a las proteínas quiméricas de la invención, como se utiliza aquí, significa que una secuencia de aminoácido relevante de una proteína o un péptido es por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia dada. Por vía de ejemplo, tales secuencias pueden ser variantes derivadas de varias especies, o ellas se pueden derivar de la secuencia dada mediante truncamiento, eliminación, sustitución o adición de aminoácido. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias de aminoácido se determina mediante algoritmos de alineación estándar tal como, por ejemplo, la Herramienta de Alineación Local Básica (BLAST) descrita en Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol., 215: 403-410, el algoritmo de Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol., 48:444-453; el algoritmo de Meyers et al. (1988) Comput. Appl. Biosci., 4:11-17; o Tatusova et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett., 174:247-250, etc. Tales algoritmos se incorporan en los programas BLASTN, BLASTP y "Secuencias BLAST 2" (ver [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). Cuando se utilizan tales programas, se pueden utilizar parámetros predeterminados. Por ejemplo, para las secuencias de nucleótido se pueden utilizar las siguientes configuraciones para el programa BLASTN "Secuencias BLAST 2": recompensa por ajuste 2, penalidad por desajuste -2, penalidad por espacio abierto y por extensión de espacio 5 y 2 respectivamente, espacio x\_dropoff 50, esperado 10, tamaño de palabra 11, filtro ON. Para las secuencias de aminoácido se pueden utilizar las siguientes configuraciones para el programa BLASTP "Secuencias BLAST 2": La matriz BLOSUM62, penalidades de espacio y de extensión de espacio 11 y 1 respectivamente, espacio x\_dropoff 50, esperado 10, tamaño de palabra 3, filtro ON.

25 Biodisponibilidad, como se utiliza aquí, significa el grado e índice en el cual se absorbe una sustancia dentro de un sistema vivo o se hace disponible en el sitio de actividad fisiológica.

30 Una proteína quimérica, como se utiliza aquí, se refiere a cualquier proteína comprendida de una primera secuencia de aminoácido derivada de una primera fuente, unidad, covalentemente o no covalentemente, a una segunda secuencia de aminoácido derivada de una segunda fuente, en donde la primera o la segunda fuente no son iguales. Una primera fuente y una segunda fuente que no son iguales pueden incluir dos entidades biológicas diferentes, o dos proteínas diferentes de la misma entidad biológica, o una entidad biológica y una entidad no biológica. Una proteína quimérica puede incluir por ejemplo, una proteína derivada de por lo menos 2 fuentes biológicas diferentes. Una fuente biológica puede incluir cualquier secuencia de aminoácido o ácido nucleico producida no sintéticamente (por ejemplo una secuencia genómica o de cADN, un plásmido o vector vírico, un virión nativo o un mutante o análogo, como se describe aquí adicionalmente, de cualquiera de los anteriores). Una fuente sintética puede incluir una proteína o secuencia de ácido nucleico producida químicamente o no mediante un sistema biológico (por ejemplo síntesis de fase sólida de las secuencias de aminoácido). Una proteína quimérica también puede incluir una proteína derivada de por lo menos 2 fuentes sintéticas diferentes o una proteína derivada de por lo menos una fuente biológica y por lo menos una fuente sintética.

40 Factor de coagulación, como se utiliza aquí, significa cualquier molécula, o análogo de la misma, de ocurrencia natural o producida recombinantemente que evita o reduce la duración de una hemorragia en un sujeto con un trastorno hemostático. En otras palabras, esto significa que cualquier molécula tiene actividad de coagulación.

Actividad de coagulación, como se utiliza aquí, significa la capacidad de participar en una cascada de reacciones bioquímicas que culmina en la formación de un coágulo de fibrina y/o reduce la severidad, duración o frecuencia de hemorragia o episodio de sangrado.

5 Construcción de ADN, como se utiliza aquí, significa una molécula de ADN, o un clon de tal una molécula, monobicatenario o bicatenaria que se ha modificado a través de la intervención humana por contener segmentos de ADN combinados en una forma que como un todo existiría de otra forma en la naturaleza. Las construcciones de ADN contienen la información necesaria para dirigir la expresión de los polipéptidos de interés. Las construcciones de ADN pueden incluir promotores, mejoradores y terminadores de construcción. Las construcciones de ADN que contienen la información necesaria para dirigir la secreción de un polipéptido también contendrán por lo menos una  
10 secuencia de señal secretora.

Un fragmento, como se utiliza aquí, se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido de por lo menos 2 residuos de aminoácido contiguos, de por lo menos 5 residuos de aminoácido contiguos, de por lo menos 10 residuos de aminoácido contiguos, de por lo menos 15 residuos de aminoácido contiguos, de por lo menos 20 residuos de aminoácido contiguos, de por lo menos 25 residuos de aminoácido contiguos, de por lo menos 40 residuos de aminoácido contiguos, de por lo menos 50 residuos de aminoácido contiguos, de por lo menos 100 residuos de aminoácido contiguos, o de por lo menos 200 residuos de aminoácido contiguos o cualquier eliminación o truncamiento de una proteína.  
15

Hemostasia, como se utiliza aquí, significa la detención del sangrado o hemorragia; o la detención del flujo de sangre a través de un vaso sanguíneo o parte del cuerpo.

20 Trastornos hemostático, como se utiliza aquí, significa una afección adquirida o genéticamente heredada caracterizada por una tendencia a hemorragia, espontáneamente o como un resultado de trauma, debido a una capacidad deteriorada o incapacidad de formar un coágulo de fibrina.

Ligado, como se utiliza aquí, se refiere a una primera secuencia de ácido nucleico covalentemente unida a una segunda secuencia de ácido nucleico. La primera secuencia de ácido nucleico se puede unir directamente o yuxtaponer a la segunda secuencia de ácido nucleico o alternativamente una secuencia que interviene puede unir covalentemente la primera secuencia a la segunda secuencia. Ligado como se utiliza aquí también se puede referir a la primera secuencia de aminoácido unida covalentemente a una segunda secuencia de aminoácido. La primera secuencia de aminoácido se puede unir directamente o se yuxtaponer a la segunda secuencia de aminoácido o alternativamente una secuencia que interviene puede unir covalentemente la primera secuencia de aminoácido a la segunda secuencia de aminoácido. Ligado también se puede referir a la primera secuencia de aminoácido no unida covalentemente a una segunda secuencia de aminoácido. Ligado como se utiliza aquí también se puede referir a una primera secuencia de aminoácido unida covalentemente a una secuencia de ácido nucleico o una molécula orgánica o inorgánica pequeña.  
25  
30

Ligado operativamente, como se utiliza aquí, significa una primera secuencia de ácido nucleico ligada a una segunda secuencia de ácido nucleico de tal manera que ambas secuencias son capaces de ser expresadas como un polipéptido biológicamente activo.  
35

Una molécula inorgánica pequeña, como se utiliza aquí, significa una molécula que no contiene átomos de carbono y que no es más de 50 kD.

40 Una molécula orgánica pequeña, como se utiliza aquí, significa una molécula que contiene por lo menos un átomo de carbono y no es mayor de 50 kD.

Alta exigencia, como se utiliza aquí, incluye condiciones fácilmente determinadas por el artesano experto con base en, por ejemplo, la longitud del ADN. Generalmente, tales condiciones se definen como las condiciones de hibridación como anteriormente, y con lavado a aproximadamente 68°C, 0.2X SSC, 0.1% de SDS. El artesano experto reconocerá que la temperatura y la concentración de sal de solución de lavado se pueden ajustar según sea necesario de acuerdo con factores tal como la longitud de la sonda.  
45

Exigencia moderada, como se utiliza aquí, incluye condiciones que se pueden determinar fácilmente por aquellos que son medianamente expertos en la técnica con base en, por ejemplo, la longitud del ADN. Las condiciones básicas se establecen mediante Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed. Vol. 1, pp. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), e incluyen el uso de una solución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa 5X SSC, 0.5% de SDS, 1.0 mM de EDTA (pH 8.0), las condiciones de hibridación 50% de formamida, 6X SSC a 42°C (u otra solución de hibridación similar, tal como solución de Stark, en 50% de formamida a 42°C), y condiciones de lavado de 60°C, 0.5X de SSC, 0.1% de SDS.  
50

5 Polipéptido, como se utiliza aquí, se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto; así, los péptidos, oligopéptidos, y proteínas se incluyen dentro de la definición del polipéptido. Este término no excluye modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación, pegilación, adición de un grupo funcional de lípido, o la adición de cualquier molécula orgánica o inorgánica. Se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales) y polipéptidos con enlaces sustituidos, así como también otras modificaciones conocidas en la técnica, de ocurrencia natural y de ocurrencia no natural.

10 Tratar, tratado, tratamiento, como se utiliza aquí, significa cualquiera de los siguientes: la reducción en la severidad de un trastorno hemostático; la profilaxis de uno o más síntomas asociados con un trastorno hemostático, por ejemplo, una hemorragia; la reducción en la duración de un curso de enfermedad de un trastorno hemostático; el alivio de uno o más síntomas asociados con un trastorno hemostático; la reducción en la duración de una hemorragia asociada con un trastorno hemostático; la reducción en el título de un anticuerpo inhibidor contra un factor de coagulación; la provisión de efectos benéficos a un sujeto con un trastorno hemostático, sin curar necesariamente el trastorno hemostático.

### 15 B. Terapéuticos Mejorados para trastornos hemostáticos

La invención se relaciona generalmente con terapéuticos mejorados para trastornos hemostáticos. La invención así se relaciona con una proteína quimérica que comprende por lo menos un factor de coagulación y por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, como se definió anteriormente.

20 Las proteínas quiméricas de la invención han incrementado la estabilidad y otras propiedades mejoradas cuando se compara con agentes terapéuticos conocidos que tienen actividad de coagulación. Ellos también se pueden administrar parenteralmente o no invasivamente. De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona métodos mejorados para administrar agentes terapéuticos que tienen actividad de coagulación. Aunque los factores de coagulación actualmente se administran generalmente subcutáneamente, intramuscularmente o intravenosamente, las proteínas quiméricas de la invención se pueden administrar utilizando medios menos invasivos tal como la administración oral, la administración nasal, o la administración pulmonar. En una realización específica, las proteínas quiméricas de la invención son útiles en el tratamiento profiláctico de los trastornos hemostáticos.

25 La invención también se relaciona generalmente con métodos mejorados para elaborar factores de coagulación terapéuticos. La invención se relaciona con métodos recombinantes para producir factores terapéuticos de coagulación con expresión mejorada y rendimientos mejorados. La invención así se relaciona con métodos para elaborar las proteínas quiméricas que comprenden por lo menos un factor de coagulación y por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina al transfectar una célula con una construcción de ADN, dicha construcción comprende una secuencia de ADN que codifica por lo menos un factor de coagulación y una secuencia de ADN que codifica por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina; cultivar dicha célula bajo condiciones de tal manera que la proteína quimérica se expresa mediante dicha célula; y aislar dicha proteína quimérica.

### 35 C. Proteínas quiméricas

40 La invención se relaciona generalmente con las proteínas quiméricas como se definió anteriormente. El factor de coagulación se puede ligar covalentemente, o no covalentemente con la porción de una región constante de inmunoglobulina. La porción de una región constante de inmunoglobulina tendrá un terminal N, o amino, y un terminal C, o carboxi. En una realización, la proteína quimérica de la invención puede tener un factor de coagulación ligador al terminal N de la porción de una región constante de inmunoglobulina.

45 La proteína quimérica puede comprender opcionalmente por lo menos un ligador, así el factor de coagulación no se ha unido directamente a la porción de una región constante de inmunoglobulina. El ligador puede intervenir entre el factor de coagulación y la porción de una región constante de inmunoglobulina. El ligador se puede ligar al terminal N de la porción de una región constante de inmunoglobulina, o el terminal C de una porción de una región constante de inmunoglobulina. El ligador se puede ligar al terminal N del factor de coagulación.

La invención así se relaciona con una proteína quimérica comprendida de por lo menos un factor de coagulación (X), opcionalmente, un ligador (L), y por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (F). En una realización, la invención se relaciona con una proteína quimérica comprendida por la Fórmula

50 X-L<sub>a</sub>-F

en donde X se liga en su terminal C al terminal N de L, y L se liga en su terminal C al terminal N de F y en donde a es cualquier entero o cero. Cuando a es cero X se liga directamente en su terminal C al terminal N de F. Por ejemplo, pero no como una limitación, una puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 o 20.

5 En una realización, la invención se relaciona con una proteína quimérica que comprende la secuencia de aminoácido de la figura 3A (SEQ ID NO:1).

10 La proteína quimérica de la invención incluye monómeros, dímeros, así como también multímeros de orden mayor. En una realización, la proteína quimérica es un monómero que comprende un factor de coagulación y una porción de una región constante de inmunoglobulina. En otras realizaciones, la proteína quimérica es un dímero que comprende dos factores de coagulación y dos porciones de una inmunoglobulina. En una realización, los dos factores de coagulación son iguales. En una realización, los dos factores de coagulación son diferentes. En una realización, las dos porciones de una inmunoglobulina son iguales. En una realización, las dos porciones de una inmunoglobulina son diferentes. En otras realizaciones, la proteína quimérica es un híbrido de monómero/dímero en donde la proteína quimérica tiene un aspecto dimérico en el que este comprendido de por lo menos una porción de dos polipéptidos de la región constante de inmunoglobulina y un aspecto monomérico en el que este se comprende de solo un factor de coagulación ligado a una de las dos inmunoglobulinas. La invención así se relaciona con una proteína quimérica que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en donde dicha primera cadena comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina ligada a un factor de coagulación y dicha segunda cadena comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina sin un factor de coagulación ligado a este.

20 Tales proteínas quiméricas se pueden describir utilizando las Fórmulas establecidas en la Tabla 1, en donde I, L, y F son como se describió anteriormente, y en donde (') indica una molécula diferente que sin (') y en donde (:) indica un enlace no péptido

TABLA 1

X-F:F-X
X'-F:F-X
X-L-F:F-X
X-L-F:F-L-X
X'-L-F:F-L-X
X-L'-F:F-L-X
X'-L'-F:F-L-X
F:F-X
F:F-L-X
X-F:F
X-L-F:F
L-F:F X
X-F:F-L

25 El experto entenderá que son posibles combinaciones adicionales que incluyen el uso de ligadores adicionales.

1. Variantes de proteína quimérica



5 Derivados y análogos de las proteínas quiméricas de la invención, se contemplan todos los anticuerpos contra las proteínas quiméricas de la invención y anticuerpos contra los patrones de unión de las proteínas quiméricas de la invención, y se pueden hacer al alterar sus secuencias de aminoácido mediante sustituciones, adiciones, y/o eliminaciones/truncamientos o al introducir las modificaciones químicas que resultan en moléculas funcionalmente equivalentes. Se entenderá por un experto en la técnica que ciertos aminoácidos en una secuencia de cualquier proteína se pueden sustituir por otros aminoácidos sin afectar adversamente la actividad de la proteína.

