

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 558**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2007** **E 07726010 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014** **EP 2032607**

54 Título: **Proteína de fusión que se puede escindir proteolíticamente que comprende un factor de coagulación sanguínea**

30 Prioridad:

14.06.2006 EP 06012262

11.07.2006 US 819620 P

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

16.06.2014

73 Titular/es:

CSL BEHRING GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE

72 Inventor/es:

METZNER, HUBERT;
WEIMER, THOMAS y
SCHULTE, STEFAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 468 558 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

Proteína de fusión que se puede escindir proteolíticamente que comprende un factor de coagulación sanguínea

Introducción

La presente invención se refiere al campo de las proteínas de fusión terapéuticas, modificadas con una semivida incrementada en comparación con sus polipéptidos terapéuticos parentales no modificados. La invención se refiere específicamente a factores de coagulación fusionados con polipéptidos que alargan la semivida (HLEPs), que están conectados por péptidos enlazadores que se pueden escindir proteolíticamente, de modo que el péptido enlazador escindible intercalado se introduce entre el factor de coagulación y el polipéptido que alarga la semivida. La escisión de tales enlazadores libera el polipéptido terapéutico de cualquier impedimento estérico que afecta a la actividad, causado por el HLEP y por lo tanto permite la generación de proteínas de fusión que conservan una actividad específica molar elevada del factor de coagulación. En caso de que las proteínas de fusión terapéuticas sean zimógenos, se prefieren especialmente los enlazadores que liberan el polipéptido terapéutico esencialmente de forma simultánea con su activación *in vivo*, después de la exposición a la(s) proteasa(s) correspondiente(s).

La idea de la invención se demuestra, en particular, a través de polipéptidos humanos dependientes de la vitamina K, Factor IX, Factor VII y Factor VIIa, pero el concepto también se puede aplicar a otros factores de coagulación. Cualquier polipéptido que alarga la semivida (HLEP) puede estar conectado con el polipéptido terapéutico a través de un péptido enlazador escindible, pero la albúmina o inmunoglobulinas sin un dominio de unión a antígenos, como el fragmento Fc sin un dominio de unión a antígenos, son los HLEPs preferidos. La invención también se refiere a secuencias de ADNc que codifican los polipéptidos terapéuticos y a derivados de los mismos fusionados genéticamente con un ADNc que codifica HLEPs, tal como albúmina de suero humano ligada a oligonucleótidos que codifican enlazadores peptídicos escindibles intercalados. Tales derivados codificados muestran una mejora de las actividades específicas molares y de la semivida que se incrementan en comparación con sus homólogos no escindibles. La invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que contienen tales secuencias de ADNc, a células hospedadoras transformadas con tales vectores de expresión recombinantes, a polipéptidos recombinantes y a derivados que tienen actividades biológicas comparables a la del polipéptido terapéutico de tipo silvestre no modificado pero que tienen semividas mejoradas. La invención también se refiere a procedimientos para la preparación de tales proteínas recombinantes y sus derivados. La invención también incluye un vector de transferencia para uso en terapia génica humana, que comprende tales secuencias de ADN modificadas, útiles para incrementar la semivida *in vivo*.

Antecedentes de la invención

Varios polipéptidos terapéuticos recombinantes están disponibles comercialmente para uso terapéutico y profiláctico en los seres humanos. Los pacientes se benefician en general del modo específico de acción de los ingredientes activos recombinantes, pero una desventaja es frecuentemente su limitada disponibilidad debido a sus procedimientos de preparación costosos y complejos. Una reducción de la dosis requerida o de la frecuencia de administración de tales productos, podría mejorar esta situación. Una frecuencia de administración reducida podría mejorar la comodidad del paciente y, por lo tanto, también la aceptación de la terapia. Se han descrito diversas soluciones para lograr el objetivo de una semivida *in vivo* más larga después de la administración. Las soluciones propuestas recientemente incluyen la formación de proteínas de fusión, especialmente en el caso de polipéptidos con una semivida corta *in vivo* que se puede alargar significativamente mediante la fusión con un HLEP.

Ballance et al. (documento WO 01/79271) describen polipéptidos de fusión de una multitud de diferentes polipéptidos terapéuticos que, cuando se fusionan con la albúmina de suero humano, se prevé que tengan una semivida funcional incrementada *in vivo* y una vida útil prolongada. Se han descrito largas listas de posibles ligandos de la fusión sin que los datos experimentales muestren para casi ninguno de estos polipéptidos que las proteínas de fusión de albúmina respectivas, realmente conservan la actividad biológica y tienen propiedades mejoradas. Entre la lista de polipéptidos terapéuticos mencionados como Ejemplos están el Factor IX y FVII/FVIIa. También se describen las fusiones de FIX y de FVII/FVIIa en las que hay un enlazador peptídico entre la albúmina y FIX o FVII/FVIIa. Sin embargo, no se sugiere el uso de péptidos enlazadores escindibles.

Sheffield et al. (Sheffield W.P. et al. (2004), Br. J. Haematol. 126: 565-573) expresaron una proteína de fusión de albúmina y Factor IX murino, compuesta de FIX murino, un enlazador de 8 aminoácidos (GPG₄TM), albúmina murina y un marcador peptídico de 22 aminoácidos, y también una proteína de fusión de albúmina y Factor IX humano compuesta de Factor IX humano, un enlazador de 7 aminoácidos (G₆V) y albúmina humana. Empleando un ensayo de coagulación de una sola etapa, dependiente de FIX, las actividades específicas molares de la proteína de fusión FIX-albúmina murina (MFUST) y la proteína de fusión FIX-albúmina humana (HFUS) eran al menos de dos a tres veces menores que las de sus homólogos no fusionados, un efecto atribuido, al menos parcialmente a un proceso de activación proteolítica más lenta mediante FXIa. Sheffield no utilizó ni sugirió el uso de un enlazador escindible entre FIX y la albúmina.

Varias solicitudes de patente describen la fusión de polipéptidos terapéuticos con regiones constantes de inmunoglobulinas para extender la semivida *in vivo* del polipéptido terapéutico. Los documentos WO 2002/04598, WO

2003/059935, WO 2004/081053, WO 2004/101740 y WO 2005/001025 incluyen FIX como ejemplo del resto de polipéptido terapéutico. Las dos últimas solicitudes de patentes también describen FVII/FVIIa fusionados con regiones constantes de inmunoglobulinas y se observó que los homodímeros de proteínas de fusión tienen una actividad de coagulación inferior, en comparación con proteínas de fusión que consistían en un monómero/dímero. Una vez más, no se sugiere el uso de péptidos enlazadores escindibles.

En el documento WO 91/09125 se describen proteínas de fusión que se unen a través de enlazadores que son escindibles con proteasas de la cascada de la coagulación sanguínea, pero las proteínas de fusión se limitan a las que comprenden proteínas fibrinolíticas o antitrombóticas.

En el documento WO 03/068934 se describen moléculas quiméricas que se componen de al menos una primera molécula de componente, al menos un enlazador y al menos una segunda molécula, en donde el enlazador comprende un sitio de escisión enzimática para producir una unión de origen no natural y un sitio de escisión entre la primera y la segunda molécula de componente y en donde, después de la escisión de la molécula quimérica en el sitio de escisión, al menos una de las moléculas de componente es funcionalmente activa. Las proteasas que escinden pueden ser factores de coagulación, como la trombina. Las moléculas de componente descritas son entre muchas otras FIX y FVIIa. Sin embargo, las proteínas de fusión terapéuticas de la presente invención no se describen, ni se describen propiedades mejoradas de las proteínas de fusión terapéuticas de la presente invención, tales como el aumento de la actividad específica molar, el aumento de las tasas de inactivación y/o eliminación en comparación con la proteína terapéutica sin enlazadores escindibles.

Descripción de la invención

Existe una gran necesidad médica de factores de coagulación que tengan una semivida larga. En la técnica anterior se han sugerido fusiones de factores de coagulación con polipéptidos que alargan la semivida, para lograr este objetivo. Sin embargo, una vez que un factor de coagulación se activa durante la coagulación, ya sea mediante escisión proteolítica del zimógeno (como FIX) o por contacto de un factor que ya está proteolíticamente "pre"-activado con un segundo polipéptido (como FVIIa que se une al factor tisular), ya no es deseable mantener la larga semivida del factor de coagulación que está ahora activado, ya que esto podría dar lugar a complicaciones trombóticas, como ya es el caso para un factor de coagulación de tipo silvestre, tal como FVIIa (Aledort L.M., J Thromb Haemost 2(10): 1700-1708 (2004)) y debe ser aún más relevante si el factor activado tuviera una semivida incrementada. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar factores de coagulación de larga vida, que después de la activación o después de la disponibilidad de un cofactor, tienen una semivida comparable a la de un factor de coagulación sin modificar.

Las fusiones de los factores de coagulación con polipéptidos que alargan la semivida, tal como se describen en la técnica anterior y como también se muestran, en el ejemplo 6 y 7, tienen en general una actividad específica molar reducida del factor de coagulación fusionado. Otro aspecto de la presente invención es proporcionar factores de coagulación con una semivida mejorada, que muestran una mayor actividad específica molar en comparación con la proteína de fusión terapéutica correspondiente sin un enlazador escindible.

La invención es, por tanto, sobre proteínas de fusión terapéuticas que comprenden

- a) un factor de coagulación, sus variantes o derivados,
- b) un polipéptido que alarga la semivida seleccionado entre el grupo que consiste en albúmina, incluyendo variantes y derivados de la misma, polipéptidos de la familia de la albúmina incluyendo variantes y derivados de los mismos e inmunoglobulinas sin el domino de unión a antígenos y
- c) un enlazador peptídico que une el factor de coagulación y el polipéptido que alarga la semivida; de modo que el enlazador peptídico escindible intercalado se introduce entre el factor de coagulación y el polipéptido que alarga la semivida

en donde el enlazador peptídico se puede escindir con proteasas implicadas en la coagulación o activadas por enzimas de la coagulación y la proteína de fusión terapéutica tiene, en comparación con la proteína de fusión terapéutica respectiva unida a un enlazador no escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGGV,

un aumento de la actividad específica molar en al menos un ensayo relacionado con la coagulación y la actividad específica molar se incrementa en al menos el 100%.

Como consecuencia del enlazador escindible, después de la escisión del enlazador peptídico en un modo relacionado con la coagulación, el comportamiento del factor de coagulación se parece más al comportamiento del factor natural, sin fusión y no muestra un aumento de la semivida del factor activo con efectos potencialmente protrombóticos.

La escisión proteolítica en un modo relacionado con la coagulación, en el sentido de la invención, es cualquier escisión proteolítica que se produce como consecuencia de la activación de al menos un factor de coagulación o un cofactor de la coagulación.

La expresión "factor de coagulación activado después de que el enlazador peptídico es escindido proteolíticamente en un modo relacionado con la coagulación", en el sentido de la invención significa que el factor de coagulación se activa ya sea casi de forma paralela a la escisión proteolítica del péptido enlazador, o que el factor de coagulación ya estaba activado antes de la escisión proteolítica del péptido enlazador. La activación se puede producir, por ejemplo, mediante escisión proteolítica del factor de coagulación o mediante la unión a un cofactor.

Los factores de coagulación preferidos son factores de coagulación dependientes de la vitamina K y fragmentos y variantes de los mismos. Incluso más preferidos son FVIIa y FIX y fragmentos y variantes de los mismos.

Los HLEPs preferidos son albúmina y fragmentos o variantes de la misma e inmunoglobulinas sin el dominio que se une a antígenos.

La región del enlazador en una realización preferida comprende una secuencia del polipéptido terapéutico que se va a administrar o una variante de la misma, que debería dar como resultado una disminución del riesgo de propiedades neoantigénicas (formación de un nuevo epítipo potencialmente inmunogénico debido a la presencia de un péptido dentro del antígeno terapéutico que no existe en las proteínas humanas) de la proteína de fusión expresada. También en el caso de que la proteína terapéutica sea un zimógeno (por ejemplo, que requiere ser activado proteolíticamente), la cinética de la escisión del péptido enlazador reflejará más estrechamente la cinética de activación del zimógeno relacionada con la coagulación. Por lo tanto, en tales realizaciones preferidas, un zimógeno y un enlazador correspondiente se activan y se escinden respectivamente, con cinéticas comparables. Por esta razón, la presente invención también se refiere particularmente a proteínas de fusión de un zimógeno y un HLEP, en donde la cinética de la escisión del enlazador con proteasas relevantes no se retrasa en más del triple, y lo más preferiblemente no más del doble, en comparación con la cinética de activación del zimógeno.

En una realización adicional, el péptido enlazador comprende sitios de escisión para más de una proteasa. Esto se puede lograr ya sea mediante un péptido enlazador que se puede escindir en la misma posición con diferentes proteasas o mediante un péptido enlazador que proporciona dos o más sitios de escisión diferentes. Estas pueden ser circunstancias ventajosas en donde la proteína de fusión terapéutica se debe activar mediante escisión proteolítica para lograr una actividad enzimática y en donde diferentes proteasas pueden contribuir a esta etapa de activación. Este es el caso, por ejemplo, después de la activación de FIX, que, o bien se puede lograr a través de FXIa o de FVIIa/Factor Tisular (TF).