10 Se pueden hacer varios cambios en las secuencias de aminoácido de las proteínas quiméricas de la invención o las secuencias de ADN que codifican por lo tanto si la pérdida apreciable de su actividad biológica, función, o utilidad. Los derivados, análogos, o mutantes que resultan de tales cambios y el uso de tales derivados está dentro del alcance de la presente invención. En una realización específica, el derivado es funcionalmente activo, es decir, capaz de exhibir una o más actividades asociadas con las proteínas quiméricas de la invención, por ejemplo, formación de coágulos, activación de un factor de coagulación. Se puede medir la actividad mediante los ensayos conocidos en la técnica, por ejemplo, en ensayo StaCLot FVlla-rTF (Johannessen et al. 2000, Blood Coagulation and Fibrinolysis 11:S159) tiempo de protrombina (ensayo PT) o un ensayo APTT para el factor IX

15 Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia se pueden seleccionar de otros miembros de la clase a la cual pertenece el aminoácido (ver Tabla 2). Adicionalmente, varios aminoácidos se sustituyen comúnmente con aminoácidos neutros, por ejemplo, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofan, y metionina (ver, por ejemplo, MacLennan et al. (1998) Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67; Sasaki et al. (1998) Adv. Biophys. 35:1-24).

20 TABLA 2

Residuos originales	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones típicas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Ácido 1,4-Diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr

Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

2. Factores de coagulación

5 Las proteínas quiméricas de esta invención incluyen por lo menos un factor de coagulación. El factor de coagulación puede incluir cualquier molécula que tiene actividad de coagulación o activa una molécula con actividad de coagulación. El factor de coagulación se puede comprender de un polipéptido, una molécula orgánica pequeña, o una molécula inorgánica pequeña. El factor de coagulación puede ser un factor mutado de coagulación o un análogo de un factor de coagulación tan grande que este mantiene por lo menos alguna actividad de coagulación. El factor de coagulación puede ser, como un ejemplo, pero no como una limitación factor VIII, incluyendo el factor VIII eliminado del dominio B, factor IX (Patente Estadounidense No. 4,994,371 ), factor XI, factor XII, fibrinógeno, 10 protrombina, factor V, factor VII, factor X, o factor XIII. En una realización, el factor de coagulación es el factor VII o factor VIIa. En otras realizaciones, el factor de coagulación es un factor VII o VIIa mutado (ver, por ejemplo, Persson, et al. 2001, Proc. Nag Acad. Sci. USA 98:13583; Solicitud de Patente Estadounidense Serie No. 101109498). El factor de coagulación puede ser un factor que participa en la ruta extrínseca. El factor de coagulación puede ser un factor que participa en la ruta intrínseca o extrínseca. 15

El factor de coagulación puede ser un factor de coagulación humano o un factor de coagulación no humano, por ejemplo, derivado de un primate no humano, un cerdo, o cualquier mamífero. El factor de coagulación puede ser el factor de coagulación quimérico, por ejemplo, el factor de coagulación puede comprender una porción de un factor humano de coagulación y una porción de un factor de coagulación porcino, o cualquiera no humano o una porción de un primer factor de coagulación no humano y una porción de un segundo factor de coagulación no humano. 20

El factor de coagulación puede ser factor de coagulación activado. Alternativamente el factor de coagulación puede ser una forma inactiva de un factor de coagulación, por ejemplo, un zimógeno. El factor inactivo de coagulación puede experimentar activación posterior para ser ligado a por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina. El factor inactivo de coagulación se puede activar posteriormente para la administración a un sujeto. Alternativamente, el factor inactivo de coagulación se puede activar antes de la administración. 25

3. Inmunoglobulinas

Las proteínas quiméricas de esta invención incluyen por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas se comprenden de cuatro cadenas de proteína que se asocian covalentemente con dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. Cada cadena se comprende adicionalmente una 30 región variable y una región constante. Dependiendo del isotipo de inmunoglobulina, la región constante de cadena pesada se comprende de 3 o 4 dominios de región constante (por ejemplo, CH1, CH2, CH3, CH4). Algunos isotipos también pueden incluir una región de bisagra.

La porción de una región constante de inmunoglobulina puede ser una porción de una región constante de inmunoglobulina obtenida de cualquier mamífero. La porción de una región constante de inmunoglobulina puede incluir, pero no se limita a, una porción de una región constante de inmunoglobulina humana, una región constante de inmunoglobulina de primate no humano, una región constante de inmunoglobulina de bovino, una región constante de inmunoglobulina de porcino, una región constante de inmunoglobulina de murino, una región constante de inmunoglobulina de ovino o una región constante de inmunoglobulina de rata. 35

La porción de una región constante de inmunoglobulina puede incluir la región constante de cadena pesada completa, o un fragmento o análogo de la misma. Una región constante de cadena pesada puede comprender un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3, y/o una región bisagra. Una región constante de cadena pesada puede comprender un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3, y/o un dominio CH4. 40

La inmunoglobulina se puede producir recombinantemente o sintéticamente. La inmunoglobulina se puede aislar de una colección de cADN. La inmunoglobulina se puede aislar de una colección de fago (ver McCafferty et al. 1990, Nature 348:552). La inmunoglobulina se puede obtener mediante mezcla de gen de las secuencias conocidas (Mark et al. 1992, Bio/Technol. 10:779). La inmunoglobulina se puede aislar mediante recombinación in vivo (Waterhouse et al. 1993, Nucl. Acid Res. 21:2265). La inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina inmunizada (Jones et al. 1986, Nature 332:323). 45

La porción de una región constante de inmunoglobulina puede incluir una porción de un IgG, un IgA, un IgM, un IgD, un IgE. En una realización, la inmunoglobulina es un IgG. En otras realizaciones, la inmunoglobulina es IgG1. En todavía otra realización, la inmunoglobulina es IgG2.

5 La porción de una región constante de inmunoglobulina puede incluir un fragmento Fc. Un fragmento Fc se puede comprender de los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina y la región bisagra de la inmunoglobulina. El fragmento Fc puede ser el fragmento Fc de un IgG1, un IgG2, un IgG3 o un IgG4. En una realización, la inmunoglobulina es un fragmento Fc de un IgG1. En una realización, la inmunoglobulina es un fragmento Fc de un IgG2. En otras realizaciones, la porción de una región constante de inmunoglobulina se comprende de la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:2 (Figura 3B) o un análogo de la misma. En otras realizaciones, la inmunoglobulina se comprende de una proteína, o un fragmento de la misma, codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:3 (Figura 3C).

15 La porción de una región constante de inmunoglobulina puede incluir una variante Fc. La variante Fc se refiere a una molécula o secuencia que se modifica de un Fc nativo pero todavía comprende un sitio de unión para el receptor de salvamento, FcRn (WO 97/34631). Nativo se refiere a un Fc que no se ha modificado por un humano. La WO 96/32478 describe las variantes Fc de ejemplo, así como también la interacción con el receptor de salvamento. Así, el término "variante Fc" comprende una molécula o secuencia que se humaniza de un Fc nativo no humano. Adicionalmente, un Fc nativo comprende sitios que se pueden remover debido a que ellos proporcionan características estructurales o la actividad biológica que no se requieren para las moléculas de fusión de la presente invención. Así, la variante Fc comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios nativos Fc o residuos que afectan o se involucran en (1) la formación de enlace de disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula anfitriona seleccionada (3) heterogeneidad en el terminal N luego de la expresión de la célula anfitriona seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con complemento, (6) unión a un receptor Fc diferente a un receptor de salvamento, o (7) anticuerpo dependiente de citotoxicidad celular (ADCC).

25 En otras realizaciones, la porción de una región constante de inmunoglobulina es un socio de unión del receptor neonatal Fc (FcRn). Un socio de unión FcRn es cualquier molécula que se puede unir específicamente por el receptor FcRn con transporte activo consecuente mediante el receptor FcRn del socio de unión FcRn. El receptor FcRn se ha aislado de varias especies de mamífero incluyendo humanos. Se conocen las secuencias del FcRn humano, FcRn de rata, y FcRn de ratón (Story et al. 1994, J. Exp. Med. 180:2377). El receptor FcRn se une a IgG (pero no a otras clases de inmunoglobulina tal como IgA, IgM, IgD, y IgE) en pH relativamente bajo, activamente transporta el IgG transcelularmente en una dirección luminal a serosal, y luego libera el IgG en pH relativamente mayor encontrados en los fluidos intersticiales. Esto se expresa en el tejido epitelial de adultos (Patente Estadounidense Nos. 6,030,613 y 6,086,875) incluyendo epitelio intestinal y de pulmón (Israel et al. 1997, Immunology 92:69) epitelio tubular próximo renal (Kobayashi et al. 2002, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 282:F358) así como también epitelio nasal, superficies vaginales, y superficies del árbol biliar.

35 Los patrones de unión FcRn de la presente invención abarcan cualquier molécula que se puede unir específicamente mediante el receptor FcRn incluyendo el IgG completo, el fragmento Fc de IgG, y otros fragmentos que incluyen la región de unión completa del receptor FcRn. La región de la porción Fc de IgG que se une al receptor FcRn se ha descrito con base en cristalografía de rayos X (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379). El área de contacto principal del Fc con el FcRn está cerca al conjunto de los dominios CH2 y CH3. Los contactos Fc-FcRn están dentro de una cadena pesada Ig única. Los patrones de unión FcRn incluyen IgG completo, el fragmento Fc de IgG, y otros fragmentos de IgG que incluyen la región de unión completa de FcRn. Los sitios de contacto principales incluyen los residuos de aminoácido 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, y 314 del dominio CH2 y los residuos de aminoácido 385-387, 428, y 433-436 del dominio CH3. Las referencias hechas al número de aminoácido de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina, o regiones, se basan en Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda; MD.

45 La región Fc del IgG se puede modificar de acuerdo con los procedimientos bien reconocidos tal como mutagenia dirigida a sitio y similares para producir los fragmentos IgG o Fc modificados o sus porciones que se vincularán mediante FcRn. Tales modificaciones incluyen modificaciones remotas de los sitios de contacto FcRn así como también modificaciones dentro de los sitios de contacto que conservan o aún mejoran la unión al FcRn. Por ejemplo los siguientes residuos de aminoácido únicos en Fc IgG1 humano (Fcy1) se pueden sustituir sin pérdida significativa de la afinidad de unión Fc para FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, A330S, P331A, P331S, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A, y K447A, en donde por ejemplo P238A representa prolina tipo natural sustituida por alanina en la posición número 238. En adición a la alanina se pueden

sustituir otros aminoácidos para los aminoácidos tipo naturales en las posiciones especificadas anteriormente. Se pueden introducir mutaciones solo dentro de Fc que surge a más de cien patrones de unión FcRn distintos del Fc nativo. Adicionalmente, las combinaciones de dos, tres, o más de estas mutaciones individuales se pueden introducir juntas, surgiendo en cientos más patrones de unión FcRn.

- 5 Ciertas de las mutaciones anteriores puede conferir nueva funcionalidad luego del socio de unión FcRn. Por ejemplo, una realización incorpora N297A, que remueve un sitio de N-glicosilación altamente conservado. El efecto de esta mutación es para reducir la inmunogenicidad, mejorando por lo tanto la semivida circulante del socio de unión FcRn, y para presentar el socio de unión FcRn incapaz de unirse a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, y FcγRIIA, sin comprometer la afinidad para FcRn (Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). Adicionalmente, por lo menos tres receptores gama Fc humanos parecen reconocer un sitio de unión en IgG dentro de una región bisagra inferior, generalmente aminoácidos 234-237. Por lo tanto, otro ejemplo de inmunogenicidad potencia y la nueva funcionalidad que reduce la inmunogenicidad puede surgir de las mutaciones de esta región, como por ejemplo al reemplazar los aminoácidos 233-236 del IgG1 humano "ELLG" para la secuencia correspondiente de IgG2 "PVA" (con una eliminación de aminoácido). Se ha mostrado que el FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, que media varias funciones efectoras no se unirá a IgG1 cuando tales mutaciones se han introducido (Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 y Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613). Como un ejemplo adicional de la nueva funcionalidad surge de las mutaciones descritas anteriormente la afinidad para FcRn se puede incrementar más allá del tipo natural en algunos casos. Esta afinidad incrementada puede reflejar un índice incrementado "on", un índice reducido "off" o ambos índices incrementados "on" y un índice reducido "off". Se considera que las mutaciones que imparten una afinidad incrementada para FcRn incluyen T256A, T307A, E380A, y N434A (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591).

En una realización, el socio de unión FcRn es un polipéptido incluyendo la secuencia PKNSSMISNTP y opcionalmente incluyendo adicionalmente una secuencia seleccionada de HQSLGTQ, HQNLSDGK, HQNISDQK, o VISSHLGQ (Patente Estadounidense No. 5,739,277).

- 25 Se pueden unir dos de los receptores FcRn a una molécula Fc única. Los datos cristalográficos sugieren que cada molécula de FcRn se une a un polipéptido único del homodímero Fc. Ligar el socio de unión FcRn, por ejemplo, un fragmento Fc de un IgG, a un factor de coagulación así proporciona un medio de suministro del factor de coagulación oralmente o como un aerosol administrado nasalmente, por medio de una ruta ocular o por medio de una ruta pulmonar.
- 30 El artesano experto entenderá que porciones de una región constante de inmunoglobulina para uso en la proteína quimérica de la invención pueden incluir mutantes o análogos de los mismos, o pueden incluir la región constante de inmunoglobulinas químicamente modificada o sus fragmentos (por ejemplo pegilación) (ver, por ejemplo, Aslam and Dent 1998, Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences Macmillan Reference, Londres). En un caso un mutante puede proporcionar la unión mejorada de un socio de unión FcRn para el FcRn.
- 35 También se contemplan para uso en la proteína quimérica de la invención los imitadores de péptido de por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un imitador de péptido de un fragmento Fc o un imitador de péptido de un socio de unión FcRn. En una realización, el imitador de péptido se identifica utilizando exhibición de fago (Ver, por ejemplo, McCafferty et al. 1990, Nature 348:552, Kang et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363; EP 0 589 877 B1).

#### 40 4. Ligadores Opcionales

La proteína quimérica de la invención puede comprender opcionalmente por lo menos una molécula ligadora. En una realización, el ligador se comprende de aminoácidos. El ligador puede comprender 1-5 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 10-50 aminoácidos, 50-100 aminoácidos, 100-200 aminoácidos. El ligador puede comprender la secuencia Gun. El ligador puede comprender la secuencia (GGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO.: 5). En cada caso, n puede ser un entero, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. Ejemplos de ligadores incluyen, pero no se limitan a, GGG (SEQ ID NO.: 6), SGGSGGS (SEQ ID NO.: 7), GSGSGSGSGSGSGG (SEQ ID NO.: 8), y GSGSGSGSGSGSGSGGS (SEQ ID NO.: 9).

- En una realización, el ligador no elimina la actividad de coagulación del factor de coagulación. Opcionalmente, el ligador mejora la actividad de coagulación del factor de coagulación, por ejemplo, al disminuir los efectos de los impedimentos estéricos y elaborar el factor de coagulación más accesible a su sitio de unión objetivo, por ejemplo, otro factor en la cascada de coagulación.

#### D. Construcciones de Ácido Nucleico

- La invención se relaciona con una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas quiméricas de la invención, dicha secuencia de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica, por ejemplo por lo menos un factor de coagulación, ligado

operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina. La secuencia de ácido nucleico también puede incluir secuencias adicionales o elementos conocidos en la técnica (por ejemplo promotores, mejoradores, secuencias poli A, la secuencia de señal). La secuencia de ácido nucleico opcionalmente puede incluir una secuencia que codifica un ligador puesto entre la secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos un factor de coagulación y la porción de una inmunoglobulina. La secuencia de ácido nucleico opcionalmente puede incluir una secuencia ligadora puesta antes o después de la secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos un factor de coagulación y la porción de una inmunoglobulina.