Las realizaciones preferidas de la invención son proteínas de fusión terapéuticas en las que el enlazador se puede escindir con la proteasa, que activa el factor de coagulación, lo que garantiza que la escisión del enlazador esté ligada a la activación del factor de coagulación en un sitio en el que se produce la coagulación.

Otras proteínas de fusión terapéuticas preferidas de acuerdo con la invención son aquellas en las que el enlazador se puede escindir con el factor de coagulación una vez que se activa, el cual forma parte de la proteína de fusión terapéutica, asegurando de este modo también que la escisión de la proteína de fusión está conectada con un evento de coagulación.

Otras proteínas de fusión terapéuticas preferidas de acuerdo con la invención son aquellas en las que el enlazador se puede escindir con una proteasa, que a su vez se activa directa o indirectamente por la actividad del factor de coagulación que forma parte de la proteína de fusión terapéutica, asegurando de este modo también que la escisión de la proteína de fusión está conectada con un evento de coagulación.

Una clase de las proteínas de fusión terapéuticas más preferidas es aquella en la que el enlazador se puede escindir con FXIa y/o con FVIIa/TF y el factor de coagulación es FIX.

El punto esencial de la invención se demuestra, en particular, con el polipéptido Factor IX dependiente de la vitamina K, los enlazadores escindibles y albúmina como HLEP, así como su secuencia de ADNc correspondiente. La invención también se refiere a secuencias de ADNc que codifican cualquier otro factor de coagulación que se puede activar proteolíticamente o que está implicado en la activación de otros zimógenos o polipéptidos. Estos ADNc se fusionan genéticamente con secuencias de ADNc que codifican albúmina de suero humano u otros HLEPs, y están unidos con oligonucleótidos que codifican enlazadores peptídicos escindibles, intercalados. Las proteínas de fusión terapéuticas expresadas muestran actividades específicas molares que se incrementan en comparación con sus homólogas no escindibles. La invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que contienen tales secuencias de ADNc fusionadas, células hospedadoras transformadas con tales vectores de expresión recombinantes, proteínas de fusión terapéuticas recombinantes y derivados que tienen actividades biológicas casi comparables a las de los polipéptidos terapéuticos no modificados de tipo silvestre, pero que tienen una semivida mejorada *in vivo*. La invención también se refiere a procedimientos para la preparación de tales polipéptidos recombinantes y de sus derivados. La invención también incluye un vector de transferencia para uso en terapia génica humana, que comprende tales secuencias de ADN modificadas, útiles para aumentar los niveles de productos *in vivo*.

Las proteínas de fusión terapéuticas preferidas de acuerdo con la invención son aquellas que tienen una actividad específica molar, en particular una actividad específica molar en al menos un ensayo relacionados con la coagulación, que se ha incrementado al menos un 100% en comparación con la de la proteína de fusión terapéutica sin un enlazador escindible.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos dependientes de vitamina K

Los polipéptidos dependientes de vitamina K como un grupo de los polipéptidos terapéuticos, son polipéptidos que están γ -carboxilados enzimáticamente en el hígado usando la vitamina K como cofactor. Tales polipéptidos dependientes de la vitamina K son, por ejemplo, los Factores II, VII, IX, X, la proteína C, la proteína S, GAS6 y la proteína Z.

FIX humano

El FIX humano, uno de los miembros del grupo de polipéptidos dependientes de vitamina K, es una glicoproteína de cadena sencilla con un peso molecular de 57 kDa, que es secretada por las células hepáticas al torrente circulatorio como un zimógeno inactivo de 415 aminoácidos. Contiene 12 residuos de ácido γ -carboxi-glutámico localizados en el dominio Gla N-terminal del polipéptido. Los residuos Gla requieren vitamina K para su biosíntesis. Después del dominio Gla hay dos dominios del factor de crecimiento epidérmico, un péptido de activación y un dominio de proteasa de serina de tipo tripsina. Otras modificaciones postraduccionales de FIX incluyen la hidroxilación (Asp 64), N-(Asn157 y Asn167) así como la glicosilación de tipo O (Ser53, Ser61, Thr159, Thr169 y Thr172), sulfatación (Tyr155) y fosforilación (Ser158).

FIX es convertido a su forma activa, Factor IXa, mediante proteólisis del péptido de activación en Arg145-Ala146 y Arg180-Val181 lo que conduce a la formación de dos cadenas de polipéptidos, una cadena ligera N-terminal (18 kDa) y una cadena pesada C-terminal (28 kDa), que se mantienen unidas por un puente disulfuro. La escisión activadora del Factor IX se puede conseguir *in vitro*, por ejemplo, con el Factor XIa o el Factor VIIa/TF. El Factor IX está presente en el plasma humano en una concentración de 5-10 μ g/ml. La semivida plasmática terminal del Factor IX en seres humanos se encontró que era de aproximadamente 15 a 18 horas (White GC et al. 1997. Recombinant factor IX. Thromb. Haemost. 78: 261-265; Ewenstein BM y col. 2002. Pharmacokinetic analysis of plasma-derived and recombinant F IX concentrates in previously treated patients with moderate or severe hemophilia B. Transfusion 42:190-197).

La hemofilia B está causada por un Factor IX no funcional o ausente y se trata con concentrados de Factor IX procedentes del plasma o una forma recombinante del Factor IX. Como los pacientes con hemofilia B reciben con frecuencia al menos dos administraciones semanales profilácticas de Factor IX para evitar hemorragias espontáneas, es deseable aumentar los intervalos entre las administraciones, incrementando la semivida del producto de Factor IX aplicado. Una mejora en la semivida plasmática aportaría una ventaja significativa para el paciente. Hasta la fecha, no está disponible comercialmente ninguna preparación farmacéutica de un Factor IX con una semivida plasmática mejorada, ni se ha publicado ningún dato que muestre variantes de FIX con una semivida prolongada *in vivo* y una actividad específica molar casi inalterada en ensayos relacionados con la coagulación. Por lo tanto, todavía existe una gran necesidad médica de desarrollar formas del Factor IX que tengan una semivida funcional más larga *in vivo*.

Factor VII y Factor VIIa

El FVII es una glicoproteína de cadena sencilla con un peso molecular de 50 kDa, que es secretada por las células hepáticas en el torrente sanguíneo como un zimógeno inactivo de 406 aminoácidos. El FVII se convierte en su forma activa Factor VIIa, mediante proteólisis del enlace peptídico sencillo en Arg152-Ile153 lo que conduce a la formación de dos cadenas de polipéptidos, una cadena ligera N-terminal (24 kDa) y una cadena pesada C-terminal (28 kDa), que se mantienen unidas por un puente disulfuro. En contraste con otros factores de coagulación dependientes de vitamina K, no se escinde ningún péptido de activación durante la activación. La escisión para la activación del Factor VII se puede conseguir *in vitro*, por ejemplo, mediante el Factor Xa, Factor IXa, Factor VIIa, Factor XIIa, proteasa activadora del Factor siete (FSAP) y trombina. Mollerup et al. (Biotechnol. Bioeng. (1995) 48: 501-505) informaron de que algunas escisiones también se producen en la cadena pesada en Arg290 y/o Arg315.

El Factor VII está presente en el plasma en una concentración de 500 ng/ml. Aproximadamente 1% o 5 ng/ml del Factor VII están presentes como Factor VII activado. La semivida plasmática terminal del Factor VII se encontró que era de aproximadamente 4 horas y la del Factor VIIa de aproximadamente 2 horas.

A través de la administración de concentraciones suprafisiológicas de Factor VIIa se puede lograr una hemostasia evitando la necesidad de Factor VIIIa y Factor IXa. La clonación del ADNc del Factor VII (documento de EE.UU. 4.784.950) hizo posible desarrollar un Factor VII activado como un producto farmacéutico. El Factor VIIa se administró con éxito por primera vez en 1988. Desde entonces el número de indicaciones de Factor VIIa ha crecido de manera constante, mostrando un potencial para convertirse en un agente hemostático universal para detener el sangrado (Erhardtson, 2002). Sin embargo, la corta semivida terminal del Factor VIIa de aproximadamente 2 horas y la recuperación *in vivo* reducida, están limitando su aplicación. Por lo tanto, todavía existe una gran necesidad médica de desarrollar formas del Factor VIIa que tengan una semivida mejorada pero que, por el contrario, la actividad específica molar, la cinética de inactivación y/o la cinética de eliminación no se vean afectadas después del inicio de la coagulación.

Proteínas de fusión terapéuticas

"Proteínas de fusión terapéuticas" en el sentido de esta invención son factores de coagulación fusionados con un polipéptido que alarga la semivida que, después de la administración a un ser humano o a un animal, pueden producir un efecto profiláctico o terapéutico. Estas proteínas de fusión terapéuticas se pueden administrar a un ser humano o a un animal por una vía intravenosa, intramuscular, oral, tópica, parenteral o por otras vías. Las clases específicas de proteínas de fusión terapéuticas incluidas, es decir, en los ejemplos de esta invención, son factores de coagulación tales como, por ejemplo, polipéptidos dependientes de la vitamina K ligados a polipéptidos que alargan la semivida tales como, por ejemplo, albúmina e inmunoglobulinas sin dominio de unión a antígenos. La expresión "proteína de fusión terapéutica" se usa de forma intercambiable con "proteína de fusión".

Polipéptido que alarga la semivida (HLEP)

La albúmina, los miembros de la familia de la albúmina y las inmunoglobulinas y sus fragmentos o derivados se han descrito anteriormente como ejemplos de polipéptidos que alargan la semivida (HLEPs). Las expresiones "albúmina de suero humano" (HSA) y "albúmina humana" (HA) se utilizan indistintamente en esta solicitud. Los términos "albúmina" y "albúmina de suero" son más amplios, y abarcan la albúmina de suero humano (y fragmentos y variantes de la misma), así como la albúmina de otras especies (y fragmentos y variantes de la misma).

Tal como se utiliza en esta memoria, "albúmina" se refiere colectivamente a un polipéptido de albúmina o a una secuencia de aminoácidos, o a un fragmento de albúmina o una variante que tiene una o varias actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas) de la albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a la albúmina humana o a fragmentos de la misma, especialmente la forma madura de la albúmina humana, tal y como se muestra en SEQ ID NO: 1 en el presente documento, o la albúmina de otros vertebrados o fragmentos de la misma, o análogos o variantes de estas moléculas o fragmentos de las mismas.

La porción de albúmina de las proteínas de fusión de albúmina puede comprender la longitud completa de la secuencia de HA tal y como se ha descrito anteriormente, o puede incluir uno o varios fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica. Tales fragmentos pueden ser de 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de HA o pueden incluir parte o la totalidad de los dominios específicos de HA.

La porción de albúmina de las proteínas de fusión de albúmina de la invención puede ser una variante de HA normal, ya sea natural o artificial. La porción de polipéptido terapéutico de las proteínas de fusión de la invención también pueden ser variantes de los polipéptidos terapéuticos correspondiente tal y como se describen en el presente documento. El término "variantes" incluye inserciones, delecciones y sustituciones, ya sean conservadoras o no conservadoras, ya sean naturales o artificiales, en donde tales cambios no alteran sustancialmente el sitio activo, o el dominio activo que confiere las actividades terapéuticas de los polipéptidos terapéuticos.

En particular, las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden incluir variantes polimórficas de origen natural de albúmina humana y fragmentos de albúmina humana. La albúmina se puede obtener a partir de cualquier vertebrado, especialmente de cualquier mamífero, por ejemplo, ser humano, vaca, oveja o cerdo. Las albúminas de animales no mamíferos incluyen, pero sin limitación, gallina y salmón. La porción de albúmina del polipéptido enlazado con albúmina puede ser de un animal diferente que la porción de polipéptido terapéutico.

En términos generales, un fragmento o una variante de albúmina tendrá una longitud de al menos 10, preferiblemente al menos 40, más preferiblemente más de 70 aminoácidos. La variante de albúmina puede consistir preferentemente o comprender alternativamente al menos un dominio completo de albúmina o fragmentos de dichos dominios, por ejemplo, los dominios 1 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 1), 2 (aminoácidos 195-387 de SEQ ID NO: 1), 3 (aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 1), 1 + 2 (1-387 de SEQ ID NO: 1), 2 + 3 (195-585 de SEQ ID NO: 1) o 1 + 3 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 1 + aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 1). Cada dominio se compone de dos subdominios homólogos, a saber 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, con regiones enlazadoras flexibles entre los subdominios que comprenden los residuos Lys106 a Glu119, Glu292 a Val315 y Glu492 a Ala511.

La porción de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención puede comprender al menos un subdominio o un dominio de HA o modificaciones conservadoras de la misma.

Todos los fragmentos y variantes de la albúmina están abarcados por la invención como parejas de fusión de un factor de coagulación, siempre que conduzcan a una extensión de la semivida de la proteína de fusión terapéutica en el plasma de al menos 25%, en comparación con el factor de coagulación no fusionado.

Además de la albúmina, la alfa-fetoproteína, otro miembro de la familia de la albúmina, se ha reivindicado porque mejora la semivida de un polipéptido terapéutico fijado *in vivo* (documento WO 2005/024044). La familia de proteínas de la albúmina, proteínas de transporte en suero relacionadas evolutivamente, consiste en albúmina, alfa-fetoproteína (AFP; Beattie y Dugaiczky 1982. Gene 20:415-422), afamina (AFM; Lichenstein et al. 1994. J. Biol. Chem. 269:18149-18154) y proteína que se une a la vitamina D (DBP; Cooke & David 1985. J. Clin. Invest. 76:2420-2424). Sus genes representan una agrupación multigénica con similitudes estructurales y funcionales que se cartografían en la misma región cromosómica en los seres humanos, ratones y ratas. La similitud estructural de los miembros de la familia de la albúmina sugiere su posible utilidad como HLEPs. Por lo tanto, otro objeto de la invención es el uso de tales miembros de la familia de la albúmina, de fragmentos y variantes de la misma, como HLEPs.

El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, ya sea conservadoras o no conservadoras, siempre y cuando la función deseada esté todavía presente.

Los miembros de la familia de la albúmina pueden comprender la longitud completa de la proteína respectiva AFP, AFM y DBP, o pueden incluir uno o varios fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica. Tales fragmentos pueden tener una longitud de 10 o más aminoácidos o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50 o más aminoácidos contiguos de la secuencia proteica respectiva o pueden incluir parte o la totalidad de los dominios específicos de la proteína respectiva, siempre y cuando los fragmentos de HLEP proporcionen una extensión de la semivida de al menos un 25%, en comparación con el factor de coagulación no fusionado. Los miembros de la familia de la albúmina de las proteínas de fusión terapéuticas de la invención pueden incluir variantes polimórficas de origen natural de AFP, AFM y DBP.

IgG y fragmentos de IgG sin el dominio que se une a antígenos también se pueden usar como HLEPs, siempre y cuando los fragmentos de HLEPs proporcionen una extensión de la semivida de al menos un 25%, en comparación con el factor de coagulación no fusionado. La porción de polipéptido terapéutico está conectada a la IgG o a los fragmentos de IgG sin el dominio que se une a antígenos, a través de un enlazador escindible que permite actividades específicas molares elevadas de la proteína de fusión. Ejemplos de moléculas de fusión del factor VII/VIII y factor IX con IgG se encuentran, por ejemplo, en el documento WO 2005/001025 que se incorpora en esta memoria como referencia en su totalidad. Se describe un homodímero compuesto de dos moléculas de factor VII (factor VIIa) y dos moléculas Fc y un híbrido monómero/dímero compuesto de una molécula de FVII (FVIIa) y dos moléculas de Fc, mostrando el monómero/dímero una actividad de coagulación aproximadamente cuatro veces mayor que el homodímero. Una secuencia enlazadora de la presente que libera las moléculas de FVII (FVIIa) después de la escisión con una proteasa de la cascada de la coagulación como, por ejemplo, FXIa, FXa o FIXa, podría ser capaz de elevar la actividad coaguladora de las estructuras artificiales y en especial la del homodímero, hasta un nivel de actividad comparable al del monómero/dímero o incluso superior. Una proteína de fusión FIX-Fc con enlazador escindible se muestra a modo de ejemplo en SEQ ID NO 93. Enlazadores escindibles tales como los mostrados en la tabla 3a y 3b se pueden aplicar en este caso.

La invención se refiere específicamente a proteínas de fusión que comprenden enlazar un factor de coagulación o un fragmento o una variante del mismo con el extremo N-terminal o C-terminal de un HLEP o un fragmento o variante del mismo, de tal manera que un enlazador peptídico escindible intercalado se introduce entre el polipéptido terapéutico y el HLEP, de modo que la proteína de fusión formada tiene una semivida *in vivo* más larga, en comparación con el factor de coagulación que no se ha enlazado con un HLEP y de modo que la proteína de fusión tiene al menos una actividad específica molar 100% superior, en comparación con la proteína de fusión correspondiente con un enlazador no escindible en al menos uno de los diferentes ensayos relacionados con la coagulación disponibles.

"Factor de coagulación" tal como se utiliza en esta solicitud incluye, pero no se limita a, polipéptidos que consisten en el Factor IX, Factor VII, Factor VIII, Factor von Willebrand, Factor V, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, Factor I, Factor II (protrombina), Proteína C, Proteína S, GAS6 o Proteína Z, así como sus formas activadas. Además, los polipéptidos terapéuticos útiles pueden ser polipéptidos de tipo silvestre o pueden contener mutaciones. El grado y la ubicación de la glicosilación u otras modificaciones posteriores a la traducción pueden variar dependiendo de las células hospedadoras seleccionadas y de la naturaleza del entorno celular del anfitrión. Cuando se hace referencia a secuencias de aminoácidos específicas, las modificaciones posteriores a la traducción de tales secuencias están incluidas en esta solicitud.

"Factor de coagulación" dentro de la definición anterior, incluye polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos natural, incluyendo cualquier polimorfismo natural. También incluye polipéptidos con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N-terminal o C-terminal modificado que incluye deleciones o adiciones de aminoácidos terminales, siempre y cuando esos polipéptidos conserven sustancialmente la actividad del polipéptido terapéutico respectivo. Las variantes incluyen diferir en uno o varios residuos de aminoácidos procedentes de la secuencia de tipo silvestre. Ejemplos de tales diferencias pueden incluir el truncamiento del extremo N-terminal y/o C-terminal mediante uno o varios residuos de aminoácidos (por ejemplo, preferiblemente de 1 a 30 residuos de aminoácidos), o la adición de uno o varios residuos adicionales en el extremo N-terminal y/o C-terminal, así como sustituciones de aminoácidos conservadoras, es decir, sustituciones realizadas dentro de grupos de aminoácidos con características similares, por ejemplo (1) aminoácidos pequeños, (2) aminoácidos ácidos, (3) aminoácidos polares, (4) aminoácidos básicos, (5) aminoácidos hidrófobos y (6) aminoácidos aromáticos. Ejemplos de tales sustituciones conservadoras se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1

(1)	Alanina	Glicina		
(2)	Acido aspártico	Acido glutámico		
(3a)	Asparagina	Glutamina		
(3b)	Serina	Treonina		

(4)	Arginina	Histidina	Lisina	
(5)	Isoleucina	Leucina	Metionina	Valina
(6)	Fenilalanina	Tiosina	Triptófano	

La semivida *in vivo* de las proteínas de fusión de la invención, determinada generalmente como la semivida terminal o semivida β , es por lo general al menos aproximadamente 25%, preferiblemente al menos aproximadamente 50%, y más preferiblemente más del 100% superior que la semivida *in vivo* del polipéptido no fusionado.

- 5 Las proteínas de fusión de la presente invención tienen al menos una actividad específica molar incrementada en un 100%, en comparación con las proteínas de fusión correspondientes sin enlazadores escindibles.

10 La actividad específica molar (o la actividad específica molar relacionada con la coagulación, tal y como se considera en esta memoria en particular) en este sentido se define como la actividad expresada por mol (o, por ejemplo, nmol) del polipéptido terapéutico o de la proteína de fusión terapéutica de interés. El cálculo de la actividad específica molar permite una comparación directa de la actividad de las diferentes estructuras artificiales que no se ve afectada por los diferentes pesos moleculares o densidades ópticas de los polipéptidos estudiados. La actividad específica molar se puede calcular tal y como se ejemplifica en la tabla 2 a continuación para FIX y una proteína de fusión FIX-HSA.

15 **Tabla 2:** Cálculo de la actividad específica molar tal y como se muestra para una proteína de fusión FIX-HSA purificada

Producto	DO _(280nm, %)	PM	Actividad/Vol/DO ₂₈₀ (UI/L/DO ₂₈₀)	Densidad óptica molar (DO ₍₂₈₀₎ a 1 mol/L)	Cálculo de la actividad específica molar (UI/mol)
FIX	13,3 ¹⁾	57000	determinada para el producto	75810 (= PM x DO _(280, 1%) /10)	=(Actividad/Vol/DO ₂₈₀) x (DO ₂₈₀ a 1 mol/L)
HSA	5,7 ²⁾	66300		37791 (= PM x DO _(280, 1%) /10)	
FIX-HSA			determinada para el producto	113601 (= suma de la densidad óptica molar de FIX y HSA)	=(Actividad/Vol/DO ₂₈₀) x (DO ₂₈₀ a 1 mol/L)
¹⁾ R.G. Di Scipio et al., Biochem. 16: 698-706 (1977)					
²⁾ C. Chaudhury et al, J. Exp. Med. 197(3): 315-322 (2003)					

Con el fin de determinar una actividad específica molar relacionada con la coagulación, se puede utilizar cualquier ensayo que determine las actividades enzimáticas o de cofactores que son relevantes para el proceso de coagulación.

- 20 Por lo tanto "los ensayos relacionados con la coagulación" en el sentido de la invención, son cualquier ensayo que determina la actividad enzimática o de cofactores que son de relevancia en el proceso de coagulación o que es capaz de determinar que se ha activado tanto la cascada de la coagulación intrínseca como la extrínseca. El ensayo "relacionado con la coagulación" por lo tanto puede ser un ensayo de coagulación directo como TTPa, PT, o un ensayo de generación de trombina. Sin embargo, otros ensayos tales como, por ejemplo, ensayos cromogénicos aplicados para factores de coagulación específicos, también se incluyen. Ejemplos de tales ensayos o reactivos correspondientes son Pathromtin[®] SL (ensayo de TTPa, Dade Behring) o Thromborel[®] S (ensayo de tiempo de protrombina, Dade Behring) con plasma correspondiente que carece de factor de coagulación (Dade Behring), kits de ensayos de generación de trombina (Technoclone, Thrombinoscope) que emplean, p. ej., plasma que carece de factor de coagulación, ensayos cromogénicos como Biophen Factor IX (Hyphen BioMed), Staclo[®] FVIIa-rTF (Roche Diagnostics GmbH), Coatest[®] Factor VIII:C/4 (Chromogenix), u otros.
- 25
- 30

Para los fines de esta invención, un incremento en uno cualquiera de los ensayos anteriores o un ensayo equivalente relacionado con la coagulación, se considera que muestra un aumento en la actividad específica molar. Por ejemplo, un aumento del 25% se refiere a un aumento del 25% en cualquiera de los ensayos anteriores o en un ensayo

equivalente.

Para determinar si las proteínas de fusión terapéuticas están dentro del alcance de la presente invención, el patrón frente al que se compara la actividad específica molar de estas proteínas es una estructura artificial en la que el factor de coagulación respectivo y el HLEP respectivo están unidos a través de un enlazador no escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGGV.

En el caso de FIX, se utilizan frecuentemente ensayos de TTPa para la determinación de la actividad de coagulación. Un ensayo de coagulación (ensayo de TTPa) de este tipo se describe en el ejemplo 5 con más detalle. Sin embargo, otros ensayos relacionados con la coagulación o principios de ensayo se pueden aplicar para determinar la actividad específica molar de FIX.

Fármacos a base de polipéptidos recombinantes terapéuticos suelen ser caros y no todos los países pueden permitirse tratamientos costosos basándose en dichos fármacos. El incremento de la recuperación *in vivo* de tales fármacos podría hacer que el uso de estos productos fuera más económico y, posteriormente, se pudieran beneficiar más pacientes de los mismos. En el caso de las proteínas de fusión de la presente invención, un incremento de la recuperación *in vivo* también sería una ventaja deseable. "Recuperación *in vivo*" en el sentido de la invención, significa la cantidad de producto que se encuentra en la sangre o en el plasma poco después de la administración del producto. Por lo tanto, para detectar la recuperación *in vivo*, en general, el contenido en plasma se determina pocos minutos (por ejemplo, 5 o 15 min) después de la administración del producto.

De acuerdo con esta invención, el resto polipeptídico terapéutico está acoplado al resto de HLEP a través de un enlazador peptídico escindible de modo que el enlazador intercalado escindible se introduce entre el factor de coagulación y el polipéptido que alarga la semivida. El enlazador debe ser no inmunogénico y debe ser lo suficientemente flexible como para permitir la escisión con proteasas. La escisión del enlazador debe proceder de forma comparativamente rápida a la de la activación del polipéptido terapéutico dentro de la proteína de fusión, si la proteína de fusión es un zimógeno.

El enlazador escindible comprende preferentemente una secuencia obtenida a partir de

- a) el polipéptido terapéutico que se va a administrar, si contiene sitios de escisión proteolítica que se escinden proteolíticamente durante la activación del polipéptido terapéutico,
- b) un polipéptido sustrato de este polipéptido terapéutico, o
- c) un polipéptido sustrato escindido por una proteasa que se activa o se forma por la participación directa o indirecta del polipéptido terapéutico.