En una realización, la construcción de ácido nucleico se comprende de ADN. En otras realizaciones, la construcción de ácido nucleico se comprende de ARN. La construcción de ácido nucleico puede ser un vector, por ejemplo, un vector vírico o un plásmido. Ejemplos de vectores víricos incluyen, pero no se limitan a vector del virus adeno, un vector del virus adeno asociado o un vector del virus de leucemia de murino. Ejemplos de plásmidos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, pUC y pGEX.

En una realización, la construcción de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la figura 3D (SEQ ID NO:4).

Debido a la degeneración conocida del código genético, en donde más de un codón puede codificar el mismo aminoácido, una secuencia de ADN puede variar de aquella mostrada en la SEQ ID NOS:3 o 4 y aún codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NOS:2 o 1 respectivamente. Tales secuencias de ADN variantes pueden resultar de mutaciones inactivas (por ejemplo que ocurren durante la amplificación de PCR), o pueden ser el producto de la mutagenia deliberada de una secuencia nativa. La invención proporciona así las secuencias de ADN aisladas que codifican los polipéptidos de la invención, seleccionadas de: (a) ADN que comprende la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:3 o 4; (b) ADN que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:1 o 2; (c) ADN capaz de hibridación en un ADN de (a) o (b) bajo condiciones de exigencia moderada y que codifica los polipéptidos de la invención; (d) ADN capaz de hibridación a un ADN de (a) o (b) bajo condiciones de alta exigencia y que codifica polipéptidos de la invención, y (e) ADN que se degenera como un resultado del código genético en un ADN definido en (a), (b), (c), o (d) y que codifica los polipéptidos de la invención. Por supuesto, los polipéptidos codificados por tales secuencias de ADN se abarcan por la invención.

En otras realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de la invención también comprenden las secuencias de nucleótido que son por lo menos 80% idénticas a una secuencia nativa. También se contemplan las realizaciones en las cuales una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia que es por lo menos 90% idéntica, por lo menos 95% idéntica, por lo menos 98% idéntica, por lo menos 99% idéntica, o por lo menos 99.9% idéntica a una secuencia nativa. El porcentaje de identidad se puede determinar mediante inspección visual y cálculo matemático. Alternativamente, el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos se puede determinar al comparar la información de la secuencia utilizando el programa de computador GAP, versión 6.0 descrito por Devereux et al. 1984, Nucl. Acids Res. 12:387, y disponible del Grupo de Cómputo Genético de la Universidad de Wisconsin (UWCGC). Los parámetros predeterminados preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para las identidades y 0 para las no identidades) para los nucleótidos, y la matriz de comparación de peso de Gribkov and Burgess 1986, Nucl. Acids Res. 14:6745, como se describe por Schwartz and Dayhoff, eds., 1979, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358; (2) una penalidad de 3.0 para cada espacio y una penalidad adicional de 0.10 para cada símbolo en cada espacio; y (3) no hay penalidad para espacios finales. También se pueden utilizar otros programas utilizados por un experto en la técnica de la comparación de secuencia.

#### E. Síntesis de proteínas quiméricas

Las proteínas quiméricas que comprenden por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina y un factor de coagulación se puede sintetizar utilizando técnicas bien conocidas en el arte. Por ejemplo las proteínas quiméricas de la invención se pueden sintetizar recombinantemente en las células (ver, por ejemplo, Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. y Ausubel et al. 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y.).

Las secuencias de ADN que codifican las inmunoglobulinas, o sus fragmentos, o factores de coagulación, o sus fragmentos, se pueden clonar a partir de una variedad de colecciones de cADN o genómicas conocidas en la técnica. Las técnicas para aislar tales secuencias de ADN utilizando los métodos con base en sonda en técnicas convencionales y son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las sondas para aislar tales secuencias de ADN se pueden basar en las secuencias de ADN publicadas (ver, por ejemplo, Hieter et al. 1980, Cell 22: 197-207). Se puede utilizar el método de reacción de la cadena polimerasa (PCR) descrito por Mullis et al. (Patente Estadounidense No. 4,683,195) y Mullis (Patente Estadounidense No. 4,683,202). La elección de la colección y la selección de las sondas para el aislamiento de tales secuencias de ADN están dentro del nivel de la persona medianamente experta en la técnica. Alternativamente, las secuencias de ADN que codifican las inmunoglobulinas,

o sus fragmentos, o factores de coagulación se pueden obtener de vectores conocidos en la técnica que contienen inmunoglobulinas, o sus fragmentos, o factores de coagulación.

Para la producción recombinante, se inserta una secuencia de polinucleótido que codifica la proteína quimérica dentro de un vehículo de expresión adecuado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada, o en el caso de un vector vírico de ARN, los elementos necesarios para replicación y traducción. El ácido nucleico que codifica la proteína quimérica se inserta dentro del vector en la estructura de lectura apropiada.

En ciertas realizaciones el ácido nucleico también puede codificar un factor de coagulación de propéptido que se modifica mediante la célula para producir la proteína quimérica madura de la invención. En una realización específica el factor de coagulación de propéptido se reconoce por una carboxilada y dependiente de vitamina k que modifica el factor de coagulación de propéptido para alcanzar la actividad completa (por ejemplo factor VII, factor IX, factor X, protrombina). Para producir la proteína quimérica madura de la invención, la secuencia de propéptido se divide posteriormente mediante una endoproteasa, por ejemplo, enzima que divide el aminoácido básico pareado (PACE), o cualquier miembro de la familia PACE, tal como PCSK1-9, incluyendo sus versiones truncadas, o su equivalente de levadura Kex2 de *S. cerevisiae* y las versiones truncadas de Kex2 (ver, por ejemplo, Patente Estadounidense Nos. 5,077,204; 5,162,220; 5,234,830; 5,885,821; 6,329,176 (Kex2 1-675)).

El vehículo de expresión luego se transfecta en una célula objetivo adecuada que expresará la proteína, por ejemplo, una proteína quimérica. Las técnicas de transfección conocidas en la técnica incluyen, pero no se limitan a, precipitación de fosfato de calcio (Wigler et al. 1978, Cell 14:725) y electroporación (Neumann et al. 1982, EMBO, J. 1:841). Una variedad de sistemas de vector de expresión de anfitrión se puede utilizar para expresar las proteínas quiméricas descritas aquí en células eucarióticas. En una realización, la célula eucariótica es una célula de animal, incluyendo células de mamífero (por ejemplo células CHO, BHK, Cos, HeLa). Cuando la proteína quimérica se expresa en una célula eucariótica el ADN que codifica la proteína quimérica también puede codificar una secuencia de señal que permitirá ser secretada la proteína quimérica. Un experto en la técnica entenderá que mientras que la proteína traduce la secuencia de señal se divide por la célula para formar la proteína quimérica madura. Se conocen varias secuencias de señal en la técnica, por ejemplo, la secuencia de señal de factor VII maduro, la secuencia de señal del factor IX maduro y la secuencia de señal liviana Igk de ratón. Alternativamente, en donde no se incluye una secuencia de señal la proteína quimérica se puede recuperar al lisar las células.

La proteína quimérica de la invención se puede sintetizar en un animal transgénico, tal como un roedor, cabra, oveja, cerdo, o vaca. El término "animales transgénicos" se refiere a animales no humanos que han incorporado un gen extraño dentro de su genoma. Debido a que este gen está presente en tejidos de línea germinal, este se pasa de padres a hijos. Los genes exógenos se introducen de los embriones denominados sencillos (Brinster et al. 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438). Los métodos para producir animales transgénicos se conocen en la técnica, incluyendo transgénicos que producen las moléculas de inmunoglobulina (Wagner et al. 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6376; McKnight et al. 1983, Cell 34:335; Brinster et al. 1983, Nature 306:332; Ritchie et al. 1984, Nature 312:517; Baldassarre et al. 2003, Theriogenology 59:831; Robl et al. 2003, Theriogenology 59:107; Malassagne et al. 2003, Xenotransplantation 10(3):267).

Los vectores de expresión pueden codificar las etiquetas que permiten la fácil purificación o la identificación de la proteína recombinantemente producida. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, vector pUR278 (Ruther et al. 1983, EMBO J. 2:1791) en el cual la proteína quimérica descrita aquí codifica la secuencia que se puede ligar dentro del vector en estructura con la región codificante lac z ya que se produce una proteína híbrida; los vectores pGEX se pueden utilizar para expresar las proteínas con una etiqueta de glutatona S-transferasa (GST). Estas proteínas son usualmente solubles y se pueden purificar fácilmente de las células mediante la adsorción en glóbulos de glutatona-agarosa seguido por elusión en la presencia de glutatona libre. Los vectores incluyen los sitios de división (por ejemplo PreCission Protease™ (Pharmacia, Peapack, N.J.)) para la remoción fácil de la etiqueta después de purificación.

Para incrementar la eficiencia de producción, el polinucleótido se puede diseñar para codificar las unidades múltiples de la proteína quimérica de la invención separada por los sitios de división enzimáticos. El polipéptido resultante se puede dividir (por ejemplo mediante tratamiento con la enzima apropiada) con el fin de recuperar las unidades de polipéptido. Esto puede incrementar la producción de los polipéptidos dirigidos por un único promotor. Cuando se utiliza en los sistemas de expresión víricos apropiados, la traducción de cada polipéptido codificado por el mRNA se dirige internamente en el transcritto; por ejemplo, mediante el sitio de entrada de ribosoma interno, IRES. Así, la construcción policistrónica dirige la transcripción de un mRNA policistrónico grande, único que, a su vez, dirige la traducción de múltiples polipéptidos individuales. Este método elimina la producción y el procedimiento enzimático de las poliproteínas y puede incrementar significativamente la producción de polipéptido dirigido mediante un promotor único.

- Los vectores utilizados en la transformación contendrán usualmente un marcador seleccionable utilizado para identificar los transformantes. En sistemas bacterianos estos pueden incluir un gen de resistencia al antibiótico tal como ampicilina, blasticidina o canamicina. Los marcadores seleccionables para uso en las células de mamífero cultivadas incluyen genes que confieren resistencia a los fármacos, tal como neomicina, higromicina, y metotrexato.
- 5 El marcador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. Un marcador seleccionable amplificable es el gen de reductasa dihidrofolato (gen DHFR). Otro marcador amplificable es el cADN DHFRr (Simonsen and Levinson 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80:2495). Los marcadores seleccionables se revisan por Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass.) y la elección de los marcadores seleccionables está bien dentro del nivel de la persona medianamente experta en la técnica.
- 10 Los marcadores seleccionables se pueden introducir dentro de la célula en un plásmido separado al mismo tiempo como el de interés, o ellos se pueden introducir en el mismo plásmido. Si en el mismo plásmido, el marcador seleccionable y el gen de interés pueden estar bajo el control de diferentes promotores o el mismo promotor, la última disposición predice un mensaje dicistrónico. Las construcciones de este tipo se conocen en la técnica (por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,713,339).
- 15 Los elementos de expresión de los sistemas de expresión varía en su resistencia y especificidades. Dependiendo del sistema de anfitrión/vector utilizado, cualquiera de un número de elementos de traducción y transcripción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles, se puede utilizar en el vector de expresión. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, se pueden utilizar los promotores inducibles tal como pL de bacteriófago  $\lambda$ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y similares; cuando se clona en sistemas de célula de insecto, los promotores tal como el promotor polihedron baculovirus se puede utilizar; cuando se clona en sistemas de célula de planta, promotores derivados del genoma de las células de planta (por ejemplo promotores de choque por calor; el promotor para la subunidad pequeña de RUBISCO; el promotor para la proteína de unión a/b clorofila) o de los virus de planta (por ejemplo el promotor de ARN 35S de CaMV; el promotor de proteína recubierta de TMV) se pueden utilizar; cuando se clona en sistemas de célula de mamífero, promotores derivados del genoma de las células de mamífero (por ejemplo promotor metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo el promotor tardío de adenovirus; el promotor de virus de vacuna 7.5 K, el promotor CMV) se pueden utilizar; cuando se generan estirpes celulares que contienen múltiples copias del producto de expresión, se pueden utilizar vectores con base en SV40-, BPV- y EBV como un marcador seleccionable apropiado.
- 20 En los casos en donde se utilizan los vectores de expresión de planta, la expresión de las secuencias que codifican las formas no ciclizadas o lineales de las proteínas quiméricas de la invención se pueden conducir mediante cualquier número de promotores. Por ejemplo, se pueden utilizar promotores víricos tal como los promotores de ARN 35S y los promotores de ARN 19S de CaMV (Brisson et al. 1984, Nature 310:511-514), o el promotor de proteína recubierta de TMV (Takamatsu et al. 1987, EMBO J. 6:307-311); alternativamente, se pueden utilizar los promotores de planta tal como la subunidad pequeña de RUBISCO (Coruzzi et al. 1984, EMBO J. 3:1671-1680; Broglie et al. 1984, Science 224: 838-843) o los promotores de choque por calor, por ejemplo, hsp17.5-E o hsp17.3-B de soya (Gurley et al. 1986, Mol. Cell. Biol. 6:559-565). Estas construcciones se pueden introducir dentro de células de planta utilizando los plásmidos Ti, plásmidos Ri, vector del virus de planta, la transformación de ADN directa, microinyección, electroporación, etc. Para revisiones de tales técnicas ver, por ejemplo, Weissbach & Weissbach 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp. 421-463; y Grierson & Corey 1988, Plant Molecular Biology, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9.
- 30 En un sistema de expresión de insecto que se puede utilizar para producir las proteínas quiméricas de la invención, el virus polihidrosis nuclear Autographa californica (AcNPV) se utiliza como un vector para expresar los genes extraños. Los virus crecen en células Spodoptera frugiperda. Se puede clonar una secuencia codificante en regiones no esenciales (por ejemplo el gen polihedron) del virus y se coloca bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor polihedron). La inserción exitosa de una secuencia codificante resultará en la inactivación del gen polihedron y la producción del virus recombinante no ocluido (es decir virus que carece del recubrimiento proteínico codificado por el gen polihedron). Estos virus recombinantes luego se utilizan para infectar células Spodoptera frugiperda en las que se expresa el gen insertado. (Ver, por ejemplo, Smith et al. 1983, J. Virol. 46:584; Patente Estadounidense No. 4,215,051). Ejemplos adicionales de este sistema de expresión se pueden encontrar en Ausubel et al., eds 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.
- 40 En células anfitrionas de mamífero, se puede utilizar un número de sistemas de expresión basados víricos. En casos en donde se utiliza un adenovirus como un vector de expresión, se puede ligar una secuencia codificante en un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico luego se puede insertar en el genoma de adenovirus mediante recombinación in vitro o in vivo. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo región E1 o E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar un péptido polipéptido en anfitriones infectados (ver, por ejemplo, Logan & Shenk 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:3655-3659). Alternativamente, se puede utilizar el promotor
- 55

vaccinia 7.5 K (ver, por ejemplo, Mackett et al. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:7415; Mackett et al. 1984, J. Virol. 49:857; Panicali et al. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:4927).