La región enlazadora en una realización más preferida comprende una secuencia del polipéptido terapéutico que se va a aplicar, lo que debería dar como resultado una disminución del riesgo de propiedades neoantigénicas de la proteína de fusión expresada. También en caso de que la proteína terapéutica sea un zimógeno (por ejemplo, necesita ser activada proteolíticamente), la cinética de la escisión del péptido enlazador reflejará más estrechamente la cinética de activación relacionada con la coagulación, del zimógeno.

En una realización preferida, el polipéptido terapéutico es zimógeno FIX y el HLEP es albúmina. En este caso, la secuencia del enlazador se obtiene a partir de las secuencias de las regiones de activación de FIX, de la región de escisión de cualquier sustrato de FIX, tal como FX o FVII, o de la región de escisión de cualquier polipéptido sustrato que se escinde con una proteasa en cuya activación está implicado FIXa.

En una realización muy preferida el péptido enlazador se obtiene a partir de FIX. En otra realización preferida, el péptido enlazador se obtiene a partir de FX o de FVII. En otra realización preferida, la secuencia enlazadora comprende dos secuencias de escisión que pueden ser escindidas con FXIa o FVIIa/TF, dos activadores fisiológicamente relevantes de FIX.

Ejemplos de combinaciones de polipéptido terapéutico, enlazador escindible y HLEP incluyen las estructuras artificiales enumeradas en las tablas 3a y 3b, pero que no se limitan a las siguientes:

Tabla 3a: Ejemplos de posibles estructuras artificiales

Factor de coagulación	Enlazador	HLEP	Enlazador obtenido a partir de (con modificaciones si es aplicable)	SEQ ID NO:
	Enlazador no escindible o no escindible suficientemente rápido			

ES 2 468 558 T3

FIX	-	HSA		
FIX	R I	HSA		
FIX	GGGGGGV(Sheffield et al.)	HSA		94
FIX	(GGG) _n GS	HSA		
FIX	SS(GGG) ₇ GS	HSA		30
FIX	SSNGS(GGG) ₃ NGS(GGG) ₃ GGNGS	HSA		31
	Enlazador con un sitio de escisión			
FIX (1-412)	SVSQTSKL TR AETVFPDVD	HSA	FIX	36
FIX (1-412)	SVSQTSKL TR AETVFPDVD GS	HSA	FIX	37
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDVD	HSA	FIX	38
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDVD GS GGS	HSA	FIX	95
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDVD GS	HSA	FIX	39
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDVD NGS	HSA	FIX	40
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDV	HSA	FIX	96
FIX	QTSKL TR AETVFPDV	HSA	FIX	97
FIX	SKL TR AETVFPDV	HSA	FIX	98
FIX	SVSQTSKL TR AETVFP	HSA	FIX	99
FIX	SVSQTSKL TR AETVF	HSA	FIX	100
FIX	QTSKL TR AETVF	HSA	FIX	101
FIX	SKL TR AETVF	HSA	FIX	102
FIX	SVSQTSKL TR AET	HSA	FIX	103
FIX	QTSKL TR AET	HSA	FIX	104
FIX	SKL TR AET	HSA	FIX	105
FIX	SVSQTSKL TR GETVFPDVD	HSA	FIX	41
FIX	SVSQTSKL TR TETVFPDVD	HSA	FIX	42
FIX	SVSQTSKL TR SETVFPDVD	HSA	FIX	43
FIX	SVSQTSKL TR LETVFPDVD	HSA	FIX	44
FIX	SVSQTSKL TR TEAVFPDVD	HSA	FIX	45
FIX	SVSQTSKL TR GEAVFPDVD	HSA	FIX	46
FIX	QTSKL TR AETVFPDVD GS	HSA	FIX	106
FIX	SKL TR AETVFPDVD GS	HSA	FIX	107
FIX	SKL TR AETVPDVD	HSA	FIX	47
FIX	QSFNDF TR VVGGED	HSA	FIX	48

FIX	QSFNDF TR VVGGED GS	HSA	FIX	49
FIX	QSFNDF TR VVGGE	HSA	FIX	108
FIX	QSFNDF TR TVGGED	HSA	FIX	50
FIX	QSFNDF TR LVGGED	HSA	FIX	51
FIX	QSFNDF TR GVGGED	HSA	FIX	52
FIX	QSFNDF TR VVGGED NGS	HSA	FIX	53
FIX	QSFNDF TR VVGGEDN	HSA	FIX	54
FIX	PERGDNNL TR IVGGQE GS	HSA	FX	109
FIX	PERGDNNL TR IVGGQE	HSA	FX	61
FIX	PERGDNNL TR IVGGQ	HSA	FX	110
FIX	DNNL TR IVGGQ	HSA	FIX	111
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDVD	Fc	FIX	62
FIX	QSFNDF TR VVGGED N	Fc	FIX	63
FIX (1-412)	SVSQTSKL TR AETVFPDVD	Fc	FIX	64
FIX	ASKPQGR R IVGG	HSAdeIDAH	FVII	112
FIX	KRNASKPQGR R IVGGKV	HSA	FVII	65
FIX	PEEPQL R MKNNEEAED	HSA	FVIII	66
FIX	DNPSFQI R SVAKKHPKT	HSA	FVIII	67
FIX	LSKNNAEP R SFSQNSRHPS	HSA	FVIII	68
FIX	DEDENQSP R SFQKKTRHYFIA	HSA	FVIII	69
FIX	SPHVLNR R AQSGSVPQ	HSA	FVIII	70
FVII o FVIIa	PEEPQL R MKNNEEAEDYDDDLTDS	HSA	FVII	71
FVII o FVIIa	DDDNPSFQI R SVAKKHPKTWVH-YAAEEED	HSA	FVII	72
FVII o FVIIa	LSKNNAIEP R SFSQNSRHPSTRQKQFNA	HSA	FVIII	73
FVII o FVIIa	DEDENQSP R SFQKKTRHYFIAA	HSA	FVIII	74
FVII o FVIIa	DYGMSSSPHVLNR R AQSGSVPQFKKVVFEFT	HSA	FVIII	75
FVIII	Obtenido a partir de los sitios de escisión de FVIII, FIX o Fibrinógeno	HSA	FVIII, FIX o Fgn	
VWF	Obtenido a partir de los sitios de escisión de VWF, FVIII o FIX	HSA	FIX,FVIII,VWF	
VWF	DIYDEDENQSP R SFOKKTRHYFIA	HSA	FVIII	76
VWF	DNPSFQI R SVAKKHP	HSA	FVIII	77
VWF	LSKNNAIEP R SFSQNSRHPS	HSA	FVIII	78

En el caso de enlazadores obtenidos a partir de la región N-terminal del péptido de activación de FIX, de acuerdo

con el polimorfismo natural, T148-A148, las secuencias pueden contener también A en lugar de T en esta posición.

Tabla 3b: Ejemplos de posibles estructuras artificiales con dos o más sitios de escisión

Factor de coagulación	Enlazador	HLEP	Enlazador obtenido a partir de (modificaciones parcialmente incluidas)	SEQ ID NO:
	Enlazador con dos sitios de escisión			
FIX	SVSQTSKL R AETVFPDV TQPERGDN LTR IVGGQE	HSA	FIX FX	79
FIX	SK LTR AETVFPD NNL TR IVGGQE	HSA	FIX FX	80
FIX	R AETVFPDV TQPERGDN LTR IVGGQE	HSA	FIX FX	81
FIX	R AETVFPERGDN LTR IVGGQE	HSA	FIX FX	82
FIX	SVSQTSKL R AETVFPD VDYV NNL TR IVGGQE	HSA	FIX FX	83
FIX	SVSQTSKL RA ETVFPD VD NNL TR IVGGQE	HSA	FIX FX	84
FIX	SVSQTSKL RA ETVFPD VD NNL TR IVGGQE	HSA	FIX FX	85
FIX	SVSQTSKL RA ETVFPD VDYVN STE AET ILD NIT QSTQSF N DF TR VVGG EDA	HSA	FIX	86
FIX	SVSQTSKL RA ETVFPD VQSF ND FT RV VGG ED	HSA	FIX	87
FIX	SVSQTSKL R AETVFPD VD SF ND FT R VVGG ED	HSA	FIX	88
FIX	SVSQTSKL RA ETVFPD VN ASK PQGR IVGG KV	HSA	FIX y FVII	89
FIX	SVSQTSKL RA ETVFPD VN ASK PQGR LVGG KV	HSA	FIX y FVII	90
FIX	SVSQTSKL RA ETVFPD VN ASK PQGR TVGG KV	HSA	FIX y FVII	91
FIX	SVSQTSKL R AETVFPD VD	Fc		92

- 5 Las variantes y los fragmentos de los enlazadores descritos también están incluidos en la presente invención siempre y cuando el enlazador todavía se pueda escindir con la proteasa o las proteasas, que escinden los enlazadores de las tablas 3a y 3b o con el tipo de proteasas definidas anteriormente. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, ya sea conservadoras o no conservadoras.

Otras combinaciones de las secuencias de escisión descritas anteriormente y de sus variantes se incluirán en la presente invención.

- 10 En otra realización, se incluyen sustituciones de aminoácidos que cambian el patrón de modificación post-traducciona del enlazador peptídico. Estas pueden ser, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos que están glicosilados, sulfatados o fosforilados.

Breve descripción de las Figuras

- 15 **Figura 1:** Activación *in vitro* de proteínas de fusión FIX-albúmina a través de FXIa a 37°C en una relación molar entre FXIa y la proteína de fusión de aproximadamente 1:500. Se utilizó una proteína de fusión con enlazador no escindible (1478/797) y dos proteínas de fusión con enlazador escindible (1088/797 y 1089/797). Las muestras se analizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras seguido por tinción con azul de Coomassie.

Figura 2: Farmacocinética de FIX rec activado y proteínas de fusión FIX-albúmina, con y sin enlazador escindible en comparación con proteínas de fusión no activadas.

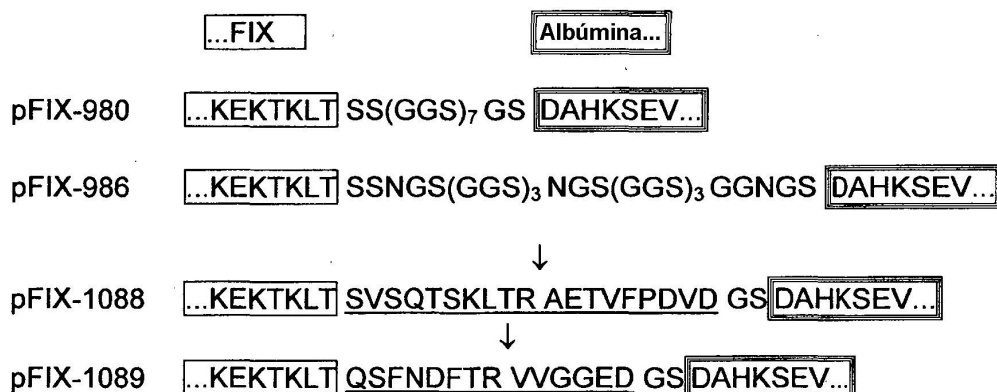
- 20 **Figura 3:** Inactivación de FIX rec activado o proteínas de fusión FIX-albúmina mediante AT. La actividad residual de

FIX se determinó después de 120 min utilizando un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial no activado.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Generación de ADNc que codifican FIX y proteínas de fusión FIX - albúmina