5 En casos en donde se utiliza un adenovirus como un vector de expresión, se puede ligar una secuencia codificante a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico luego se puede insertar en el genoma de adenovirus mediante recombinación in vitro o in vivo. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo región E1 o E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar un polipéptido en anfitriones infectados (ver, por ejemplo, Logan & Shenk 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:3655-3659). Alternativamente, se puede utilizar el promotor vaccinia 7.5 K (ver, por ejemplo, Mackett et al. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:7415-7419; Mackett et al. 1984, J. Virol. 49:857-864; Panicali et al. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:4927).

15 Las células anfitrionas que contienen construcciones de ADN de la proteína quimérica se hacen crecer en un medio de crecimiento apropiado. Como se utiliza aquí, el término "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene los nutrientes requerido para el crecimiento de las células. Los nutrientes requeridos para el crecimiento celular pueden incluir una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y factores de crecimiento. En una realización, el medio que contiene vitamina K que es necesaria para una carboxilasa y celular para conferir actividad luego de un factor de coagulación producido recombinantemente, por ejemplo, factor VII. Opcionalmente, el medio puede contener suero de becerro bovino o suero de becerro fetal. El medio de crecimiento se seleccionará generalmente para células que contienen la construcción de ADN mediante, por ejemplo, selección de fármaco o deficiencia en un nutriente esencial, que se complementa mediante el marcador seleccionable en la construcción de ADN o se cotransfecta con la construcción de ADN. Las células de mamífero cultivadas se hacen crecer generalmente en medio libre de suero o medio que contiene suero disponible comercialmente (por ejemplo MEM, DMEM). La selección de un medio apropiado para la estirpe celular particular utilizada está dentro del nivel de la persona medianamente experta en la técnica.

25 La proteína producida recombinantemente de la proteína quimérica de la invención se puede aislar del medio de cultivo utilizando procedimientos bien establecidos en la técnica (por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio de ión). La proteína quimérica de la invención se puede aislar del medio de cultivo mediante cromatografía de columna, por ejemplo, una columna de la proteína A, o mediante cromatografía de intercambio de ión. Cuando una columna de proteína A o la columna de intercambio de ión se utiliza para separar la proteína quimérica de la invención la separación cromatográfica puede contribuir a la activación de la proteína quimérica de la invención, por ejemplo, al convertir el factor VII al factor VIIa. El medio de cultivo para las células anfitrionas transfectadas o transformadas de crecimiento apropiado se separan del material celular, y se demuestra la presencia de las proteínas quiméricas. Un método para detectar las proteínas quiméricas, por ejemplo, es mediante la unión de las proteínas quiméricas o las porciones de las proteínas quiméricas a un anticuerpo específico que reconoce la proteína quimérica de la invención (por ejemplo, un anticuerpo anti Fc). Un anticuerpo de proteína anti-quimérica puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal elevado contra la proteína quimérica en cuestión. Por ejemplo, la proteína quimérica puede contener una porción de una región constante de inmunoglobulina. Los anticuerpos que reconocen la región constante de muchas inmunoglobulinas se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente. Se puede utilizar un anticuerpo para desarrollar un ELISA o un western blot para detectar la presencia de la proteína quimérica de la invención.

#### 40 F. Métodos para Utilizar las Proteínas Quiméricas

Las proteínas quiméricas de la invención tienen muchos usos que serán bien reconocidos por un experto en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a métodos para tratar un sujeto que tiene un trastorno hemostático y métodos para tratar un sujeto en necesidad de un agente hemostático general.

##### 1. Métodos para Tratar un Sujeto que Tiene un Trastorno Hemostático

45 La invención se relaciona con un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno hemostático que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de por lo menos una proteína quimérica, en donde la proteína quimérica comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina y por lo menos un factor de coagulación.

50 La proteína quimérica de la invención trata o evita un trastorno hemostático al promover la formación de un coágulo de fibrina. La proteína quimérica de la invención puede activar cualquier miembro de una cascada de coagulación. El factor de coagulación puede ser un participante en la ruta extrínseca, la ruta intrínseca o ambas. En una realización, el factor de coagulación es el factor VII o factor VIIa. El factor VIIa puede activar el factor X que interactúa con el factor Va para dividir la protrombina A trombina, que a su vez divide el fibrinógeno a fibrina.



## a. Afecciones Que Se Pueden Tratar

5 La proteína quimérica de la invención se puede utilizar para tratar cualesquier trastornos hemostáticos. Los trastornos hemostáticos que se pueden tratar mediante la administración de la proteína quimérica de la invención incluyen, pero no se limitan a, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, deficiencia del factor XI (deficiencia PTA), deficiencia del factor XII, así como también deficiencias o anomalías estructurales en fibrinógeno, protrombina, factor V, factor VII, factores X, o factor XIII.

10 En una realización, el trastorno hemostático es un trastorno hereditario. En una realización, el sujeto tiene hemofilia A, y la proteína quimérica comprende el factor VIII o el factor VIIIa. En otras realizaciones, el sujeto tiene hemofilia A y la proteína quimérica comprende el factor VII o el factor VIIa. En otras realizaciones, el sujeto tiene hemofilia B y la proteína quimérica comprende el factor IX o el factor IXa. En otras realizaciones, el sujeto tiene hemofilia B y la proteína quimérica comprende el factor VII o el factor VIIa. En otras realizaciones, el sujeto tiene anticuerpos inhibidores para el factor VIII o el factor VIIIa y la proteína quimérica comprende el factor VII o el factor VIIa. En todavía otra realización, el sujeto tiene anticuerpos inhibidores contra el factor IX o el factor IXa y la proteína quimérica comprende el factor VII o el factor VIIa.

15 La proteína quimérica de la invención se puede utilizar para tratar profilácticamente un sujeto con un trastorno hemostático. La proteína quimérica de la invención se puede utilizar para tratar una hemorragia aguda en un sujeto con un trastorno hemostático.

En una realización, el trastorno hemostático es el resultado de una deficiencia en un factor de coagulación, por ejemplo, factor IX, factor VIII, factor VII. En otras realizaciones, el trastorno hemostático puede ser el resultado de un factor de coagulación defectuoso, por ejemplo, factor de von Willebrand.

20 En otras realizaciones, el trastorno hemostático puede ser un trastorno adquirido. El trastorno adquirido puede resultar de una enfermedad o afección secundaria destacada. La afección no relacionada puede ser, como un ejemplo, pero no como una limitación, cáncer, una enfermedad autoinmune, o embarazo. El trastorno adquirido puede resultar de la antigüedad o de la medicación para tratar un trastorno secundario destacado (por ejemplo quimioterapia para cáncer).

## 25 2. Métodos Para Tratar Un Sujeto En Necesidad De Un Agente Hemostático General

30 La invención también se relaciona con métodos para tratar un sujeto que no tiene un trastorno hemostático o una enfermedad o afección secundaria que resulta en la adquisición de un trastorno hemostático. La invención así se relaciona con un método para tratar un sujeto en necesidad de un agente hemostático general que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de por lo menos una proteína quimérica, en donde la proteína quimérica comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina y por lo menos un factor de coagulación.

## a. Afecciones Que Se Pueden Tratar

35 En una realización, el sujeto en necesidad del agente hemostático general se experimenta, o aproximadamente va a experimentar, cirugía. La proteína quimérica de la invención se puede administrar antes de, durante, o después de cirugía como un profiláctico. La proteína quimérica de la invención se puede administrar antes de, durante, o después de cirugía para controlar una hemorragia aguda. La cirugía puede incluir, pero no se limita a trasplante de hígado, resección hepática, o trasplante de célula madre.

40 La proteína quimérica de la invención se puede utilizar para tratar un sujeto que tiene una hemorragia aguda quien no tiene un trastorno hemostático. La hemorragia aguda puede resultar de trauma severo, por ejemplo, cirugía, accidente de automóvil, heridas, desgarros por disparos de armas, o cualquier otro evento traumático que resulta en sangrado no controlado.

## b. Modalidades de Tratamiento

45 La proteína quimérica de la invención se puede administrar intravenosamente, subcutáneamente, intramuscularmente, o por medio de cualquier superficie de mucosa, por ejemplo, oralmente, sublingualmente, bucalmente, nasalmente, rectalmente, vaginalmente o por medio de la ruta pulmonar. La proteína quimérica se puede implantar dentro o se puede ligar a un soporte sólido de biopolímero que permite la liberación lenta de la proteína quimérica en el sitio del sangrado o implantar dentro de una banda/vendaje.

Las dosis de la proteína quimérica de la invención variará dependiendo del sujeto y la ruta particular de administración utilizada. Las dosificaciones pueden variar de 0.1 a 100,000 µg/kg de peso corporal. En una

realización, el rango de dosificación es 0.1-1,000 µg/kg. La proteína se puede administrar continuamente o en intervalos de tiempo específicos. Se pueden emplear ensayos in vitro para determinar los rangos de dosis óptimos y/o esquemas para la administración. Los ensayos in vitro que miden la actividad del factor de coagulación se conocen en la técnica, por ejemplo, ensayo de coagulación STA-CLOT VIIa-rTF. Adicionalmente, las dosis afectivas se pueden extrapolar de las curvas de respuesta de dosis obtenidas de modelos de animal, por ejemplo, un perro hemofílico (Mount et al. 2002, Blood 99(8):2670).

La invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación, por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences por E.W. Martin. Ejemplos de excipientes pueden incluir almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y similares. La composición también puede contener reactivos amortiguantes de pH, y agentes humectantes o emulsificantes.

Para la administración oral, la composición farmacéutica puede tomar la forma de comprimidos o cápsulas preparadas mediante medios convencionales. La composición también se puede preparar como un líquido por ejemplo un jarabe o una suspensión. El líquido puede incluir agentes de suspensión (por ejemplo jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsificantes (lecitina o acacia), vehículos no acuosos (por ejemplo aceite de almendra, ésteres aceitosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados), y conservantes (por ejemplo metilo o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden incluir agentes saborizantes, colorantes y endulzantes. Alternativamente, la composición se puede presentar como un producto seco para constitución agua u otro vehículo adecuado.

Para la administración bucal, la composición puede tener la forma de comprimidos o pastilla de acuerdo con los protocolos convencionales.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en la forma de un aerosol nebulizado con o sin excipientes o en la forma de un rociador de aerosol de un empaque o nebulizador presurizado, con opcionalmente un propulsor, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de unidad de dosificación de aerosol presurizado se puede determinar al proporcionar una válvula para el suministro de una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador, se pueden formular ya que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica se puede formular para administración parenteral (es decir intravenosa o intramuscular) mediante inyección por bolo. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en contenedores multidosis con un conservante agregado. Las composiciones pueden tener tales formas como suspensiones, soluciones, o emulsiones en aceite o vehículos acuosos, y contienen agentes de formulación tal como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógeno.

La composición farmacéutica también se puede formular para administración rectal como un supositorio o enema de retención, por ejemplo, que contiene bases de supositorio convencionales tal como manteca de cacao u otros glicéridos.

### c. Terapia de Combinación

En otras realizaciones, la invención se relaciona con un método para tratar un sujeto con un trastorno hemostático que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de por lo menos una proteína quimérica que comprende por lo menos un factor de coagulación y por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina en combinación con por lo menos un otro factor de coagulación o agente que promueve la hemostasia. Dicho otro factor de coagulación o agente que promueve la hemostasia puede ser cualquier terapéutico con demuestra la actividad de coagulación. Como un ejemplo, pero no como una limitación, el factor de coagulación o agente hemostático puede incluir el factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, protrombina, fibrinógeno, factor de von Willebrand o factor de tejido soluble recombinante (rsTF) o las formas activadas de cualquiera de los precedentes. El factor de coagulación del agente hemostático también puede incluir fármacos anti-fibrinolíticos, por ejemplo, ácido epsilon-amino-caproico, ácido tranexámico.

## G. Equipos

La invención proporciona un equipo para el diagnóstico de un trastorno hemostático. El equipo puede incluir un contenedor y una proteína quimérica que comprende por lo menos un factor de coagulación y por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina. La proteína quimérica se puede proporcionar en un amortiguador o disolvente apropiado. El amortiguador puede ser un amortiguador acuoso, por ejemplo, PBS o alternativamente la proteína quimérica se puede liofilizar. El equipo también puede proporcionar instrucciones para detectar la presencia de un factor de coagulación en una muestra, por ejemplo, poner en contacto una alícuota de una muestra con la proteína quimérica de la invención y detectar la presencia de un coágulo. La detección puede incluir detección visible. El equipo puede proporcionar opcionalmente una alícuota de sangre que carece de un factor de coagulación conocido.

5

## 10 Ejemplos

**Ejemplo 1: Clonación de pcADN 3.1-Flag-Fc.**

La secuencia para el péptido FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys) (SEQ ID NO: 23), una etiqueta de afinidad común utilizada para identificar o purificar las proteínas, se clona dentro del plásmido pcADN 3.1-Fc, que contiene la secuencia de señal de Igk de ratón seguida por el fragmento Fc de IgG1 humano (aminoácidos 221-447, numeración EU). La construcción se crea mediante traslapo PCR utilizando los siguientes cebadores:

15

FlagFc-F1: 5'- GCTGGCTAGCCACCATGGA -3'(SEQ ID NO: 10)

**FlagFc-R1: 5'- CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGTCA  
CCAGTGGAACTGGAAC -3' (SEQ ID NO: 11)**

**FlagFc-F2: 5'- GACTACAAGG ACGACGATGA CAAGGACAAA  
ACTCACACAT GCCCACCGTG CCCAGCTCCG GAACTCC -3' (SEQ ID NO:  
12)**

FlagFc-R2: 5'- TAGTGGATCCTCATTTACCCG -3' (SEQ ID NO: 13)

20

La plantilla de pcADN 3.1-Fc luego se agrega a dos reacciones PCR separadas que contienen 50 pmol de cada uno de los pares cebadores FlagFc-F1/R1 o FlagFc-F2/R2 en una reacción 50 µl utilizando polimerasa de ADN Pfu Ultra (Stratagene, CA) de acuerdo con el protocolo estándar del fabricante en un Termociclador MJ utilizando los siguientes ciclos: 95°C en 2 minutos; 30 ciclos de (95°C en 30 segundos, 52°C 30 segundos, 72°C 45 segundos), seguido por 72°C durante 10 minutos. Los productos de estas dos reacciones luego se mezclan en otra reacción de PCR (2 µl cada una) con 50 pmol de los cebadores FlagFc-F1 y FlagFc-R2 en una reacción de 50 µl utilizando la polimerasa de ADN Pfu Ultra (Stratagene, CA) de acuerdo con el protocolo estándar del fabricante en un Termociclador MJ utilizando los siguientes ciclos: 95°C 2 minutos; 30 ciclos de (95°C 30 segundos, 52°C 30 segundos, 72°C 45 segundos), seguido por 72°C durante 10 minutos. El fragmento resultante es gel purificado, se digiere y se inserta dentro del plásmido pcADN 3.1-Fc NheI-Bam HI. El plásmido resultante contiene la secuencia de señal Igk de ratón que produce la proteína FlagFc.