- La secuencia codificadora del Factor IX fue amplificada mediante PCR a partir de una genoteca de ADNc de hígado humano (ProQuest, Invitrogen) usando los cebadores We1403 y We1404 (SEQ ID NO 5 y 6). Después de una segunda ronda de PCR usando los cebadores We1405 y We1406 (SEQ ID NO 7 y 8), el fragmento resultante se clonó en pCR4TOPO (Invitrogen). A partir de ahí se transfirió el ADNc de FIX como un fragmento EcoRI en el sitio EcoRI de pRESpuo3 (BD Biosciences) en donde un sitio XhoI interno había sido eliminado previamente. El plásmido resultante fue denominado pFIX-496 y era el vector de expresión para el factor IX de tipo silvestre.
- Para la generación de estructuras artificiales de fusión con albúmina, el ADNc de FIX se volvió a amplificar con PCR en condiciones convencionales usando los cebadores We2610 y We2611 (SEQ ID NO 9 y 10) eliminando el codón de parada e introduciendo un sitio XhoI en su lugar. El fragmento FIX resultante se digirió con las endonucleasas de restricción EcoRI y XhoI y se ligó en un pRESpuo3 digerido con EcoRI/BamH1 junto con fragmento enlazador digerido con XhoI / BamH1, tal y como se describe a continuación.
- Se generaron dos fragmentos distintos de enlazador glicina / serina sin sitios de escisión internos: los oligonucleótidos We2148 y We2150 (SEQ ID NO 11 y 12) se reasociaron en concentraciones equimolares (10 pmol) en condiciones estándar de PCR, se rellenaron y se amplificaron usando un protocolo de PCR de desnaturalización inicial durante 2 min a 94°C, seguida de 7 ciclos de 15 s de desnaturalización a 94°C, 15 s de reasociación a 55°C y 15 s de alargamiento a 72°C, y finalizó por una etapa de extensión de 5 min a 72°C. El mismo procedimiento se llevó a cabo usando los oligonucleótidos We2156 y We2157 (SEQ ID NO 13 y 14). Los fragmentos enlazadores resultantes se digirieron con las endonucleasas de restricción XhoI y BamH1 y se utilizaron por separado en la reacción de ligación descrita anteriormente. Por tanto, los plásmidos resultantes contenían la secuencia codificadora de FIX y una extensión C-terminal de un enlazador de glicina / serina.
- Se generaron dos fragmentos enlazadores escindibles diferentes obtenidos a partir de los sitios de activación de FIX: los oligonucleótidos We2335 y We2336 (SEQ ID NO 15 y 16), que contenían el sitio de escisión de activación de la región limítrofe de la cadena ligera de FIX / péptido de activación, se reasociaron, se rellenaron y se amplificaron tal y como se ha descrito anteriormente. El fragmento enlazador resultante se digirió con las endonucleasas de restricción XhoI y BamH1 y se utilizó en la reacción de ligación descrita anteriormente. Por consiguiente, el plásmido resultante contenía la secuencia codificadora de FIX y una extensión C-terminal de una secuencia de FIX escindible (aminoácidos 136 a 154 de SEQ ID NO 2). En una reacción posterior de mutagénesis dirigida al sitio con un kit de mutagénesis disponible comercialmente (QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) usando los oligonucleótidos We2636 y We2637 (SEQ ID NO 17 y 18), se eliminó el sitio XhoI.
- Para la generación del segundo fragmento de enlazador escindible obtenido a partir de FIX, se realizó el mismo procedimiento usando los oligonucleótidos We2337 y We2338 (SEQ ID NO 19 y 20) para la construcción enlazador. El fragmento de enlazador resultante se digirió con las endonucleasas de restricción XhoI y BamH1 y se utilizó en la reacción de ligación descrita anteriormente. El plásmido resultante contenía entonces la secuencia codificadora de FIX y una extensión C-terminal de una secuencia escindible de FIX obtenida a partir del sitio de escisión de activación de la región limítrofe del péptido de activación de FIX / cadena pesada (aminoácidos 173 a 186 de SEQ ID NO 2). Los oligonucleótidos We2638 y Nos 2639 (SEQ ID NO 21 y 22) fueron utilizados para la delección del sitio XhoI tal y como se ha descrito anteriormente.
- En la siguiente etapa de clonación, los plásmidos generados anteriormente se digirieron con BamH1 y se insertó un fragmento de BamH1 que contenía el ADNc de albúmina humana madura. Este fragmento había sido generado por PCR sobre una secuencia de ADNc de albúmina usando los cebadores We1862 y We1902 (SEQ ID NO 23 y 24) en condiciones estándar.
- Los plásmidos finales con enlazadores de glicina / serina no escindibles fueron designados pFIX-980 (SEQ ID NO 30) y pFIX-986 (SEQ ID NO 31), respectivamente. Los plásmidos finales con enlazadores escindibles obtenidos a partir de secuencias de FIX, fueron designados pFIX-1088 (SEQ ID NO 40) y pFIX-1089 (SEQ ID NO 49), respectivamente. Sus secuencias enlazadoras y el FIX C-terminal y las secuencias N-terminales de albúmina se describen a continuación. Los sitios de escisión proteolítica dentro de los enlazadores se indican con flechas, las secuencias enlazadoras obtenidas a partir de FIX están subrayadas.



Para la expresión en células CHO, las secuencias codificadoras de la proteína de fusión FIX albúmina se transfirieron a vectores pIRESneo3 (BD Biosciences) o pcDNA3.1 (Invitrogen), respectivamente.

Para un procesamiento eficaz del propéptido en células que expresan FIX en altas cantidades es necesaria la coexpresión de furina (Wasley LC y col. 1993. PACE/Furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway. J. Biol. Chem. 268:8458-8465). La furina se amplificó a partir de una genoteca de ADNc de hígado (Ambion) usando los cebadores We1791 y We1792 (SEQ ID NO 25 y 26). Una segunda ronda de PCR usando los cebadores We1808 y We1809 (SEQ ID NO 27 y 28) proporcionó un fragmento de furina en el que se había eliminado el dominio transmembranal carboxiterminal (TM) y se había introducido un codón de parada; este fragmento se clonó en pCR4TOPO (Invitrogen). A partir de ahí el ADNc de furina Δ TM se transfirió como un fragmento EcoRI/NotI en los sitios EcoRI/NotI de pIRESpuo3 (BD Biosciences) en donde se había delecionado previamente un sitio XhoI interno. El plásmido resultante se designó pFu-797. Este plásmido se cotransfectó con todas las estructuras artificiales de FIX en una relación molar de 1:5 (pFu-797 : pFIX-xxx). La secuencia de aminoácidos de la furina secretada codificada por pFu-797 se proporciona como SEQ ID NO 29.

Ejemplo 2: Transfección y expresión de FIX y de proteínas de fusión FIX-albúmina

Los plásmidos se dejaron crecer en E. coli TOP10 (Invitrogen) y se purificaron utilizando protocolos convencionales (Qiagen). Las células HEK-293 se transfectaron usando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se dejaron crecer en medio exento de suero (Invitrogen 293 Express) en presencia de 50 ng/ml de vitamina K y 4 μ g/ml de puromicina. Las poblaciones de células transfectadas se propagaron a través de matraces T a botellas de cultivo rotatorias o a fermentadores a pequeña escala, a partir de los cuales se recogió el material sobrenadante para la purificación.

Alternativamente, células CHO K1 o DG44 (Invitrogen) se transfectaron utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se dejaron crecer en medio exento de suero (Invitrogen CD-CHO) en presencia de 50 ng/ml de vitamina K y 500-750 ng/ml de Geneticina. Se seleccionaron los clones que tenían mayor expresión y se propagaron a través de matraces T a botellas de cultivo rotatorias o a fermentadores a pequeña escala, a partir de los cuales se recogió el material sobrenadante para la purificación.

Ejemplo 3: Purificación de FIX y de proteínas de fusión FIX-albúmina

La cosecha de un cultivo celular que contenía FIX o proteína de fusión FIX albúmina se aplicó sobre una columna de Q-Sepharose FF, previamente equilibrada con tampón TrisxHCl 50 mM / NaCl 100 mM pH 8,0. Posteriormente, la columna se lavó con tampón de equilibrado que contenía NaCl 200 mM. La elución de FIX o de la proteína de fusión FIX unida se consiguió mediante un gradiente de sal usando tampón TrisxHCl 50 mM / NaCl 200 mM pH 8,0 como base. El material eluido se purificó adicionalmente por cromatografía en columna sobre una resina de hidroxiapatita. Para este propósito, el material eluido de la columna de Q-Sepharose FF se cargó en una columna de cromatografía de hidroxiapatita equilibrada con tampón TrisxHCl 50 mM / NaCl 100 mM pH 7,2. La columna se lavó con el mismo tampón y FIX o FIX-HSA se eluyeron usando un gradiente de fosfato de potasio a pH 7,2. El material eluido se dializó para reducir la concentración de sal y se utilizó para un análisis bioquímico así como para la determinación de los parámetros farmacocinéticos. El antígeno y la actividad de FIX se determinaron tal y como se describe en el ejemplo 5.

Ejemplo 4: Esquema de purificación alternativa de FIX y de proteínas de fusión FIX-albúmina

Como se ha descrito en el ejemplo 3, la cosecha del cultivo celular que contenía FIX o proteína de fusión FIX albúmina se purificó por cromatografía en Q-Sepharose FF. El material eluido de Q-Sepharose se purificó adicionalmente por cromatografía en una columna de heparina-Fractogel. Para este fin, la columna de heparina-Fractogel se equilibró con tampón Tris x HCl 50 mM, NaCl 50 mM pH 8,0 (EP), el material eluido de Q-Sepharose FF se aplicó y la columna se lavó con tampón de equilibrado que contenía NaCl 75 mM. FIX o la proteína de fusión FIX albúmina, respectivamente, se eluyeron usando EP ajustado a NaCl 300 mM. El material eluido de heparina-Fractogel se purificó adicionalmente por cromatografía en una columna de cromatografía de hidroxiapatita, tal y como se ha descrito en el

ejemplo 3. El material concentrado purificado de FIX proteína de fusión FIX albúmina, respectivamente, se sometió a una determinación de la actividad y del antígeno de FIX de acuerdo con el ejemplo 5 y se caracterizó con investigaciones adicionales *in vitro* e *in vivo*.

Ejemplo 5: Determinación de la actividad y del antígeno de FIX

- 5 La actividad de FIX se determinó como coagulación o actividad coagulante (FIX:C), utilizando reactivos de TTPa disponibles comercialmente (TTPa Pathromtin SL y plasma con FIX reducido, Dade Behring). Como referencia se utilizó un subpatrón interno calibrado frente al Patrón Internacional de la OMS de concentrado de FIX (96/854).

El antígeno de FIX (FIX:Ag) se determinó por una ELISA según protocolos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Brevemente, placas de microtitulación se incubaron con 100 µL por pocillo del anticuerpo de captura (anticuerpos emparejados para ELISA de FIX 1:200, Cedarlane, pero también se pueden aplicar otras fuentes de anticuerpos adecuados) durante una noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas tres veces con tampón de lavado B (Sigma P3563), cada pocillo se incubó con 200 µL de tampón de bloqueo C (Sigma P3688) durante una hora a temperatura ambiente. Después de otras tres etapas de lavado con tampón B, diluciones en serie de la muestra del ensayo se incubaron en tampón B, así como diluciones en serie de un subpatrón (SHP) en tampón B (volúmenes por pocillo: 100 µL) durante dos horas a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado con tampón B, se añadieron 100 µL de una dilución 1:200 del anticuerpo de detección (anticuerpos emparejados para ELISA de FIX, marcados con peroxidasa, Cedarlane) en tampón B a cada pocillo y se incubaron durante otras dos horas a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado con tampón B, se añadieron 100 µL de solución de sustrato (TMB, Dade Behring, OUVF) por pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µL de solución de detención sin diluir (Dade Behring, OSFA) preparaba las muestras para la lectura en un lector de microplacas adecuado a 450 nm de longitud de onda. Las concentraciones de las muestras de ensayo se calcularon luego usando la curva estándar con plasma humano estándar como referencia.

Ejemplo 6: Comparación de la relación actividad de FIX / antígeno de FIX de diferentes proteínas de fusión FIX-albúmina en material sobrenadante de cultivos celulares

- 25 Material sobrenadante de cultivos celulares de células HEK transfectadas con estructuras artificiales de ADN que codificaban proteínas de fusión FIX-albúmina que contenían diferentes péptidos enlazadores, se sometieron a un ensayo de la actividad y del antígeno de FIX, tal y como se ha descrito anteriormente (véase el ejemplo 5). La relación de FIX:C a FIX:Ag se calculó representando una medida directamente proporcional a la actividad específica molar de las diferentes estructuras artificiales.
- 30 Los resultados mostrados en la tabla 4 indican que hay un incremento en la relación de actividad/antígeno después de la introducción de enlazadores escindibles en la molécula FIX-HSA. También se muestra que el péptido enlazador escindible debe tener una longitud de más de dos aminoácidos con el fin de proporcionar claramente el aumento de las relaciones de actividad/antígeno.

Tabla 4: Relaciones de FIX:C/FIX:Ag de proteínas de fusión FIX-albúmina que contienen diferentes péptidos enlazadores

Estructura artificial FIX-HSA	Enlazador	FIX:C/FIX:Ag	Número de veces del incremento en comparación con la proteína de fusión 980/797 con enlazador no escindible (GGGGGGV)
1182/797	Ninguno	< 0,031	
1366/797	RI	< 0,068	
1478/863	GGGGGGV (Sheffield et al.)	0,041	--
980/797	SS(GGS) ₇ GS	0,070	1,7
986/797	SSNGS(GGS)3NGS (GGS)3GGNGS	0,076	1,9
1483/863	SVSQTSKLTR AETVFPDGD GSGGS	0,688	16,8
1088/797	SVSQTSKLTR AETVFPDGD GS	0,832	20,3

Estructura artificial FIX-HSA	Enlazador	FIX:C/FIX:Ag	Número de veces del incremento en comparación con la proteína de fusión 980/797 con enlazador no escindible (GGGGGGV)
1365/797	SVSQTSLK TR AETVFPDVD	0,630	15,4
1482/863	SVSQTSLK TR AETVFP	0,482	11,8
1087/797	SVSQTSLK TR AETVFPDVD GS (FIX deltaKLT)	0,472	11,5
1089/797	QSFNDF TR WGGED GS	0,532	13,0
1091/797	PERGDNNL TR IVGGQE GS	0,111	2,7

Ejemplo 7: Comparación de FIX y proteínas de fusión FIX - albúmina respecto a la actividad específica molar, la semivida terminal *in vivo* y la recuperación *in vivo* en ratas o conejos

En FIX purificado de tipo silvestre recombinante (rFIX 496/797) y proteínas de fusión FIX-albúmina (rFIX 980/797, rFIX 986/797, rFIX-1088/797 y rFIX 1089/797) se analizó la actividad de FIX en un ensayo de coagulación tal y como se ha descrito anteriormente. Paralelamente, se determinó la diferencia de la densidad óptica a 280 y 320 nm como una medida de la concentración de proteína (DO280-320). Se calcularon las relaciones de la actividad por DO280-320 y basándose en las densidades ópticas molares, se calcularon las actividades específicas molares. En la siguiente tabla 5 se resumen los resultados.

Tabla 5: Actividades específicas molares de FIX wt (de tipo silvestre) en comparación con fusiones FIX-albúmina

	Enlazador	Densidad óptica	Actividad coagulante de FIX	Actividad/Vol/DO	Actividad específica molar*
		(DO280-320)	(UI/mL)	(UI/mL/DO)	(UI/nmol)
rFIX.wt (496/797)		0,3798	21,2	55,8	4,23
rFIX-HSA (no escindible, 1478/863)	GGGGGGV (Sheffield et al.)	2,9189	5,8	2,0	0,23
rFIX-HSA (no escindible, 980/797)	SS (GGG) ₇ GS	1,1122	3,4	3,0	0,35
rFIX-HSA (no escindible 986/797)	SS NGS (GGG) ₃ NGS (GGG) ₃ GGN GS	0,8107	3,2	4,0	0,45
rFIX-HSA (escindible, 1088/797)	FXIa escindible	0,3421	11,9	34,8	3,95
rFIX-HSA (escin-	FXIa escindible	0,4512	11,3	25,0	2,84

	Enlazador	Densidad óptica	Actividad coagu- lante de FIX	Actividad/Vol/DO	Actividad especí- fica molar*
		(DO280-320)	(UI/mL)	(UI/mL/DO)	(UI/nmol)
dible, 1089/797)					
* Actividad específica molar basada en la actividad, la densidad óptica y las siguientes densidades ópticas molares: Densidad óptica molar de FIX: DO(280 nm, 1 mol/L) = 75 810 Densidad óptica molar de albúmina: DO(280 nm, 1 mol/L) = 37 791 Densidad óptica molar de la proteína de fusión FIX-albúmina: DO(280 nm, 1 mol/L) = 113 601					

Tomando en cuenta los resultados resumidos en la Tabla 5, es sorprendente que dos estructuras artificiales que se habían generado de acuerdo con la presente invención, muestren un gran incremento de las actividades específicas molares en comparación con las proteínas de fusión con enlazadores no escindibles. Además, la actividad específica molar de estas estructuras artificiales solo había disminuido moderadamente en comparación con rFIX de tipo silvestre.

Investigaciones *in vitro* de las reacciones de escisión proteolítica mediante Factor XIa (FXIa) confirmaron que las proteínas de fusión FIX-albúmina que contienen un enlazador escindible tal como, por ejemplo, la estructura artificial nº 1088/797 o 1089/797, se activan y paralelamente el enlazador se escinde dando como resultado la liberación del resto de albúmina (Figura 1). La proteína de fusión con enlazador no escindible no mostró una liberación correspondiente del resto de albúmina.

En el caso de FVIIa como proteasa para la escisión, en presencia de factor tisular, las proteínas de fusión FIX-albúmina 1088/797 o 1089/797 que contenían un enlazador escindible, también mostraron la liberación del resto de albúmina paralelamente a la liberación del péptido de activación de FIX (Datos no mostrados).

Además de la determinación de la actividad de coagulación específica molar, los polipéptidos nº 496/797, 980/797, 986/797, 1088/797 y 1089/797 descritos anteriormente, se administraron por vía intravenosa a ratas CD/Lewis narcotizadas (6 ratas por sustancia) y/o a conejos (4 conejos por sustancia) con una dosis de 50 UI/kg de peso corporal. Las muestras de sangre fueron tomadas antes de la administración de la sustancia del ensayo y a intervalos apropiados, comenzando 5 minutos después de la administración de las sustancias del ensayo. El contenido en antígeno de FIX se cuantificó posteriormente mediante un ensayo ELISA específico para el Factor IX humano (véase más arriba). Se utilizaron los valores medios de los grupos respectivos para calcular la recuperación *in vivo* después de 5 min. Las semividas para cada proteína se calcularon utilizando los puntos de tiempo de la fase beta de eliminación (semivida terminal) de acuerdo con la fórmula $t_{1/2} = \ln 2 / k$, en donde k es la pendiente de la recta de regresión obtenida en el trazado de los niveles de FIX:Ag a escala logarítmica y tiempo a escala lineal.

Las semividas calculadas *in vivo* se resumen en la tabla 6. En ratas así como en conejos se encontró que las semividas *in vivo* de las proteínas de fusión FIX-albúmina se incrementaban de manera significativa en comparación con FIX no fusionado de tipo silvestre recombinante, preparado internamente, en comparación con el producto de FIX recombinante disponible comercialmente. Las semividas *in vivo* de las proteínas de fusión de albúmina en comparación con BeneFIX® se incrementaron hasta aproximadamente 200-400%, dependiendo de las especies animales o de la estructura artificial utilizada (Tabla 6).

Para evaluar la recuperación *in vivo*, los niveles de antígeno de FIX medidos por mL de plasma a sus concentraciones máximas, después de una administración intravenosa (t = 5 min), estaban relacionados con la cantidad de producto aplicado por kg. Alternativamente, se calculó un porcentaje relacionando el nivel de antígeno determinado (UI/mL) 5 min después de la infusión, con el nivel de producto teórico esperado con una recuperación del 100% (producto aplicado por kg, dividido por un volumen de plasma asumido de 40 mL por kg). Las recuperaciones *in vivo* (IVR) de las proteínas de fusión FIX-albúmina eran significativamente mayores que las recuperaciones *in vitro* de rFIX (496/797) o BeneFIX® (Tabla 7).

Tabla 6:

Semividas terminales <i>in vivo</i> de preparaciones de FIX obtenidas a partir de expresión recombinante (BeneFIX®, rFIX 496/797) y proteínas de fusión FIX albúmina (rFIX 980/797, rFIX 986/797, rFIX 1088/797 y rFIX 1089/797) después de una administración intravenosa de 50 UI/kg en ratas y/o 50 UI/kg en conejos, respectivamente.		
	Experimentos en ratas	Experimentos en conejos

	PSR18-05, PSR06-05, PSR02-05		PSK11-05	
	Semivida terminal (h)	en relación con BeneFIX [%]	Semivida terminal (h)	en relación con BeneFIX [%]
rFIX 496/797	4,5*	91	n.t.	n.t.
rFIX 980/797	11,6*	234	36,9° 29,3° (2º exp.)	410 326
rFIX 986/797	10,5*	212	n.t.	n.t.
rFIX 1088/797	8,3*	168	30,3°	337
rFIX 1089/797	10,5*	212	n.t.	n.t.
BeneFIX	4,95* (media de 5,3 y 4,6)	100	9,0°	100
* Determinada entre 120 y 1440 min ° Determinada entre 4 y 96 h				

Tabla 7:

Recuperaciones *in vivo* (cantidad de sustancia 5 minutos después de la administración) de preparaciones de FIX recombinante (BeneFIX, rFIX 496/797) y proteínas de fusión FIX albúmina (rFIX 1088/797, rFIX 1089/797) después de una administración intravenosa de 50 UI/kg en ratas. El porcentaje de recuperación *in vivo* se calculó basándose en un volumen de plasma asumido de 40 mL/kg.

	Experimento en ratas	
	recuperación <i>in vivo</i> UI/dL por UI/kg/[%]*	en relación con BeneFIX [%]
rFIX 496/797	0,462 / 18,5	74,6
rFIX 1088/797	1,034 / 41,4	166,5
rFIX 1089/797	1,063 / 42,5	171,2
BeneFIX	0,621 / 24,8	100

* Calculado basándose en un volumen plasmático de 40 mL/kg

Ejemplo 8: Activación *in vitro* de proteínas de fusión FIX albúmina con/sin enlazador escindible (1088/797 y 980/797) y determinación de la farmacocinética en ratas

Proteínas de fusión FIX albúmina y rec FIX se activaron *in vitro* utilizando Factor XIa disponible comercialmente (Kordia). Brevemente, cantidades molares idénticas de FIX o de proteína de fusión FIX-albúmina ($3,0 \times 10^{-6}$ mol/L) se activaron a 37°C en solución en presencia de FXIa ($1,9 \times 10^{-8}$ mol/L) y CaCl_2 (1,5 mmol/L) tamponado a pH 6,8. Después de la activación completa tal y como se mostró por SDS-PAGE, se detuvo la reacción mediante la adición de 5 veces exceso molar de inhibidor C1 (Berinert P) basándose en la cantidad de FXIa. Las muestras se almacenaron congeladas a menos de -70°C hasta el inicio de la investigación farmacocinética.

Una investigación farmacocinética de FIX y las proteínas de fusión FIX-albúmina activadas se realizó en ratas tal como se ha descrito en el Ejemplo 7 y los resultados se compararon con unos resultados farmacocinéticos que incluían proteínas de fusión no activadas.

Resultó que las proteínas de fusión activadas mostraban unas semividas así como AUCs significativamente reduci-

das, en comparación con las moléculas no activadas (Figura 2). Después de la activación de la proteína de fusión de FIX con enlazador escindible (1088/797) se mostró un comportamiento farmacocinético muy similar al de rec FIX activado (BeneFIX) mientras que la proteína de fusión activada con enlazador no escindible (980/797) daba como resultado una semivida mayor tanto inicial como terminal, en comparación con la proteína de fusión activada 1088/797 con enlazador escindible. Por lo tanto, los resultados demuestran claramente que el enlazador escindible da como resultado un aumento de la eliminación del factor de coagulación después de la activación y, por lo tanto, evita la acumulación de proteínas de fusión potencialmente trombogénicas, activadas con semividas prolongadas.

Ejemplo 9: Comparación de proteínas de fusión FIX - albúmina con/sin enlazador escindible con respecto a la tasa de inactivación de los factores de coagulación activados mediante antitrombina III (AT)

Las proteínas de fusión de FIX con (1088/797) y sin (980/797) enlazador escindible se activaron mediante incubación con FXIa tal y como se ha descrito en el ejemplo 8. Los factores activados se incubaron con AT durante 120 min y la actividad residual de FIXa se determinó usando un método de ensayo de coagulación manual de FIX sin activación (TTPna, ver más abajo) según Schnitger y Gross. Como muestras testigo se utilizaron las proteínas de fusión FIX-albúmina activadas en presencia de la misma cantidad de AT pero sin incubación.

La actividad de FIX se determinó con la ayuda de un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial no activada (TTPna) utilizando plasma carente de FIX de Dade Behring. Las muestras se diluyeron previamente en un tampón de pH 6,8 que contenía His, Gly, sacarosa y Tween 80. Toda la determinación se realizó utilizando coagulómetros según Schnitger & Gross. Una mezcla de 0,1 ml de plasma carente de FIX, 0,1 ml de muestra y 0,1 ml de 0,1% de fosfolípidos (Rhône-Poulenc-Nattermann, 1:3 diluido previamente en tampón imidazol suplementado con 1% de HSA) se incubó durante 2 minutos a 37°C. La reacción de coagulación se inició añadiendo 0,1 ml de solución de CaCl_2 0,025 mol/l y se determinó el tiempo de coagulación.