25

30 **Ejemplo 2: Clonación de la construcción PACE**

La secuencia codificante para el PACE humano (enzima de división de aminoácido básico pareado), una endoproteasa, se obtiene por RT-PCR. Se utilizan los siguientes cebadores:

**PACE-F1: 5'- GGTAAGCTTGCCATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGC -  
3'(SEQ ID NO: 15)**

PACE-R1: 5'- GTTTTCAATCTCTAGGACCCACTCGCC -3' (SEQ ID NO: 16)

35

PACE-F2: 5'- GCCAGGCCACATGACTACTCCGC -3' (SEQ ID NO: 17)

**PACE-R2: 5'- GGTGAATTCTCACTCAGGCAGGTGTGAGGGCAGC -  
3'(SEQ ID NO: 18)**

El cebador PACE-F1 agrega un sitio HindIII al extremo 5' de la secuencia PACE empezando con 3 nucleótidos antes del codón de inicio, mientras que el cebador PACE-R2 agrega un codón de detención después del aminoácido 715,

que ocurre al final del dominio extracelular de PACE, así como también agregar un sitio EcoRI al extremo 3' del codón de detención. Los cebadores PACE-RL y -F2 hibridan en los lados 3' y 5' de un sitio interno BamHI, respectivamente. Luego se establecen dos reacciones RT-PCR utilizando 25 pmol cada uno de los pares de cebador de PACE-F1/R1 o PACE-F2/R2 con 20 ng del ARN de hígado humano de adulto (Clontech; Palo Alto, CA) en una reacción de RT-PCR 50 µl utilizando el SuperScript™. El RT-PCR de una etapa con el sistema de Etiqueta PLATINUM® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La reacción se lleva a cabo en un Termociclador MJ utilizando los siguientes ciclos: 50°C a 30 minutos; 94°C a 2 minutos; 30 ciclos de (94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C 2 minutos), seguido por 72°C a 10 minutos. Estos fragmentos se ligan cada uno dentro del vector pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) y se secuencian completamente. El fragmento F2-R2 luego se subclona en pcADN6 V5/His (Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizando los sitios BamHI/EcoRI, y luego se clona el fragmento F1-R1 dentro de esta construcción utilizando los sitios HindIII/BamHI. El plásmido final, el pcADN6-PACE, produce una forma soluble de PACE (aminoácidos 1-715), cuando se ha eliminado la región de membrana. La secuencia del PACE en pcADN6-PACE se describe esencialmente en Harrison et al. 1998, Seminars in Hematology 35:4.

### 15 **Ejemplo 3: Clonación de la Construcción del Factor VII Fc**

La secuencia codificante para el Factor VII, se obtiene mediante RT-PCR del ARN de hígado fetal humano (Clontech, Palo Alto, CA). La región clonada se comprende de la secuencia de cADN de bp 36 a bp 1430 terminando justo antes del codón de detención. Se introduce un sitio SbfI en el terminal N. Se introduce un sitio BspEI en el terminal C. La construcción se clona mediante PCR utilizando los cebadores:

**Dirección 3': 5' GCTACCTGCAGGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGG  
3'(SEQ ID NO: 19)**

20 **Dirección 5':5' CAGTTCGGAGCTGGGCACGGCGGGCACGTGTGAGTTT  
TGTCGGGAAAT GG 3' (SEQ ID NO: 20)**

y las siguientes condiciones: 95°C durante 5 minutos seguido por 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto y 45 segundos, y un ciclo de extensión final de 72°C durante 10 minutos.

25 El fragmento digiere SbfI - BspEI y se inserta dentro de un plásmido pED.dC-Fc que codifica el fragmento Fc de un IgG1.

### **Ejemplo 4: Expresión y purificación del híbrido de monómero-dímero del Factor VII-Fc**

Se establecen las células CHO DG-44 que expresan el Factor VII-Fc. Las células CHO DG-44 se hacen crecer a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, en nucleósido MEM Alfa plus y ribonucleósidos y se complementa con 5% de suero bovino fetal inactivo hasta transfección.

30 Las células DG44 se colocan en placas en platos petri de cultivo de tejido de 100 mm y se hacen crecer en una confluencia de 50%- 60%. Un total de 10 µg de ADN se utiliza para transfectar un plato de 100 mm: 9 µg de pED.dC.FVII-Fc + 1 µg de pcADN6-PACE para la transfección del dímero, o 7.5 µg de pED.dC.FVII-Fc + 1.5 µg de pcADN3/Flag-Fc + 1 µg de pcADN6-PACE para la transfección del monómero. Las células se transfectan como se describe en el manual de reactivo de transfección Superfect (Qiagen, Valencia, CA). El medio se remueve después de 48 horas y se reemplaza con nucleósidos sin MEM Alfa más 5% de suero bovino fetal dializado y 10 µg/ml de Blastocidina (Invitrogen, Carlsbad, CA) para ambas transfecciones, mientras que la transfección del híbrido monómero-dímero también se ha complementado con 0.2 mg/ml de geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 10 días, las células se liberan de la placa con 0.25% de tripsina y se transfieren en matraces de cultivo de tejido T25, y se continúa la selección durante 10-14 días hasta que las células empiezan a crecer bien cuando se establecen estirpes celulares estables. La expresión de la proteína se amplifica posteriormente mediante la adición de 25 nM de metotrexato.

45 Se utilizan aproximadamente  $2 \times 10^7$  para inocular 300 ml de medio de crecimiento en una botella enrollada de 1700 cm<sup>2</sup> (Coming, Corning, NY) complementada con 5 µg/L de vitamina K<sub>3</sub> (bisulfito de sodio menadiona) (Sigma, St Louis, MO). Las botellas enrolladas se incuban en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 72 horas. El medio de crecimiento luego se intercambia con 300 ml del medio de producción libre de suero (DMEM/F12 con 5 µg/ml de insulina de bovino y 10 µg/ml de Gentamicina) complementado con 5 µg/L de vitamina K<sub>3</sub>. El medio de producción (medio acondicionado) se recolecta cada día durante 10 días y se almacena a 4°C. Se agrega el medio de producción fresco a las botellas enrolladas después de cada colección y las botellas se regresan a la incubadora. El medio agrupado primero se clarifica utilizando un filtro de fibra de vidrio Sartoclean (3.0 µm + 0.2 µm) (Sartorius Corp.

Gottingen, Alemania) seguido por un filtro Acropack 500 (0.8  $\mu\text{m}$  + 0.2  $\mu\text{m}$ ) (Pall Corp., East Hills, NY). El medio clarificado luego se concentra aproximadamente 20 veces utilizando los casetes de filtración de flujo tangencial Pellicon Biomax (10 kDa MWCO) (Millipore Corp., Billerica, MA).

5 Las quimeras Fc luego se capturan del medio concentrado mediante el pasaje sobre una Columna de Flujo Rápido 4 de proteína A Sefarosa (AP Biotech, Piscataway, NJ). Se carga una columna de 5 x 5 cm (100 ml) con  $\leq 5$  mg de proteína Fc por volumen de columna de ml en un índice de flujo lineal de 100 cm/hora para alcanzar un tiempo de residencia de  $\geq 3$  minutos. La columna luego se lava con volúmenes de columna de  $>5$  de 1X DPBS para remover las proteínas no vinculadas específicamente. Las proteínas vinculadas se eluyen con 100 mM de Glicina a pH 3.0. Las fracciones de elución que contienen el pico de proteína luego se neutralizan al agregar 1 parte de 1 M de Tris-HCL, pH 8 a 10 partes de la fracción eluida. El pasaje de la proteína quimérica sobre la columna de Proteína A se convierte en el factor VII inactivo para activar el factor VIIa (Figura 2). La activación adicional se puede lograr mediante el pasaje de la proteína sobre una columna de intercambio de anión (Peders et al. 1989, Biochemistry 28:9331-36).

15 La muestra de la proteína de transfección de híbrido de monómero-dímero se somete a purificación adicional, cuando este contiene una mezcla del homodímero FVII-Fc:FVII-Fc, FVII-Fc: híbrido de monómero-dímero FLAG-Fc, y FLAG-Fc: homodímeros FLAG-Fc. Para remover los homodímeros FLAG-Fc de la preparación, el grupo de Flujo Rápido 4 de la Proteína A Sefarosa primero se dializa en 20 mM de MES, 20 mM de NaCl, pH 6.1 y luego se pasa sobre una columna de intercambio de catión Unosphere S (BioRad Corp., Richmond, CA). Bajo las condiciones operación para la columna, el híbrido de monómero-dímero FLAG-Fc tiene una carga neutra neta (FLAG-Fc teórico  $\text{pI}=6.19$ ) y fluye a través de la columna mientras que se cargan positivamente las construcciones de hFVII-Fc, y así se liga a la columna y se eluye en alta resistencia iónica. El material dializado luego se carga en una columna 1.1 x 11 cm (9.9 ml) a 150 cm/hora. Durante el lavado y la elución, el índice de flujo se incrementa a 500 cm/hora. La columna se lava secuencialmente con 8 volúmenes de columna de 20 mM de MES, 20 mM de NaCl, pH 6.1 y 8 volúmenes de columna de 20 mM de MES, 40 mM de NaCl, pH 6.1. La proteína vinculada se eluye con 20 mM de MES, 750 mM de NaCl, pH 6.1. Las fracciones de elución que contienen el pico de proteína se agrupan y se filtran estériles a través de un disco de filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  antes de almacenamiento a  $-80^\circ\text{C}$ .

25 Se utiliza una columna MAB anti-FLAG para separar los dímeros Fc quiméricos con HFVII fusionados a ambas moléculas Fc de aquellas con un péptido FLAG y una fusión HFVII. Se diluye el grupo Eluido Unosphere S 1:1 con 20 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , pH 8 y se carga en una columna de sefarosa M2 anti-FLAG de 1.6 x 5 cm (Sigma Corp., St. Louis, MO) en un índice de flujo lineal de 60 cm/hora. La carga se objetiva a  $< 2.5$  mg del volumen de columna híbrido/ml de monómero-dímero. Después de cargar la columna se lava con 5 volúmenes de columna 20 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , pH 8.0. Luego se eluyen los híbridos de monómero-dímero con 100 mM de Glicina, pH 3.0. Las fracciones de elución que contienen el pico de proteína luego se neutralizan al agregar 1 parte de 1M de Tris-HCl, pH 8 a 10 partes de fracción eluida. Los grupos se almacenan a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 35 **Ejemplo 5: Análisis de Actividad de Coagulación del Homodímero del Factor VII-Fc y los Híbridos de Monómero/Dímero**

40 El equipo de ensayo StaClot FVIIa-rTF se compra de Diagnostica Stago (Parsippany, NJ) y se modifica como se describe en Johannessen et al. 2000, Blood Coagulation and Fibrinolysis 11: S159. Se desarrolla una curva estándar con el Estándar 89/688 de la Organización Mundial de la Salud FVIIa. El ensayo comparado de un homodímero comprendido de dos moléculas del factor VII y dos moléculas Fc con un híbrido de monómero/dímero comprendido de una molécula del factor VII y dos moléculas Fc. La actividad de coagulación significativa se observa para el híbrido monómero/dímero y el homodímero. La actividad de coagulación del híbrido monómero/dímero comparado con el homodímero es casi cuatro veces mayor (Figura 4).

### **Ejemplo 6: Unión del Factor VII-Fc a shFcRn**

45 La unión del factor VII-Fc al receptor Fc neonatal humano soluble (shFcRn) se analiza utilizando un instrumento Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia). Se recubre un chip CM5 (Biacore, Uppsala, Suecia) con 3500 unidades de resonancia (RU) de shFcRn utilizando la química de amina. Se diluye el Factor VII-Fc, 10 veces o 100 veces, en 50 mM de  $\text{PO}_4$ , pH 6.0, 100 mM de NaCl, 0.01% de Tween-20 y se inyecta (en duplicado) sobre la superficie durante 10 minutos a 10  $\mu\text{L}/\text{minuto}$ . Las muestras también se inyectan sobre una superficie de recubrimiento "mock" que sirve como un control de referencia. El chip se regenera con 100 mM de  $\text{PO}_4$  a pH 8.0. La respuesta (en RU), se registra 30 segundos antes que se detenga la inyección, que indica la unión específica (Figura 5).

### **Ejemplo 7: Captación Oral del Factor VII-Fc en Ratas Neonatales**

55 Se compran 9 ratas recién nacidas de 25 gramos de Charles River (Wilmington, MA) y se les permite aclimatar durante 24 horas. Las ratas se dosifican oralmente con el homodímero FVIIa-Fc, o el híbrido de monómero/dímero (que consiste de dos cadenas Fc, una de la cual se liga a Fc-VII). Un volumen de 200  $\mu\text{l}$  de una solución FVIIa-Fc se

5 utiliza para una dosis de 1 mg/kg. La solución se comprende de un amortiguador Tris-HCl a pH 7.4 con 5 mg/ml de inhibidor de tripsina de soya. A las ratas se les practica la eutanasia con CO<sub>2</sub> en varios puntos de tiempo, y se retira 200 µl de sangre mediante punción cardiaca. Se obtiene plasma mediante la adición de un volumen de 1/10 de 3.8% de solución de citrato de sodio y se centrifuga a temperatura ambiente en una velocidad de 1268xg. Las muestras de plasma se utilizan en ensayos frescos o congelados a -20° C.

10 Las muestras luego se analizan mediante ELISA. Se desarrolla el Factor VII Asserachrom:ELISA Ag en las muestras de plasma de rata neonatales. Se compara un ensayo de Factor VII:ELISA Ag de Diagnostica Stago (Parsippany, NJ) y se desarrolla como se describe en el equipo manual con un cambio. El estándar para la curva estándar se reemplaza con el Factor VIIa-Fc purificado. Para los experimentos in vivo, el estándar se corre en el mismo porcentaje de plasma de animal normal como se analiza. Los resultados muestran que una administración oral de ambos híbridos de monómero/dímero y los dímeros es exitosa (Figura 7). Un ensayo de curso de tiempo utilizando los híbridos de monómero/dímero sostienen los niveles de plasma del Factor VIIa-Fc administrado oralmente durante el tiempo con un T<sub>1/2</sub> de 18 horas (Figura 6).

### Ejemplo 8: Dosificación Intravenosa del Factor VII-Fc en Minicerdos

15 Se comparan minicerdos Gottingen adultos (6 kg) de Marshall Farms y se les permite aclimatar durante dos semanas. Los cerdos se anestesian con 12 mg/kg de Telazol y 8 mg/kg de XilaxinA y se dosifican intravenosamente a través de la vena yugular con 3 ml de una solución del Factor VIIa-Fc a 0.5 mg/kg en un amortiguador Tris-HCl a pH 7.4. Se recolectan tres mls de sangre en tubos vacutainer citratados (BD Sciences, Franklin Lakes, NJ) en varios puntos de tiempo por medio de punción venosa. Se obtiene plasma al centrifugar las muestras a temperatura ambiente en una velocidad de 1268xg. Las muestras de plasma se congelan a -20°C y posteriormente se analizan mediante ELISA.

25 Se desarrolla el Factor VII Asserachrom: ELISA Ag en las muestras de minicerdo. Se compara un ensayo de Factor VII:ELISA Ag de Diagnostica Stago (Parsippany, NJ) y se desarrolla como se describe en el equipo manual con un cambio. El estándar para la curva estándar se reemplaza con el Factor VIIa-Fc purificado. Para los experimentos in vivo, el estándar corre en el mismo porcentaje con plasma de animal normal como se analiza. Los niveles de plasma del híbrido de monómero-dímero administrados intravenosamente se muestran en la figura 8A. La semivida se determina que es 9.4 horas. Un ensayo de curso de tiempo utilizando la proteína quimérica del híbrido de monómero/dímero demuestra que sostiene los niveles de plasma del Factor VIIa-Fc intravenosamente administrado durante el tiempo con un T<sub>1/2</sub> de 22 horas (Figura 8A).