La Figura 3 muestra los resultados de un experimento de inactivación correspondiente. En el caso de la proteína de fusión con enlazador escindible (1088/797), un aumento en el tiempo de coagulación de 210 a 540 s (factor de 2,57x) demostró un proceso de inactivación acelerada de la actividad de FIXa mediante AT, en comparación con una proteína de fusión con enlazador no escindible (980/797) que solo mostraba un aumento de 196 a 411 s (factor de 2,10x). Lo más probable es que el residuo de albúmina afecte estéricamente al proceso de inactivación dependiente de AT en el caso de la proteína de fusión con enlazador no escindible, mientras que en el caso de la proteína de fusión con enlazador escindible, el residuo de albúmina se separa por escisión dando lugar a una inactivación acelerada por AT.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CSL Behring GmbH
CSL Behring GmbH

<120> Proteínas de fusión que se pueden escindir proteolíticamente con actividad específica molar elevada

5 <130> 2006_M004_A115

<150> EP06012262.9

<151> 2006-06-14

<160> 112

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

15 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

ES 2 468 558 T3

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

ES 2 468 558 T3

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 2

<211> 415

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr

ES 2 468 558 T3

100	105	110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu	Asn Gln Lys Ser Cys	Glu Pro Ala Val
115	120	125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val	Ser Val Ser Gln Thr	Ser Lys Leu Thr
130	135	140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu		
145	150	155
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn		
165	170	175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe		
180	185	190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly		
195	200	205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu		
210	215	220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu		
225	230	235
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His		
245	250	255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu		
260	265	270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile		
275	280	285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser		
290	295	300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala		
305	310	315
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys		
325	330	335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly		
340	345	350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro		
355	360	365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser		
370	375	380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys		
385	390	395
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr		
405	410	415

<210> 3
 <211> 1386
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3
 atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta 60
 ggatatctac tcagtgtctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt 120
 ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaaacctt 180
 gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt ttggaagaag cacgagaagt ttttgaaaac 240
 actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgtttgatg gagatcagtg tgagtccaat 300
 ccatgtttta atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc 360
 tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga 420
 tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaagggtg tttgctcctg tactgaggga 480
 tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga 540
 gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgtttttcc tgatgtggac 600
 tatgtaaatt ctactgaagc tgaaccatt ttggataaca tcaactcaaag cacccaatca 660
 tttaatgact tcactcgggt tgttgggtgga gaagatgcca aaccagggtca attcccttgg 720
 cagggtgttt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa 780
 tggattgtaa ctgctgcca ctgtgttgaa actggtgtta aaattacagt gtgcgcaggt 840
 gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt 900
 cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ctttctggaa 960
 ctggacgaac ctttagtgct aaacagctac gttacaccta ttgcatctgc tgacaaggaa 1020
 tacacgaaca tcttcctcaa atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc 1080
 cacaagggga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc 1140
 acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat 1200
 gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa 1260
 gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa 1320
 tatggaatat ataccaaggt atcccggat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc 1380
 acttaa 1386

<210> 4
 <211> 1830
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<400> 4
atgaagtggg taacctttat ttcccttctt tttctcttta gctcggctta ttccaggggt 60
gtgtttcgtc gagatgcaca caagagtggg gttgctcatc ggtttaaaga tttgggagaa 120
gaaaatttca aagccttggg gttgattgcc tttgctcagt atcttcagca gtgtccattt 180
gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat 240
gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt catacccttt ttggagacaa attatgcaca 300
gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct 360
gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattgggtg 420
agaccagagg ttgatgtgat gtgactgctt tttcatgaca atgaagagac atttttgaaa 480
aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ctttactttt atgccccgga actccttttc 540
tttgctaaaa ggtataaagc tgcttttaca gaatgttgcc aagctgctga taaagctgcc 600
tgctgttgcc caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag 660
agactcaagt gtgccagtct ccaaaaattt ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta 720
gctcgcttga gccagagatt tcccaaagct gagtttgagc aagtttccaa gtagtgaca 780
gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac 840
agggcggacc ttgccaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag 900
gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa tccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat 960
gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc 1020
aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc ctgggcatgt ttttgtatga atatgcaaga 1080
aggcatcctg attactctgt cgtgctgctg ctgagacttg ccaagacata tgaaaccact 1140
ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatcct catgaatgct atgccaaagt gttcgatgaa 1200
tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag 1260
cagcttgagg agtacaaatt ccagaatgct ctattagttc gttacaccaa gaaagtaccc 1320
caagtgtcaa ctccaactct ttagaggtc tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa 1380
tggttgaaac atcctgaagc aaaaagaatg ccctgtgcag aagactatct atccgtggtc 1440
ctgaaccagt tatgtgtggt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaagtc 1500
tgcacagaat ccttggtgaa caggcgacca tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca 1560
tacgttccca aagagtttaa tgctgaaaca ttcaccttcc atgcagatat atgcacactt 1620
tctgagaagg agagacaaat caagaaacaa actgcacttg ttgagctcgt gaaacacaag 1680
cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc tttttagtag 1740
aagtgtgca aggctgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttggt 1800
gctgcaagtc aagctgcctt aggcttataa 1830

<210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Artificial

<400> 5
ccactttcac aatctgctag c 21

<210> 6
<211> 23

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Artificial

5 <400> 6
 caattccaat gaattaacct tgg 23

<210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Artificial

<400> 7
 atgcagcgcg tgaacatgat c 21

15 <210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Artificial

<400> 8
 tcattaagtg agctttgttt ttcc 25

25 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Artificial

30 <400> 9
 gattcgaatt cgcccttatg c 21

<210> 10
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Artificial

<400> 10
 cgctcgagggt gagctttgtt tttccttaa tc 32

40 <210> 11
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Artificial

ES 2 468 558 T3

<400> 11
 ctcgagcggg ggatctggcg ggtctggagg ctctggaggg tcgggaggct ct 52

5
 <210> 12
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Artificial

10
 <400> 12
 ggatccagat cccccagagc ctccagagcc tcccgaccct ccagag 46

<210> 13
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Artificial

<400> 13
 ctcgagcaat ggatctggcg ggtctggagg ctctggaggg tcgaatggct ctggag 56

20
 <210> 14
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Artificial

25
 <400> 14
 ggatccgttc cctccagacc cgccagatcc cccagagcct ccagagccat tcgaccctcc 60
 agag 64

<210> 15
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Artificial

<400> 15
 cctcgagctc tgtgagccag acctccaagc tcaccagggc cgagac 46

35
 <210> 16
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Artificial

40
 <400> 16
 gggatccgtc cacatcaggg aagacagtct cggccctggt gagc 44

<210> 17
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Artificial

<400> 17
 ggaaaaaaca aagctcactt ctgtgagcca gac 33

10

<210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Artificial

15

<400> 18
 gtctggctca cagaagtgag cttgtttt tcc 33

<210> 19
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Artificial

<400> 19
 cctcgagcag agcttcaatg acttcacccg ggtggtgg 38

25

<210> 20
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Artificial

30

<400> 20
 gggatccatc ctccccgcc accacccggg tgaagtcatt g 41

<210> 21
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Artificial

<400> 21
 ggaaaaaaca aagctcactc agagcttcaa tgac 34

40

<210> 22
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Artificial

<400> 22
 gtcattgaag ctctgagtga gcttggttt ttcc 34

5 <210> 23
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Artificial

 <400> 23
 gtgggatccg atgcacacaa gaggaggtt g 31

15 <210> 24
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Artificial

20 <400> 24
 cacggatccc tataagccta aggcagcttg acttg 35

 <210> 25
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Artificial

 <400> 25
 caaggagacg ggcgctcc 18

30 <210> 26
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Artificial

35 <400> 26
 gccaaggag gggattggc 19

 <210> 27
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Artificial

 <400> 27
 gtggaattca tggagctgag gccctggttg 30

<210> 28
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Artificial

<400> 28
 cacgcgccg ctactacag ccgttgcccc gcctccac 38

10 <210> 29
 <211> 704
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn
 20 25 30
 Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val
 35 40 45
 Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr
 50 55 60
 Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu
 85 90 95
 Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu
 100 105 110
 Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
 115 120 125
 Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
 130 135 140
 His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
 145 150 155 160
 Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
 165 170 175

15

ES 2 468 558 T3

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

ES 2 468 558 T3

Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
 450 455 460
 Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
 465 470 475 480
 Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
 485 490 495
 Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
 500 505 510
 Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
 515 520 525
 Asn Asp Trp Ala Phe Thr Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
 530 535 540
 Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
 545 550 555 560
 Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
 565 570 575
 Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser
 580 585 590
 Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys
 595 600 605
 Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp
 610 615 620
 Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val
 625 630 635 640
 Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu
 645 650 655
 Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu
 660 665 670
 Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln
 675 680 685
 Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu
 690 695 700

<210> 30

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 30

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

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser
 20 25

ES 2 468 558 T3

<210> 31
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Enlazador

<400> 31
 Ser Ser Asn Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asn Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Asn Gly Ser
 20 25 30

10

<210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

15

<400> 32
 Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 1 5 10 15

Ala

<210> 33
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Enlazador

<400> 33
 Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser
 1 5 10

25

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Enlazador

<400> 34
 Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 1 5 10 15

Ala

<210> 35
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>

<223> Enlazador

<400> 35

Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Ser

5

<210> 36

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Enlazador

<400> 36

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

<210> 37

<211> 21

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 37

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Gly Ser
20

20

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Enlazador

<400> 38

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

<210> 39

<211> 21

30 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Enlazador

ES 2 468 558 T3

<400> 39

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Gly Ser
20

<210> 40

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 40

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Asn Gly Ser
20

<210> 41

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 41

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Gly Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

<210> 42

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 42

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Thr Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

<210> 43

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

ES 2 468 558 T3

<400> 43
 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ser Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Asp
 <210> 44
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 44
 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Leu Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Asp
 <210> 45
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 45
 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Thr Glu Ala Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Asp
 <210> 46
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 46
 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Gly Glu Ala Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Asp
 <210> 47
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 47
 Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp
 1 5 10

ES 2 468 558 T3

<210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Enlazador

<400> 48
 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
 1 5 10

10

<210> 49
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

15

<400> 49
 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Gly Ser
 1 5 10 15

20

<210> 50
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

<400> 50
 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Thr Val Gly Gly Glu Asp
 1 5 10

25

<210> 51
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Enlazador

<400> 51
 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Leu Val Gly Gly Glu Asp
 1 5 10

35

<210> 52
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

40

<400> 52
 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Gly Val Gly Gly Glu Asp
 1 5 10

<210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Enlazador

<400> 53
 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Asn Gly
 1 5 10 15

Ser

10

<210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

15

<400> 54
 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Asn
 1 5 10 15

<210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Enlazador

<400> 55
 Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 1 5

25

<210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Enlazador

<400> 56
 Arg Leu Val Gly Gly Gln Glu
 1 5

35

<210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

40

<400> 57
 Arg Thr Val Gly Gly Gln Glu
 1 5

	<210> 58 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial
5	<220> <223> Enlazador <400> 58 Arg val val Gly Gly Gln Glu 1 5
10	<210> 59 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Enlazador
15	<400> 59 Arg Ala val Gly Gly Gln Glu 1 5
20	<210> 60 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Enlazador <400> 60 Arg Gly val Gly Gly Gln Glu 1 5
25	<210> 61 <211> 16 <212> PRT <213> Artificial
30	<220> <223> Enlazador <400> 61 Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile val Gly Gly Gln Glu 1 5 10 15
35	<210> 62 <211> 19 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Enlazador <400> 62 Ser val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr val Phe Pro 1 5 10 15
40	Asp val Asp

ES 2 468 558 T3

<210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Enlazador

<400> 63
 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Asn
 1 5 10 15

10

<210> 64
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

15

<400> 64
 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15

Asp Val Asp

20

<210> 65
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

<400> 65
 Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val
 1 5 10 15

25

<210> 66
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Enlazador

<400> 66
 Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp
 1 5 10 15

35

<210> 67
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

ES 2 468 558 T3

<400> 67

Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His
1 5 10 15

Pro Lys Thr

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 68

Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser
1 5 10 15

Arg His Pro Ser
20

<210> 69

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 69

Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg
1 5 10 15

His Tyr Phe Ile Ala
20

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 70

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

<210> 71

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

ES 2 468 558 T3

<400> 71
 Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp
 1 5 10 15
 Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser
 20
 <210> 72
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 72
 Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys
 1 5 10 15
 Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ala Ala Glu Glu Glu Asp
 20 25 30
 <210> 73
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 73
 Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg His Pro Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala
 20 25
 <210> 74
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 74
 Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg
 1 5 10 15
 His Tyr Phe Ile Ala Ala
 20
 <210> 75
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador

ES 2 468 558 T3

<400> 75
 Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln
 1 5 10 15

 Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
 20 25 30

 <210> 76
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Enlazador

 <400> 76
 Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys
 1 5 10 15

 Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala
 20

 <210> 77
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Enlazador

 <400> 77
 Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His
 1 5 10 15

 Pro

 <210> 78
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Enlazador

 <400> 78
 Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser
 1 5 10 15

 Arg His Pro Ser
 20

 <210> 79
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Enlazador

 <400> 79
 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15

Asp Val Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val
20 25 30

Gly Gly Gln Glu
35

<210> 80
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 80
Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Asn Asn Leu Thr
1 5 10 15

Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
20

<210> 81
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 81
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp
1 5 10 15

Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
20 25

<210> 82
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 82
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg
1 5 10 15

Ile Val Gly Gly Gln Glu
20

<210> 83
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 83
 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Asp Tyr Val Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 20 25 30
 <210> 84
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 84
 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 20 25 30
 <210> 85
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 85
 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 20 25 30
 <210> 86
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 86
 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn
 20 25 30
 Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly
 35 40 45
 Gly Glu Asp Ala
 50
 <210> 87
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 87
Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15
Asp Val Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
20 25 30

5
<210> 88
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

10
<220>
<223> Enlazador

<400> 88
Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15
Asp Val Asp Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
20 25 30

15
<210> 89
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 89
Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15
Asp Val Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val
20 25 30

20
<210> 90
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

25
<220>
<223> Enlazador

<400> 90
Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15
Asp Val Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Leu Val Gly Gly Lys Val
20 25 30

30
<210> 91
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

ES 2 468 558 T3

<400> 91

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Thr Val Gly Gly Lys Val
20 25 30

<210> 92

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 92

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

<210> 93

<211> 666

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 93

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

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

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

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

ES 2 468 558 T3

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
 65 70 75 80
 Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
 85 90 95
 Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
 100 105 110
 Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
 115 120 125
 Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
 130 135 140
 Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 145 150 155 160
 Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
 165 170 175
 Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 180 185 190
 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 195 200 205
 Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 210 215 220
 Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 225 230 235 240
 Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 245 250 255
 His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 260 265 270
 Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 275 280 285
 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 290 295 300
 Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 305 310 315 320
 Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 325 330 335