30 La actividad de coagulación utilizada se mide por el equipo de ensayo StaClot FVIIa-rTF (Figura 8B). El T<sub>1/2</sub> para la coagulación se encuentra que es 6.4 horas para un cerdo y 5.7 para el otro cerdo.

### Ejemplo de Referencia 9: Clonación de la construcción de Fc-Factor IX

La secuencia codificante humana del Factor IX, incluyendo la secuencia de prepro péptido, se obtiene mediante amplificación de RT-PCR del ARN de hígado humano de adulto utilizando los siguientes cebadores:

**natFIX-F: 5'-TTACTGCAGAAGGTTATGCAGCGCGTGAACATG-3'(SEQ ID NO: 21)**

35 **F9-R: 5'-TTTTTCGAATTCAGTGAGCTTTGTTTTTCCTTAATCC-3'(SEQ ID NO: 22)**

40 Se agregan 20 ng del ARN de hígado humano adulto (Clontech, Palo Alto, CA) y 25 pmol de cada cebador en una reacción de RT-PCR utilizando el SuperScript.™ El RT-PCR de una etapa con el sistema de Etiqueta PLATINUM® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La reacción se lleva a cabo en un Termociclador MJ utilizando los siguientes ciclos: 50°C a 30 minutos; 94°C a 2 minutos; 35 ciclos de (94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C 1 minute), y al final 72°C a 10 minutos. El fragmento se purifica en gel utilizando el Equipo de Extracción de Gel Qiagen (Qiagen, Valencia, CA), y se digiere con PstI-EcoRI, gel purificado, y se clona dentro de la digestión correspondiente del plásmido pED.dC.XFc. El aminoácido y las secuencias de ADN del factor IX-Fc se muestran en la figura 9.

45 **Ejemplo de Referencia 10: Purificación y expresión del homodímero del Factor IX-Fc y el híbrido de monómero-dímero**

Se establecen las células CHO DG-44 que expresan el Factor IX-Fc. Las células DG44 se colocan en placas en platos petro de cultivo de tejido de 100 mm y se hacen crecer en una confluencia de 50%- 60%. Se utiliza un total de

10 µg de ADN se utiliza para transfectar un plato de 100 mm: para la transfección del homodímero, 8 µg de pED.dC.Factor IX-Fc + 2 µg de pcADN6-PACE; para la transfección del híbrido de monómero-dímero, se utilizan 8 µg de pED.dC.Factor IX-Fc + 1 µg de pcADN3-FlagFc +1 µg de pcADN6-PACE. Las células se transfectan como se describe en el manual de reactivo de transfección Superfect (Qiagen, Valencia, CA). El medio se remueve a partir de la transfección después de 48 horas y se reemplaza con MEM Alfa sin nucleósidos más 5% de suero bovino fetal dializado y 10 µg/ml de Blastidina (Invitrogen, Carlsbad, CA) para ambas transfecciones, mientras que la transfección del híbrido del monómero-dímero también se complementa con 0.2 mg/ml de geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 3 días, las células se liberan de la placa con 0.25% de tripsina y se transfieren dentro de frascos de cultivo de tejido T25, y la selección se continúa durante 10-14 días hasta que las células empiezan a crecer bien cuando se establecen estirpes celulares estables. La expresión de proteína se amplifica posteriormente mediante la adición de 10 nM o 100 nM de metotrexato para el híbrido de monómero-dímero o homodímero, respectivamente.

Para ambas estirpes celulares, se utilizan aproximadamente  $2 \times 10^7$  células para inocular 300 ml del medio de crecimiento en una botella enrollada de 1700 cm<sup>2</sup> (Corning, Corning, NY), complementada con 5 µg/L de vitamina K<sub>3</sub> (bisulfito de sodio menadiona) (Sigma, St. Louis, MO). Las botellas enrolladas se incuban en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante aproximadamente 72 horas. El medio de crecimiento se intercambia con 300 ml de medio de producción libre de suero (DMEM/F12 con 5 µg/ml de insulina bovina y 10 µg/ml de Gentamicina), complementado con 5 µg/L de vitamina K<sub>3</sub>. El medio de producción (medio acondicionado) se recolecta cada día durante 10 días y se almacena a 4°C. Se agrega medio de producción fresco a las botellas enrolladas después de cada recolección y las botellas se regresan al incubador. Antes de cromatografía, el medio se clasifica utilizando un filtro SuporCap-100 (0.8/0.2 µm) de Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Se desarrollan todas las siguientes etapas a 4°C. El medio clarificado se aplica a la Sefarosa de Proteína A, se lava con 5 volúmenes de columna de 1X PBS (10 mM de fosfato, pH 7.4, 2.7 mM de KCl, y 137 mM de NaCl), eluye con 0.1 M de glicina, pH 2.7, y luego se neutraliza con volumen de 1/10 de 1 M de Tris-HCl, pH 9.0. La proteína luego se dializa en PBS.

La muestra de proteína de transfección del híbrido de monómero-dímero se somete a purificación adicional, cuando este contiene una mezcla de homodímero FIX-Fc:FIX-Fc, híbrido de monómero-dímero FIX-Fc:Flag-Fc, y el homodímero Flag-Fc:Flag-Fc. El material se concentra y se aplica a una columna Grado Superdex 200 Prep de 2.6 cm x 60 cm (318 ml) en un índice de flujo de 4 ml/ minuto (36 cm/hora) y luego se eluye con 3 volúmenes de columna de 1 X PBS. Las fracciones que corresponden en dos picos en el detector UV se recolectan y se analizan mediante SDS-PAGE. Las fracciones del primer pico contenido en el homodímero FIX-Fc:FIX-Fc o el híbrido de monómero-dímero FIX-Fc:FlagFc, mientras que el segundo pico contiene el homodímero FlagFc:FlagFc. Todas las fracciones que contienen el híbrido de monómero-dímero pero no se agrupa el homodímero FlagFc y se aplica directamente a una columna de Sefarosa M2 anti-FLAG de 1.6 x 5 cm (Sigma Corp., St. Louis, MO) en un índice de flujo lineal de 60 cm/hora. Después de cargar, la columna se lava con 5 volúmenes de columna PBS. Los híbridos de monómero-dímero luego se eluyen con 100 mM de Glicina, pH 3.0. Las fracciones de elución que contienen el pico de proteína luego se neutralizan al agregar 1/10 de volumen de 1 M de Tris-HCl, y se analizan al reducir y no reducir SDS-PAGE. Las fracciones se dializan en PBS, se concentran a 1-5 mg/ml, y se almacenan a -80°C.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> RIVERA, DANIEL S.

40 PETERS, ROBERT T.

BITONTI, ALAN J.

<120> PROTEÍNAS QUIMÉRICAS FC DEL FACTOR DE COAGULACIÓN PARA TRATAR HEMOFILIA

<130> 08945.0005-00000

<140> PCT/US04/13940

45 <141> 2004-05-06

<150> 60/468,837

<151> 2003-05-06

<160> 31

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 664

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción de aminoácido sintético

<400> 1

```

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



Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg  
 145 150 155 160  
 Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Pro Trp Gln  
 165 170 175  
 Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile  
 180 185 190  
 Asn Thr Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile  
 195 200 205  
 Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu  
 210 215 220  
 Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Val Ala Gln Val  
 225 230 235 240  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 245 250 255  
 Leu Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val  
 260 265 270  
 Pro Leu Cys Leu Pro Glu Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala  
 275 280 285  
 Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gly Gln Leu Leu Asp  
 290 295 300  
 Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu  
 305 310 315 320  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 325 330 335  
 Pro Asn Ile Thr Glu Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
 340 345 350  
 Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Gly Pro His Ala Thr  
 355 360 365  
 His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gly  
 370 375 380  
 Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser  
 385 390 395 400  
 Gln Tyr Ile Glu Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg  
 405 410 415  
 Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Phe Pro Asp Lys Thr His Thr  
 420 425 430  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Ser Val  
 435 440 445

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 450 455 460  
 Pro Glu Val Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 465 470 475 480  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 485 490 495  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Thr Tyr Arg  
 500 505 510  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 515 520 525  
 Glu Tyr Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 530 535 540  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 545 550 555 560  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Thr Lys Asn Gln  
 565 570 575  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 580 585 590  
 Val Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 595 600 605  
 Thr Pro Val Leu Asp Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 610 615 620  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 625 630 635 640  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Lys  
 645 650 655  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 660

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de aminoácido sintética

<400> 2

Phe Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Gly Pro Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

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

<210> 3

<211> 682

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de nucleótido sintética

<400> 3

```

gacaaaactc acacgtgcc  gccgtgccc  gctccggaac  tgctgggagg  accgtcagtc  60
ttcctcttcc ccccaaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca  120
tgcgtgggtgg tggacgtgag  ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac  180
ggcgtggagg  tgcataatgc caagacaaag cgcggggagg  agcagtacaa cagcacgtac  240
cgtgtgggtca gcgtectcac  cgtcctgcac caggactggc  tgaatggcaa ggagtacaat  300

```

```
gtcaaggtct ccaacaaagc ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa 360
agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa 420
gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggettctat cccagcgaca tcgccgtgga 480
gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgttggactc 540
cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcagg 600
gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagg 660
cctctcctctg tctccgggta aa 682
```

<210> 4

<211> 1900

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción de nucleótido sintético

<400> 4

```
gccaacgcgt tcttggagga gctgcccggc ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
cagtgtcctt tccgaggaggc ccgggagatc ttcaaggacg cggagaggac gaagctgttc 120
tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac 240
tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
tactgacatg accacacggg caccaagcgc tctgtcgggt gccacgaggg gtactctctg 360
ctggcagacg ggtgtcctg cacacccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
tggaggaacc tgatcgcggg gctgggcgag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag 660
cagagccggc ggggtggcgca ggtcatcatc ccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
cagcagatcg cgtgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtggtgccc 780
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgag cttctcattg 840
gtcagcggct ggggccagct getggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaagggt gggagactcc 960
ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggtg cctgacgggc 1080
atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggcccact ttggggtgta caccagggtc 1140
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgctcag agccacgccc aggagtcctc 1200
ctgagagccc catttccga caaaactcac acgtgcccgc cgtgcccagc tccggaactg 1260
ctgggcccagc cgtcagctct cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 1320
cggaccctctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 1380
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 1440
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcttcacca ggactggctg 1500
aatggcaagg agtacaatgt caaggtctcc aacaaagccc ctcccagccc ccatcgagaa 1560
aacctctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc 1620
ccgggatgag ctgaccaaga accaggctcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc 1680
cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc gagaacaact acaagaccac 1740
gcctcccgtg ttggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa 1800
gagcaggtgg cagcagggga acgtctctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa 1860
ccactacag cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1900
```

10 <210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido ligador sintético

<220>

<221> REPEAT

5 <222> (1)..(30)

<223> Este péptido puede abarcar 3 a 30 residuos como se especifica en la solicitud

<400> 5

```

  Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
   1         5         10        15
  Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
   20        25        30
  
```

<210> 6

10 <211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido ligador sintético

15 <400> 6

```

  Gly Gly Gly
   1
  
```

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido ligador sintético

<400> 7

```

  Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
   1         5
  
```

25 <210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido ligador sintético

<400> 8

5            **Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly**  
                   1                                   5                                   10                                   15

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido ligador sintético

<400> 9

**Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly**  
           1                                   5                                   10                                   15

**Gly Ser**

<210> 10

15 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

20 <400> 10

gctggctagc caccatgga 19

<210> 11

<211> 45

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 11

cttgatcatcg tcgtccttgt agtcgtcacc agtggaacct ggaac 45

<210> 12

<211> 67

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 12

**gactacaagg acgacgatga caaggacaaa actcacacat gccaccgtg cccagctccg 60**  
**gaactcc 67**

10

<210> 13

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 13

tagtggatcc tcattacc g 21

<210> 14

20 <211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

25 <400> 14

ggtaagcttg ccatggagct gaggccctgg ttgc 34

<210> 15

<211> 27

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 15

gtttcaatc tctaggaccc actcgcc 27

5 <210> 16

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 16

gccaggccac atgactactc cgc 23

<210> 17

<211>34

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 17

20 ggtgaattct cactcaggca ggtgtgaggg cagc 34

<210> 18

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 18

gctacctgca ggccaccatg gtctcccagg ccctcagg 38

<210> 19

30 <211> 51



<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

5 <400> 19

cagttccgga gctgggcacg gcgggcacgt gtgagtttg tcgggaaatg g 51

<210> 20

<211> 33

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 20

ttactgcaga aggttatgca gcgcgtgaac atg 33

15 <210> 21

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 21

ttttcgaat tcagtgagct ttgttttc ctaatcc 38

<210> 22

<211> 8

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 22

**Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys**  
 1 5

30

<210> 23

<211> 696

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción de aminoácido sintético

<400> 23

```

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

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly  
 145 150 155 160  
 Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe  
 165 170 175  
 Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala  
 180 185 190  
 Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu  
 195 200 205  
 Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe  
 210 215 220  
 Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp  
 225 230 235 240  
 Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile  
 245 250 255  
 Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly  
 260 265 270  
 Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu  
 275 280 285  
 His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn  
 290 295 300  
 Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile  
 325 330 335  
 Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr  
 340 345 350  
 Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val  
 355 360 365  
 Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg  
 370 375 380  
 Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His  
 385 390 395 400  
 Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val  
 405 410 415  
 Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly  
 420 425 430  
 Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser  
 435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Glu Phe Ala  
 450 455 460

Gly Ala Ala Ala Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 465 470 475 480

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 485 490 495

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 500 505 510

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 515 520 525

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 530 535 540

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 545 550 555 560

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 565 570 575

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 580 585 590

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
 595 600 605

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 610 615 620

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 625 630 635 640

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 645 650 655

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 660 665 670

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 675 680 685

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 690 695

<210> 24

<211> 2091

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción de olinucleótido sintético

<400> 24

```

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcacccat ctgcctttta 60
ggatatctac tcagtgtgta atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt 120
ctgaatcggc caaagaggtta taattcaggt aaattggaag agtttggtca agggaacctt 180
gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaac 240
actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat 300
ccatgtttaa atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttgggtgcc 360
tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga 420
tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtctgat aacaaggagg tttgctcctg tactgagggg 480
tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga 540
gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgttttcc tgatgtggac 600
tatgtaaatt ctactgaagc tgaaccatt ttggataaca tcactcaaag cacccaatca 660
tttaatgact tcaactcggg ttgttggtgga gaagatgcc aaccaggcca attcccttgg 720
caggttgttt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa 780
tggattgtaa ctgctgccca ctgtgttgaa actggtgtta aaattacagt tgctgcaggt 840
gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt 900
cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ccttctggaa 960
ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcatgct tgacaaggaa 1020
tacacgaaca tcttctcaa atttgatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc 1080
cacaaagga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc 1140
acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat 1200
gaaggagga gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa 1260
gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tgggggtgaa agtgtgcaat gaaaggcaaa 1320
tatggaatat ataccaaggt atcccgggat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaagctc 1380
actgaattcg cggcgcgcgc tgcggtcgac aaaactcaca catgccacc gtgccagca 1440
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 1500
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgtgg acgtgagcca cgaagaccct 1560
gaggtcaagt tcaactggtc cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 1620
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggctcagc tcctcaccgt cctgcaccag 1680
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc 1740
atcgagaaaa ccactccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1800
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1860
tctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1920
aagaccagc ctcccgtgtt ggactccgac ggctcctct tcctctacag caagctcacc 1980
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 2040
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaata a 2091

```

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 25

Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro  
1 5 10

10 <210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 26

**His Gln Ser Leu Gly Thr Gln**  
**1 5**

5 <210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 27

**His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys**  
**1 5**

<210> 28

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 28

**His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys**  
**1 5**

20 <210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 29

**Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln**  
**1 5**

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido ligador sintético

<220>

<221> REPEAT

10 <222> (1)..(10)

<223> Este péptido puede abarcar 1 a 10 residuos como se especifica en la solicitud

<400> 30

**Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly**  
**1 5 10**

<210> 31

15 <211> 50

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido ligador sintético

20 <220>

<221> REPEAT

<222> (1)..(50)

<223> Este péptido puede abarcar 5 a 50 residuos como se especifica en la solicitud

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15  
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
20 25 30  
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
35 40 45  
Gly Ser  
50

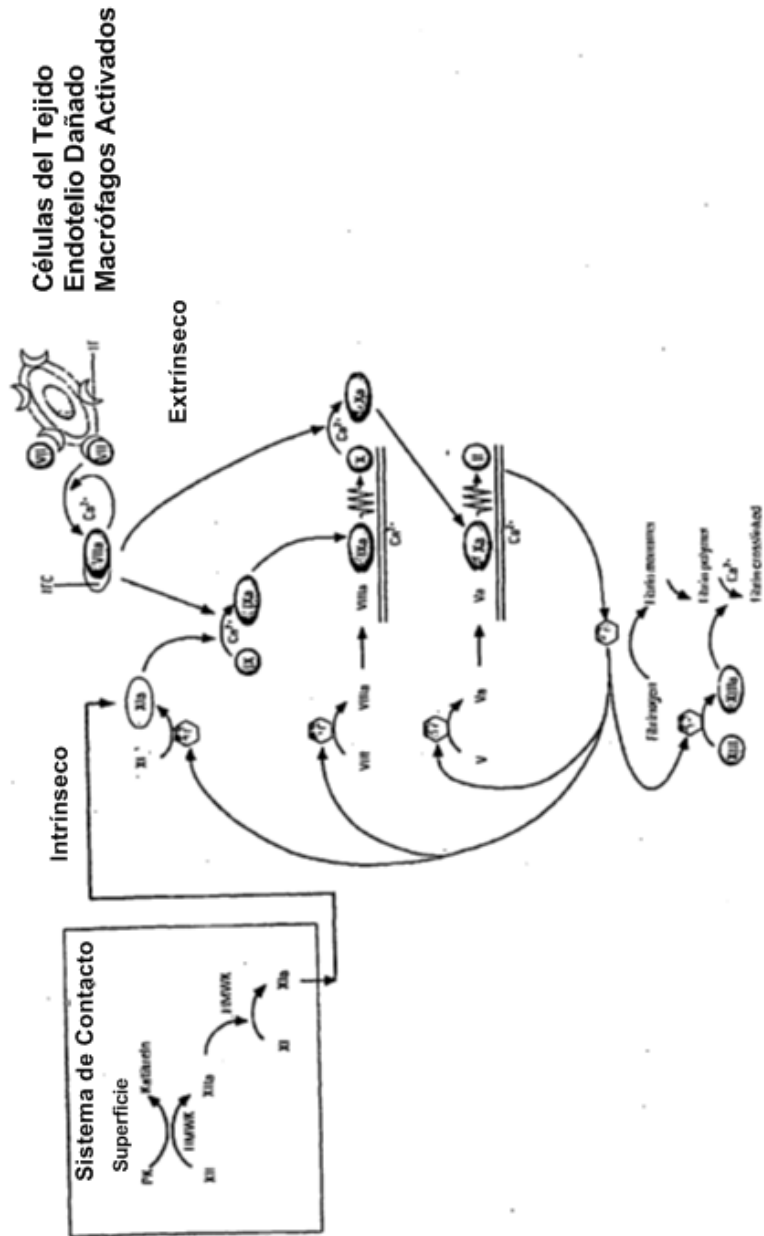


## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde dicha proteína quimérica comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina que es un socio de unión FcRn, un factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste de análogos del Factor VII, Factor VIIa, y Factor VII o Factor VIIa que tiene por lo menos 70% de identidad para la porción del Factor VII del polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 4, y opcionalmente por lo menos un ligador, en donde dicha composición farmacéutica es para uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno hemostático o una hemorragia aguda.
- 10 2. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que reduce el riesgo de incurrir en una hemorragia, infección, u oclusión del sitio de inyección asociado con una administración parenteral.
3. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene una semivida de suero incrementada o biodisponibilidad.
- 15 4. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que se va a administrar intravenosamente, subcutáneamente, intramuscularmente, oralmente, sublingualmente, bucalmente, nasalmente, rectalmente, vaginalmente, por medio de una ruta pulmonar, o por medio de una superficie de mucosa.
5. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se va a administrar en una dosis de 0.1 - 1000 µg/kg.
6. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina comprende un fragmento Fc.
- 20 7. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el fragmento Fc comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos 80% de identidad con la SEQ ID NO: 2.
- 25 8. Una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde dicha proteína quimérica comprende una proteína que es un análogo del Factor VII o Factor VIIa que tiene por lo menos 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1, en donde dicha composición farmacéutica es para uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno hemostático o un trastorno hemorrágico agudo.
9. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha proteína quimérica es un dímero.
- 30 10. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho dímero es un homodímero.
11. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha proteína quimérica es un híbrido de monómero dímero.
12. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína quimérica comprende la Fórmula
- 35 X-L-F
- en donde F es un fragmento Fc de una inmunoglobulina y L es un ligador o un enlace directo, y X se selecciona del grupo que consiste de análogos del Factor VII, Factor VIIa, y Factor VII o Factor VIIa que tiene por lo menos 70% de identidad para la porción del Factor VII del polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 4.
- 40 13. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha proteína quimérica comprende un ligador y dicho ligador comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 20 aminoácidos.
14. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde dicha proteína quimérica comprende un ligador y en donde dicho ligador comprende la secuencia (GGG)<sub>n</sub> o (GGGG)<sub>n</sub>, en donde n es un entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 10.

- 5 15. Una proteína quimérica que comprende: (i) por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina que es un socio de unión FcRn; (ii) un factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste de análogos del Factor VII, Factor VIIa, y Factor VII o Factor VIIa que tiene por lo menos 70% de identidad para la porción del Factor VII del polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 4; y opcionalmente (iii) por lo menos un ligador, para uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno hemostático o un trastorno hemorrágico agudo.
16. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 12, o la proteína quimérica para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dichos análogos del Factor VII o Factor VIIa tienen por lo menos 85% de identidad para la porción del Factor VII del polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 4.
- 10 17. La composición farmacéutica o la proteína quimérica para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dichos análogos del Factor VII o Factor VIIa tienen por lo menos 95% de identidad para la porción del Factor VII del polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 4.
18. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, 16 o 17, o la proteína quimérica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde el trastorno hemostático es hemofilia A o hemofilia B.
- 15 19. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, 16 o 17, o la proteína quimérica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde el trastorno hemostático se caracteriza por una tendencia espontánea a hemorragia o como un resultado de trauma, o en donde el trastorno hemorrágico agudo que resulta del trauma.
- 20 20. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o 16 a 19, o la proteína quimérica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-19, en donde la prevención o el tratamiento del trastorno hemostático o la hemorragia aguda comprende administrar la composición farmacéutica o la proteína quimérica, y administrar por lo menos un otro factor de coagulación o agente hemostático.

Fig. 1



# Factor VIIa/Fc

Fig. 2



Fig. 3A

ala asn ala phe leu leu glu glu leu arg pro gly ser leu  
 glu arg glu cys lys glu glu gln cys ser phe glu glu glu  
 ala arg glu ile phe lys asp ala glu arg thr lys leu phe  
 trp ile ser tyr ser ser asp gly asp gln cys ala ser ser  
 pro cys gln asn gly gly ser cys lys asp gln leu leu gln  
 ser tyr ile cys phe cys leu pro ala phe glu gly arg asn  
 cys glu thr his lys lys asp asp gln leu ile cys val asn  
 glu asn gly gly cys glu gln tyr cys ser asp his his thr  
 gly thr lys arg ser cys arg cys his glu gly tyr ser leu  
 leu ala asp gly val val ser cys thr pro thr val glu tyr  
 pro cys gly lys ile pro ile leu glu lys arg asn asn ala  
 ser lys pro gln gly arg ile val gly gly lys val cys pro  
 lys gly glu cys pro pro trp gln val leu leu leu val asn  
 gly ala gln leu cys gly gly thr leu ile asn thr thr ile  
 trp val val ser ala ala his cys phe asp lys ile lys asn  
 trp arg asn leu ile ile ala val leu gly glu his asp leu  
 ser glu his asp gly asp glu gln ser arg arg val val ala  
 gln val ile ile pro ser thr tyr val pro gly thr thr asn  
 his asp ile ala leu leu leu arg leu his gln pro val val

leu thr asp his val val pro leu cys leu pro glu glu arg  
thr phe ser glu arg thr leu ala phe val arg phe ser leu  
val ser gly trp gly gly gln leu leu asp arg gly ala thr  
ala leu glu leu met val leu asn val pro arg leu leu met  
thr gln asp cys leu gln gln ser arg lys val gly asp ser  
pro asn ile thr glu glu tyr met phe cys ala gly tyr ser  
asp gly ser lys asp ser cys lys gly asp ser gly gly gly  
pro his ala thr his tyr arg gly thr trp tyr leu thr gly  
ile val ser trp gly gly gln gly cys ala thr val gly his  
phe gly val tyr thr arg val ser gln tyr ile glu glu trp  
leu gln lys leu met arg ser glu pro arg pro gly val leu  
leu arg ala pro phe phe pro asp lys thr his thr cys pro  
pro cys pro ala pro glu leu leu gly gly pro ser ser val  
phe leu phe pro pro lys pro lys asp thr leu met ile ser  
arg thr pro glu val val thr cys val val val asp val ser  
his glu asp pro glu val lys phe asn trp tyr val val asp  
gly val glu val his asn ala lys thr lys pro arg glu glu  
gln tyr asn ser thr thr tyr arg val val ser val leu thr  
val leu his gln asp trp leu asn gly lys glu tyr tyr lys  
cys lys val ser asn lys ala leu pro ala pro ile glu lys

thr ile ser lys ala ala lys gly gln pro arg glu pro gln  
val tyr thr leu pro pro ser arg asp glu leu thr thr lys  
asn gln val ser leu thr cys leu val lys gly phe tyr pro  
ser asp ile ala val val glu trp glu ser asn gly gln pro  
glu asn asn tyr lys thr thr pro val leu asp asp ser asp  
gly ser phe phe leu tyr ser lys leu thr val asp lys ser  
arg trp gln gln gln gly asn val phe ser cys ser val met  
his glu ala leu his asn his tyr thr gln lys lys ser leu  
ser leu ser pro gly lys (SEQ ID NO:1)

Fig. 3B

phe pro asp lys thr his thr cys pro pro cys pro ala pro  
glu leu leu gly gly pro ser ser val phe leu phe pro pro  
lys pro lys asp thr leu met ile ser arg thr pro glu val  
val thr cys val val val asp val ser his glu asp pro glu  
val lys phe asn trp tyr val val asp gly val glu val his  
asn ala lys thr lys pro arg glu glu gln tyr asn ser thr  
thr tyr arg val val ser val leu thr val leu his gln asp  
trp leu asn gly lys glu tyr tyr lys cys lys val ser asn  
lys ala leu pro ala pro ile glu lys thr ile ser lys ala  
ala lys gly gln pro arg glu pro gln val tyr thr leu pro  
pro ser arg asp glu leu thr thr lys asn gln val ser leu  
thr cys leu val lys gly phe tyr pro ser asp ile ala val  
val glu trp glu ser asn gly gln pro glu asn asn tyr lys  
thr thr pro val leu asp asp ser asp gly ser phe phe leu  
tyr ser lys leu thr val asp lys ser arg trp gln gln gln  
gly asn val phe ser cys ser val met his glu ala leu his  
asn his tyr thr gln lys lys ser leu ser leu ser pro gly  
lys (SEQ ID NO:2)



Fig. 3C

gacaaaactcacacgtgcccggcgtgcccagctccggaactgctgggaggaccgt  
cagtcttcctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctccggacccc  
tgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggccaagttc  
aactggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgccaagacaaagccgaggagg  
agcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccagga  
ctggctgaatggcaaggagtacaatgtcaaggctccaacaagcccctcccagc  
ccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtg  
tacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggctcagcctgacct  
gcctggtcaaaggcttctatcccagcgcacatcgccgtggagtgggagagcaatgg  
gcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgttgactccgacggctcc  
ttcttctctacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacg  
tcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagag  
cctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:3)

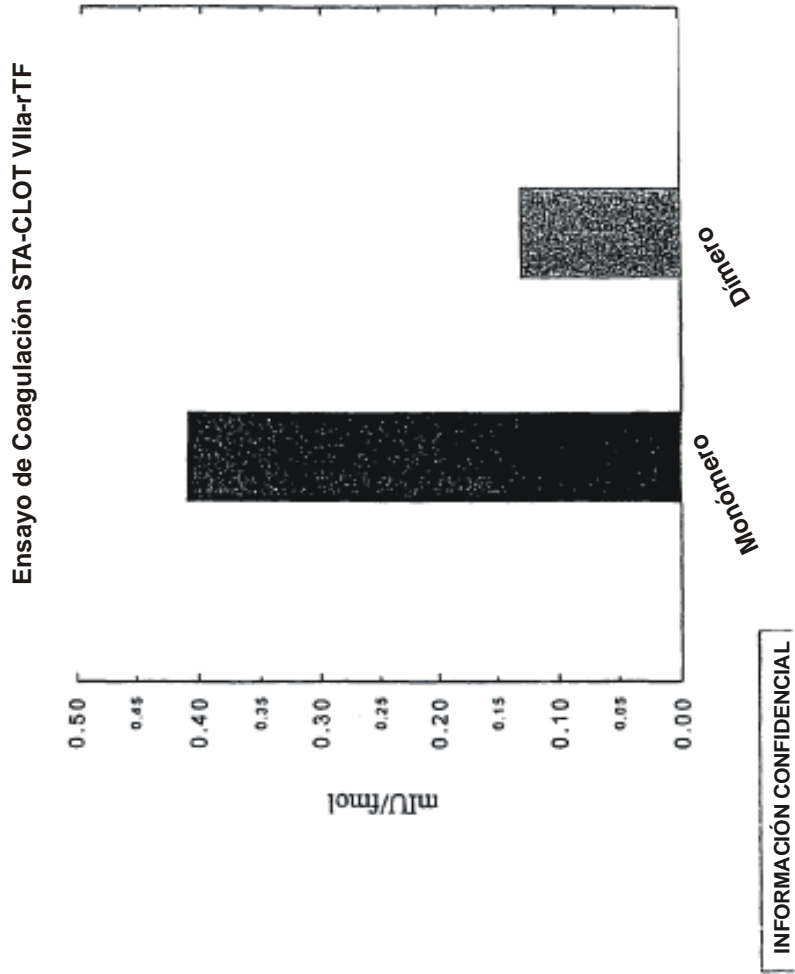
Fig. 3D

gccaacgcggtcctggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcaagg  
aggagcagtgctccttcgaggaggcccgggagatcttcaaggacgcggagaggac  
gaagctgttctggatttcttacagtgatggggaccagtgctgcctcaagtccatgc  
cagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttctgcctcc  
ctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgt  
gaacgagaacggcggctgtgagcagtgactgcagtgaccacacgggcaccaagcgc  
tcctgtcggtgccacgaggggtactctctgctggcagacgggggtgctcctgcacac  
ccacagttgaatatccatgtggaaaaatacctattctagaaaaaagaaatgccag  
caaacccaaggccgaattgtggggggcaagggtgtgccccaaaggggagtgtcca  
tggcaggtcctgttgttggtgaatggagctcagttgtgtggggggaccctgatca  
acaccatctgggtggtctccgcggcccactgttctgacaaaatcaagaactggag  
gaacctgatcgcggtgctgggagcagcagcctcagcagcagcagcggggatgag  
cagagccggcgggtggcgcaggtcatcatccccagcagctacgtcccgggcacca  
ccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtgggtcctcactgacca  
tgtggtgcccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttc  
gtgcgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctggaccgtggcgcacagg  
ccctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgaccaggactgcctgca  
gcagtcacggaaggtgggagactcccaaatatcacggagtacatgttctgtgcc  
ggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtgaggggccacatg

ccaccactaccggggcacgtggtacctgacgggcatcgtcagctggggccaggg  
ctgcgcaaccgtgggccactttgggggtgtacaccaggggtctcccagtaacatcgag  
tggtgcaaaagctcatgcgctcagagccacgcccaggagtcctcctgcgagccc  
catttcccgacaaaactcacacgtgcccgcctgtgccagctccggaactgctggg  
cggaccgtcagttctctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcc  
cggaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagaccctgagg  
tcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagcc  
gcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacctcctg  
caccaggactggctgaatggcaaggagtacaatgtcaaggtctccaacaagccc  
ctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagAAC  
cacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcag  
cctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggag  
agcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgttgactccg  
acggctccttcttctctacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagca  
ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg  
cagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:4)