ES 2 468 558 T3

Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
 340 345 350
 Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 355 360 365
 His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
 370 375 380
 Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
 385 390 395 400
 Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser
 405 410 415
 Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp
 420 425 430
 Val Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 435 440 445
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 450 455 460
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 465 470 475 480
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 485 490 495
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 500 505 510
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 515 520 525
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 530 535 540
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 545 550 555 560
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 565 570 575
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 580 585 590
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 595 600 605
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 610 615 620
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 625 630 635 640
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 645 650 655
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 660 665

ES 2 468 558 T3

	<210> 94 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial
5	<220> <223> Enlazador
	<400> 94 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val 1 5
10	<210> 95 <211> 24 <212> PRT <213> Artificial
	<220> <223> Enlazador
15	<400> 95 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro 1 5 10 15
	Asp Val Asp Gly Ser Gly Gly Ser 20
20	<210> 96 <211> 18 <212> PRT <213> Artificial
	<220> <223> Enlazador
	<400> 96 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro 1 5 10 15
	Asp Val
25	<210> 97 <211> 15 <212> PRT <213> Artificial
	<220> <223> Enlazador
30	<400> 97 Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val 1 5 10 15
35	<210> 98 <211> 13 <212> PRT <213> Artificial
	<220> <223> Enlazador

ES 2 468 558 T3

<400> 98
 Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val
 1 5 10

5
 <210> 99
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

10
 <400> 99
 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15

<210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

15
 <220>
 <223> Enlazador

<400> 100
 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe
 1 5 10 15

20
 <210> 101
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

25
 <400> 101
 Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe
 1 5 10

<210> 102
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

30
 <220>
 <223> Enlazador

<400> 102
 Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe
 1 5 10

35
 <210> 103
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

40
 <220>
 <223> Enlazador

<400> 103
 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr
 1 5 10

5
 <210> 104
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

10
 <400> 104
 Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr
 1 5 10

<210> 105
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

15
 <220>
 <223> Enlazador

<400> 105
 Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr
 1 5

20
 <210> 106
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

25
 <400> 106
 Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp
 1 5 10 15

Gly Ser

30
 <210> 107
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

35
 <400> 107
 Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Gly Ser
 1 5 10 15

40
 <210> 108
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 108
Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu
1 5 10

5 <210> 109
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Enlazador

<400> 109
Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
1 5 10 15

Gly Ser

15 <210> 110
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

20 <400> 110
Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln
1 5 10 15

<210> 111
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Enlazador

<400> 111
Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln
1 5 10

30 <210> 112
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

35 <400> 112
Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión terapéutica que comprende
 - a) un factor de coagulación,
 - b) un polipéptido que alarga la semivida seleccionado entre el grupo que consiste en albúmina incluyendo variantes y derivados de la misma, polipéptidos de la familia de la albúmina incluyendo variantes y derivados de los mismos e inmunoglobulinas sin el dominio de unión a antígenos, y
 - c) un enlazador peptídico que une el factor de coagulación y el extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido que alarga la semivida de modo que el enlazador peptídico escindible intercalado se introduce entre el factor de coagulación y el polipéptido que alarga la semivida;
- en donde el enlazador peptídico se puede escindir con proteasas implicadas en la coagulación o activadas por enzimas de la coagulación y en donde la proteína de fusión terapéutica tiene en comparación con la proteína de fusión terapéutica respectiva unida por un enlazador no escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGGV, un aumento de la actividad específica molar en al menos un ensayo relacionado con la coagulación y en donde la actividad específica molar se incrementa en al menos el 100%.
2. Proteína de fusión terapéutica según la reivindicación 1, en donde el factor de coagulación es un factor de coagulación dependiente de la vitamina K.
3. Proteína de fusión terapéutica según las reivindicaciones 1 a 2, en donde el factor de coagulación es FVIIa o FIX.
4. Proteína de fusión terapéutica según las reivindicaciones 1 a 3, en donde el polipéptido que alarga la semivida es una inmunoglobulina sin un dominio de unión a antígenos.
5. Proteína de fusión terapéutica según las reivindicaciones 1 a 4, en donde el enlazador se puede escindir con FXIa y/o FVIIa/TF.
6. Proteína de fusión terapéutica según las reivindicaciones 1 a 5, en donde el enlazador se puede escindir con la proteasa o proteasas que activan el factor de coagulación.
7. Proteína de fusión terapéutica según la reivindicación 6, en donde la cinética de la escisión del enlazador con la proteasa o proteasas no se retrasa, en comparación con la cinética de la activación de dicho factor de coagulación en más de un factor 3.
8. Proteína de fusión terapéutica según la reivindicación 7, en donde el enlazador se puede escindir con la proteasa o proteasas que se activan después de la implicación del factor de coagulación.
9. Proteína de fusión terapéutica según las reivindicaciones 1 a 8, en donde el enlazador se puede escindir con FXIa y/o FVIIa/TF y el factor de coagulación es FIX.
10. Proteína de fusión terapéutica según las reivindicaciones 1 a 9, en donde el enlazador se puede escindir con FXa y/o FVIIa/TF y el factor de coagulación es FVIIa.
11. Proteína(s) de fusión terapéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el enlazador comprende una secuencia seleccionada entre el grupo de las tablas 3a and 3b en donde los enlazadores RI, GGGGGGV, (GGG)_nGS, SS(GGS)₇GS y SSNGS(GGS)₃NGS(GGS)₃GGNGS están excluidos.
12. Proteína(s) de fusión terapéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso como medicamento.
13. Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
14. Un plásmido o un vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 13.
15. Una célula hospedadora que comprende un polinucleótido según la reivindicación 13 o un plásmido o un vector según la reivindicación 14.
16. Un método para producir una proteína de fusión terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende cultivar células hospedadoras según la reivindicación 15 en condiciones tales que se expresa la proteína de fusión terapéutica.
17. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, un polinucleótido según la reivindicación 13, o un plásmido o un vector según la reivindicación 14.

18. El uso de una proteína de fusión terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, de un polinucleótido según la reivindicación 13, o de un plásmido o un vector según la reivindicación 14, o de una célula hospedadora según la reivindicación 15, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno de la coagulación sanguínea.

5 19. El uso según la reivindicación 18, en donde el trastorno de la coagulación sanguínea es hemofilia B, una deficiencia en FVII y/o FVIIa o hemofilia A.

20. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 18 y 19, en donde el tratamiento comprende terapia génica humana.

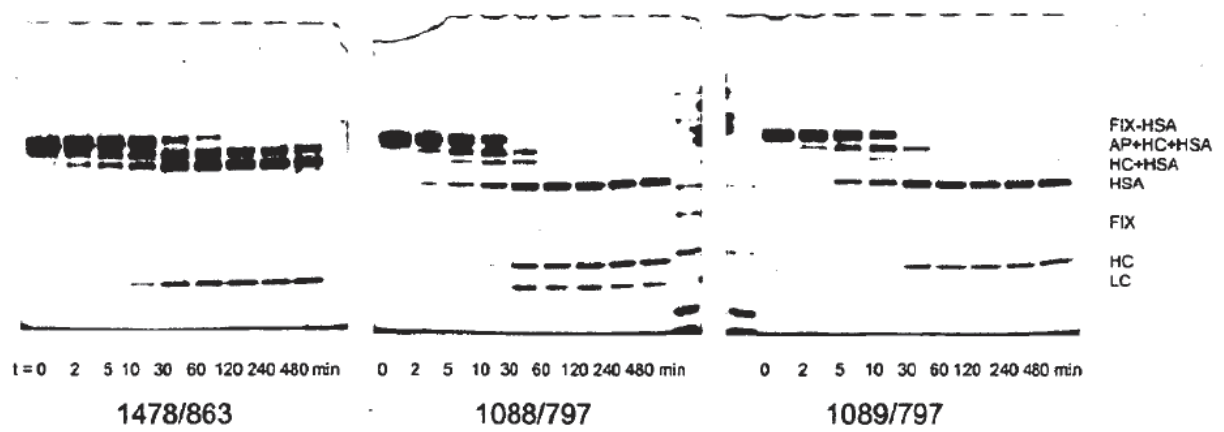


Fig. 1

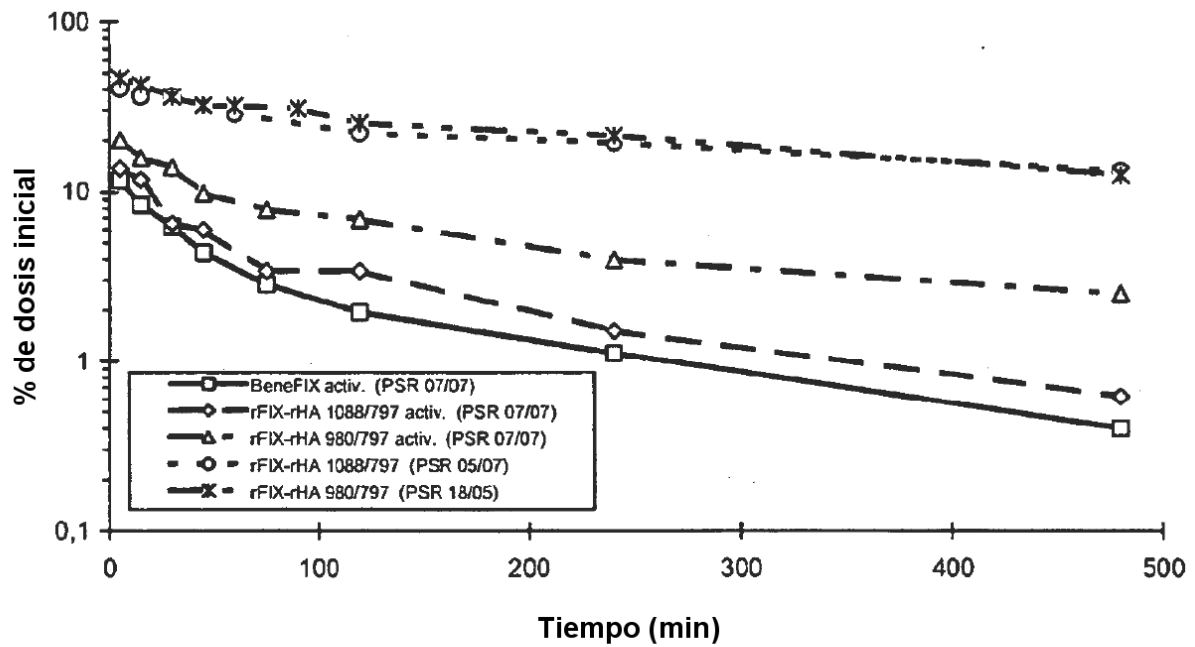


Fig. 2

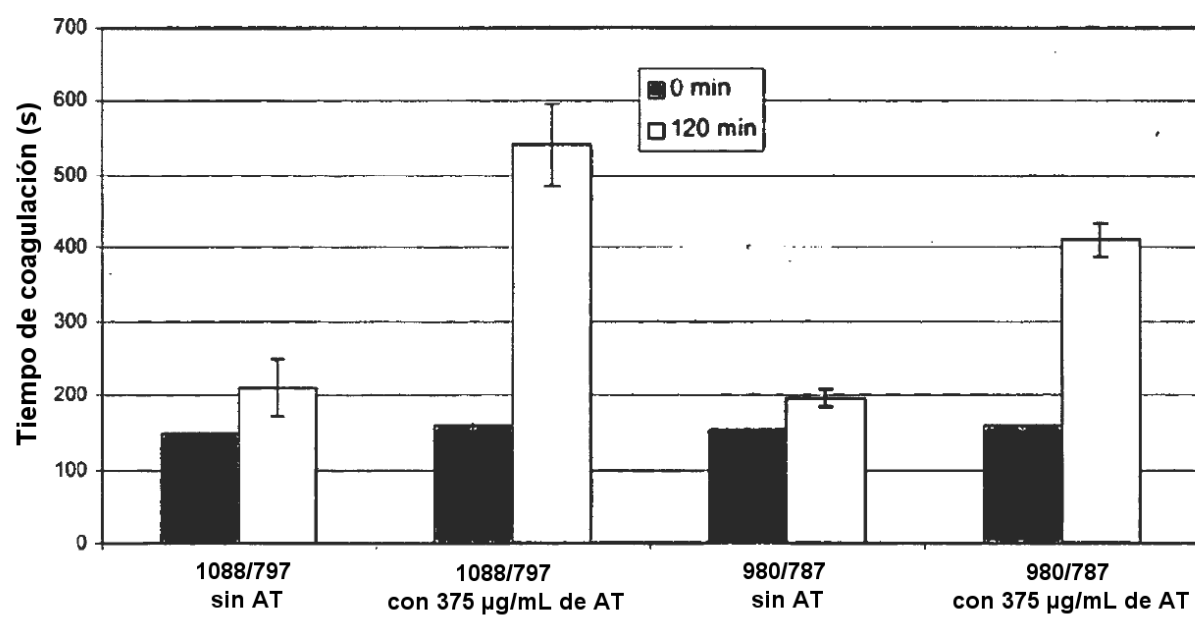


Fig. 3