Actividad de Coagulación de Proteínas FVIIa-Fc

Fig. 4



5

### Unión del Facto Villa-Fc a shFcRn

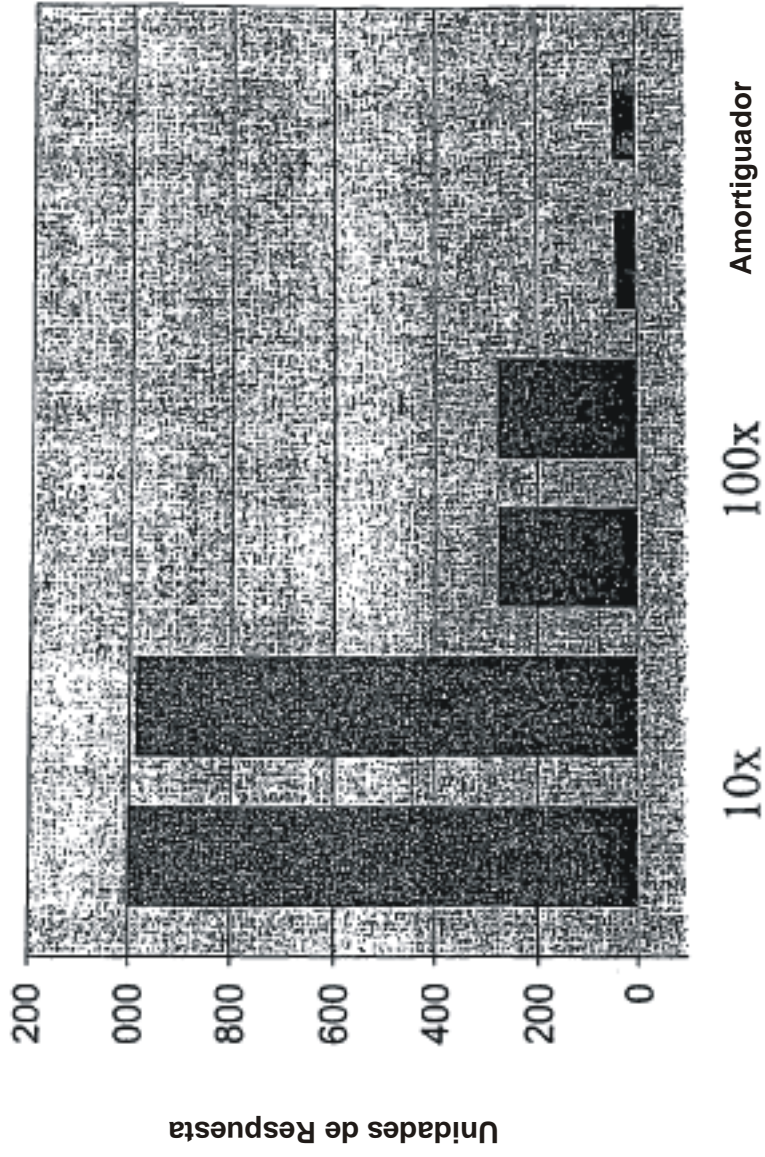


Fig. 5

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



Fig. 6

Captación oral de FVII-Fc:Fc en Ratas Neonatas

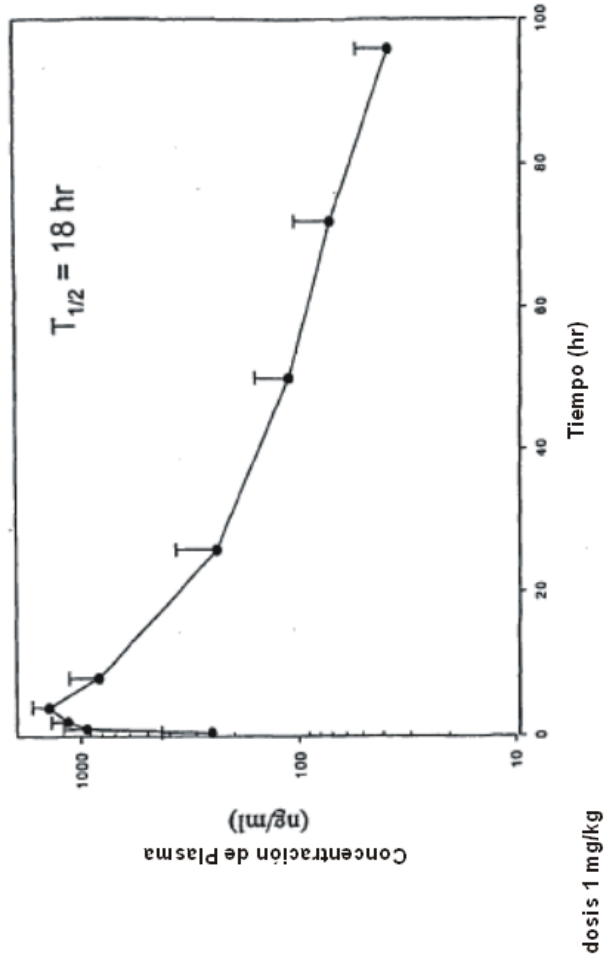
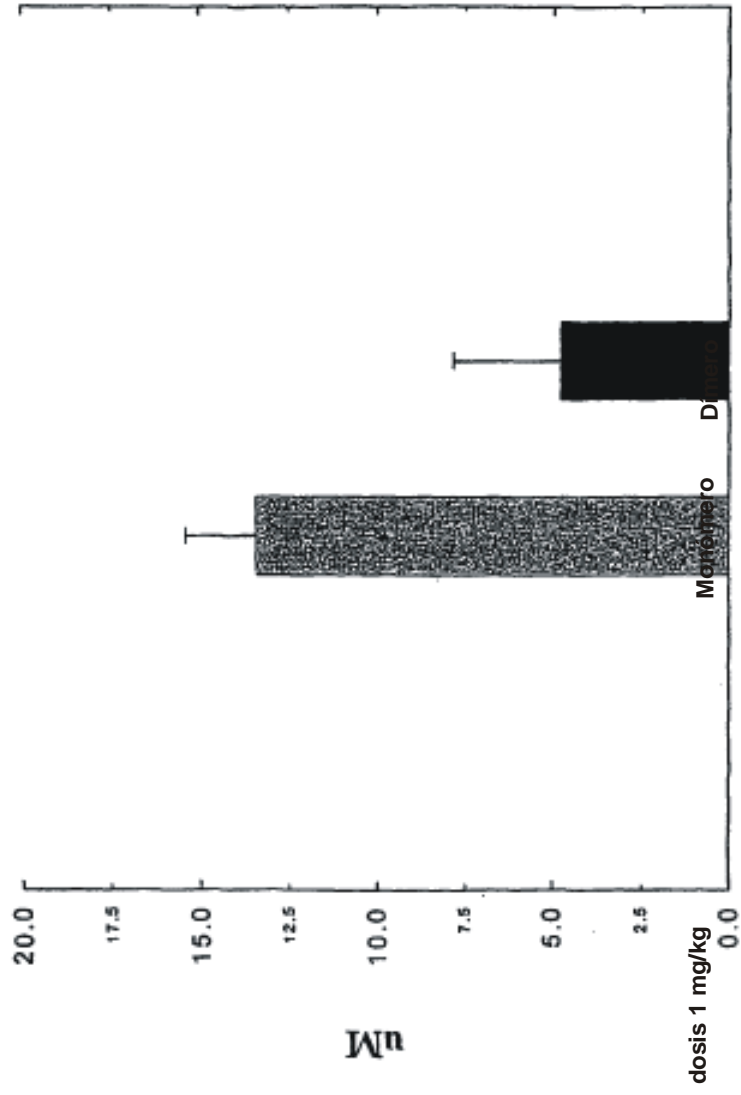


Fig. 7

Captación oral de Elisa FVII:Ag en Ratas Neonatas



PK intravenoso de FVIIaFc:Fc en Minicerdos

Fig. 8A

Niveles de plasma

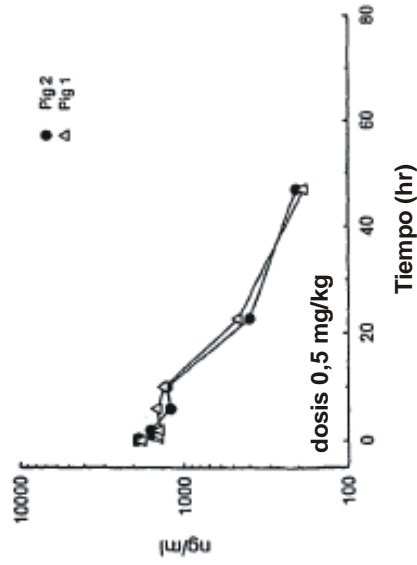


Fig. 8B

Actividad de Coagulación

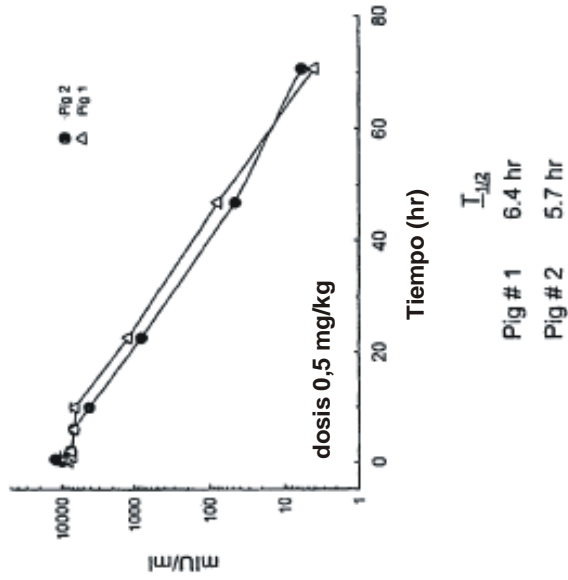




Fig. 9a

Secuencia de aminoácido del Factor IX-Fc  
(péptido señal subrayado, propéptido en negrilla)

```

1  MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSABCTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG
51  KLEFPVQGNL ERECMEEKCS FEAREVPEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN
101 PCLNGGSKD DINSYECWCP FGFEGKNCEL DVTCNIKNGR CEQFCKNSAD
151 NKVVCSTEG YRLAENQKSC EPAVPPFCGR VSVSQTSLT RAETVFPDVD
201 YVNSTEAEI LDNITQSTQS FNDPTRVVG EDAPGQPPW QVVLNGKVDA
251 FCGGSIVNEK WIVTAAHCV EGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRVIRII
301 PHHNYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIADKE YTNIFLKFGS
351 GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMPCAGFH
401 EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMK GK YGIYTKVSR Y
451 VNWIKKTKL TEPAGAAVD KTHTCP CPA PELLGGPSVF LFPKPKDTL
501 MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
551 VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
601 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQOPENNY KTTPLVLDSD
651 GSFFLYSKLT VDKSRWQGN VFSCSV MHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
    
```

Fig. 9B

Secuencia de nucleótido del factor IX-Fc  
(péptido señal subrayado, propéptido en negrilla)

```

atgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccagccctcatcaccatctgccttttaggat
atctactcagtgctgaatgtacagttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcg
gccaaagaggtataattcaggtaaattggaagagttgttcaagggaaaccttgagagagaatgt
atggaagaaaagtgtagtttgaagaagcagcagaagttttgaaaacactgaaagaacaactg
aatttggaagcagtgatgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaatggcggcag
ttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtcccttggatttgaaggaagaactgt
gaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtgctg
ataacaaggtggtttgcctgtactgagggatcgacttgcagaaaaccagaagtcctgtga
accagcagtgccatttccatgtggaagagtttctgtttcacaaaacttctaagctcaccctgtct
gagactgttttctgatgtggactatgtaaatctactgaagctgaaaccattttggataaca
tcactcaaagcacccaatcatttaatgacttcactcgggttgttggaggagaagatgccaaacc
aggtcaattccctggcaggtgttttgaatggtaaagttgatgcattctgtggaggctctatc
gttaatgaaaaatggattgtaactgctgccactgtgttgaaactgggtgttaaaattacagttg
tcgcaggtgaacataaatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgatcgaat
tattcctcaccacaactacaatgcagctattaataagtacaacctgacattgccctctcggaa
ctggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacacctatttgcattgctgacaaggaataca
cgaacatcttctcaaatttggatctggctatgtaagtggctggggaagagctctccacaaagg
gagatcagcttagttctcagtagcttagagttccactgttgaccgagccacatgtctcga
tctacaaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagatt
catgtcaaggagatagtgggggaccctcatgtactgaagtggaaagggaccagtttcttaactgg
aattattagctggggtgaagaggtgcaatgaaaggcaaatatggaatatataccaaggtatcc
cggtatgtcaactggattaaggaaaaaacaagctcactgaattcgccggcgccgctgcgggtcg
    
```

acaaaactcacacatgccacccgtgccagcaacctgaactcctggggggaccgtcagtcttct  
cttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggacccctgaggtcacatgctgggtg  
gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacgctggaggtg  
ataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgggtcagcctct  
cacgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagc  
ctcccagecccccacgagaaaaccatctccaaageccaaagggcagccccgagaaccacaggtg  
acacctgccccatcccggtatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaa  
aggctctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaadaactac  
aagaccacgcctccgtgttgactccgacggctcttcttctctacagcaagetcacctgg  
acaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaa  
ccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatga