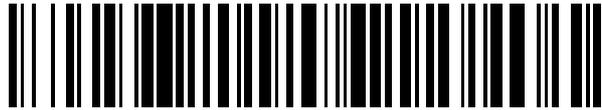


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 886**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/36** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2011 E 11700052 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2521566**

54 Título: **Preparados de fibrinógeno enriquecidos en fibrinógeno con una cadena alfa extendida**

30 Prioridad:

**08.01.2010 EP 10150391**

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

**15.12.2014**

73 Titular/es:

**PROFIBRIX BV (100.0%)  
Darwinweg 24  
2333 CR Leiden , NL**

72 Inventor/es:

**GRIMBERGEN, JOSEPH;  
KOOPMAN, JACOB y  
BOUT, ABRAHAM**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 524 886 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

Preparados de fibrinógeno enriquecidos en fibrinógeno con una cadena alfa extendida

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a preparados de fibrinógeno y al uso de preparados de fibrinógeno en aplicaciones médicas. En particular, se refiere al uso de preparados de fibrinógeno que están enriquecidos en fibrinógeno con una cadena alfa extendida.

10

## Antecedentes de la invención

El fibrinógeno es una glicoproteína del plasma soluble que se sintetiza en el cuerpo humano, principalmente por parte de células del parénquima del hígado. Es una molécula dimérica, que consiste en dos pares de tres cadenas polipeptídicas designadas  $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $\gamma$ , que están conectados por puentes disulfuro. Las tres cadenas polipeptídicas son codificadas por tres genes separados. La forma predominante (HMW fib) alberga una cadena  $A\alpha$  que se sintetiza como un precursor de 625 aminoácidos y está presente en el fibrinógeno encontrado en el plasma sanguíneo como una cadena polipeptídica de 610 aminoácidos, la cadena  $B\beta$  contiene 461 y la cadena  $\gamma$  411 aminoácidos. Los tres polipéptidos se sintetizan individualmente a partir de 3 ARNms. El ensamblaje de las tres cadenas componentes ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $\gamma$ ) en su forma final como un dímero de seis cadenas ( $A\alpha$ ,  $B\beta$ ,  $\gamma$ )<sub>2</sub> se produce en el lumen del retículo endoplasmático (ER - siglas en inglés).

20

El fibrinógeno circula en la sangre en concentraciones altas (1-2 g/L) y demuestra un alto grado de heterogeneidad. Se estima que en cada individuo circulan aproximadamente un millón de diferentes moléculas de fibrinógeno. La mayoría de estas variantes, que representan sólo una pequeña porción del fibrinógeno total (en la mayoría de los casos no más de unos pocos porcentajes), difieren en la función y estructura.

25

La proteólisis de la parte carboxi-terminal de la cadena  $A\alpha$  resulta en tres formas circulantes de fibrinógeno principales que tienen claramente diferentes pesos moleculares. El fibrinógeno se sintetiza en la forma de alto peso molecular (HMW; peso molecular 340 kDa); la forma predominante de cadenas  $A\alpha$  en la circulación contiene 610 aminoácidos). La degradación de una de las cadenas  $A\alpha$  da lugar a la forma LMW (PM = 305 kDa); la forma LMW' (270 kDa) es la variante en la que las dos cadenas de  $A\alpha$  están parcialmente degradadas en el extremo carboxi. En la sangre de individuos sanos, 50 - 70% del fibrinógeno es HMW, 20 - 50% es fibrinógeno con una o dos cadenas  $A\alpha$  degradadas (de Maat y Verschuur (2005) Curr. Opin. Hematol. 12, 377). Las variantes HMW y LMW' muestran claras diferencias en el tiempo de coagulación y en la estructura de polímero de fibrina (Hasegawa N, Sasaki S. (1990) Thromb. Res. 57, 183).

30

Variantes bien conocidas que son el resultado de corte y empalme alternativo son las llamadas variante gamma prima ( $\gamma'$ ) y la variante  $\alpha$ -ext Fib o Fib420.

40

La variante  $\alpha$ -ext Fib o Fib420, que tiene un peso molecular de 420 kDa, representa el 1-3% del fibrinógeno circulante total (de Maat y Verschuur (2005) Curr. Opin. Hematol. 12, 377). La isoforma  $\alpha$ -ext Fib extendida se distingue de la cadena  $\alpha$  convencional de fibrinógeno por la presencia de un dominio globular en el extremo C de 236 residuos adicional debido al corte y empalme alternativo. En la bibliografía se dan datos contradictorios sobre la función y las características de Fib420. Sobre la base de estudios con  $\alpha$ -ext Fib derivada de plasma, Applegate et al, Blood (2000) 95: 2297, llegaron a la conclusión de que las propiedades de polimerización y reticulación de un  $\alpha$ -ext Fib no son totalmente diferentes de HMW Fib derivada de plasma. Concluyen que el dominio C adicional no tiene efecto alguno sobre la coagulación y sugieren que la función del dominio puede ser para apoyar la adhesión celular mediada por la integrina. En el documento EP 1 495 051 se sugiere que Fib420 podría ser menos sensible a la degradación y podría tener un efecto sobre la estructura del coágulo. Sin embargo, no se da justificación alguna y no hay sugerencia alguna en cuanto a si el efecto puede ser una mejora o un deterioro en la estructura o resistencia del coágulo. Mosesson et al. (Biophys. Chem. 112, 209: 2004) han estudiado la ultraestructura de los coágulos que se basan en  $\alpha$ -ext Fib derivada de plasma del cordón umbilical. Informaron que las fibras de los coágulos de  $\alpha$ -ext Fib son más delgadas y están más ramificadas que las basadas en fibrinógeno HMW, pero tienen la misma periodicidad que caracteriza a todas las fibras de fibrina. Los autores sugieren que la probable función para la cadena  $\alpha$  extendida en  $\alpha$ -ext Fib es proporcionar sitios para la interacción con integrinas celulares.

45

50

## 55 Descripción detallada

La presente invención se refiere a un preparado de fibrinógeno que contiene al menos 95% (p/p) de fibrinógeno basado en la proteína total, y en donde al menos el 10% del fibrinógeno está en forma de Fib420, para uso en un método para tratar episodios de hemorragia aguda, hiperfibrinólisis, deficiencia en fibrinógeno u otros trastornos

60

hemorrágicos, y en donde el Fib420 se prepara mediante tecnología recombinante.

En el sector, a Fib420 también se le alude como ' $\alpha$ -ext Fib', 'fibrinógeno con una cadena alfa extendida' o 'fibrinógeno<sub>420</sub>'. En el presente contexto, estos términos y expresiones se utilizan indistintamente. Todos estos términos y expresiones se refieren a una molécula simétrica de la estructura ( $A_{\alpha_{ext}}$ ,  $B\beta$ ,  $\gamma$ ), en donde tanto las cadenas  $\alpha$  de fibrinógeno convencionales tal como se encuentran en HMW fib, han sido reemplazados por cadenas alfa extendidas.

En el presente contexto, la expresión 'preparado de fibrinógeno' se refiere al fibrinógeno en forma aislada, por ejemplo, a un aislado de plasma o aislado de sobrenadante celular de fibrinógeno. También puede referirse a un preparado sintético de fibrinógeno. Un preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con la invención es un preparado puro en el que sustancialmente no están presentes contaminantes tales como proteínas y contiene preferiblemente al menos 95% p/p, por lo menos 96% p/p, por lo menos 97% p/p o por lo menos 98% p/p de fibrinógeno, basado en la proteína total. Lo más preferiblemente, un preparado de fibrinógeno de acuerdo con la invención comprende al menos 99% p/p o al menos 99,5% p/p de fibrinógeno, basado en la proteína total. Preparados de fibrinógeno puros de este tipo son particularmente adecuadas para formular composiciones que se utilizan en aplicaciones médicas, es decir, composiciones para tratar episodios de hemorragia aguda, hiperfibrinólisis, deficiencia en fibrinógeno u otros trastornos hemorrágicos.

De acuerdo con la invención, al menos 10% p/p del fibrinógeno en el preparado está en forma de Fib420. Preferiblemente, al menos 15% p/p, por lo menos 20% p/p, por lo menos 25% p/p o por lo menos 30% p/p del fibrinógeno está en forma de Fib420. Más preferiblemente, por lo menos 40% p/p, por lo menos 50% p/p, por lo menos 60% p/p, por lo menos 70% p/p, por lo menos 80% p/p o por lo menos 90% p/p está en forma de Fib420. Lo más preferiblemente, por lo menos 95% p/p, por lo menos 99% p/p o todo el fibrinógeno está en forma de Fib420.

Una ventaja del preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con la invención es que la digestión mediada por plasmina del preparado de fibrinógeno es más lenta que para el fibrinógeno derivado del plasma. Su mayor resistencia a la digestión por plasmina es probable que sea beneficiosa para el tratamiento de pacientes que padecen hiperfibrinólisis, que a menudo se observa en casos de coagulopatía adquirida.

Esto significa que la estabilidad del coágulo de fibrina se mejora debido al uso de acuerdo con la invención y que el preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con la invención es más potente que los preparados del estado de la técnica. El uso de un preparado de fibrinógeno más potente permite la reducción tanto de la cantidad de fluido como la cantidad de proteína terapéutica a administrar. Esto es una ventaja para el uso por vía intravenosa para tratar la coagulopatía dilucional. Actualmente, para la inyección intravenosa (i.v.) de fibrinógeno para compensar la baja actividad de coagulación de la sangre, se requieren altas dosis de fibrinógeno (~ 5 gramos de fibrinógeno por tratamiento). Éste se administra mediante inyección directa a una dosis de 70 mg/kg. Dado que el fibrinógeno, en general, puede ser disuelto en una concentración máxima de 20 mg/ml, esto significa que aproximadamente 250 ml de fluido tienen que ser administrados por vía intravenosa a un adulto. Sería beneficiosa la reducción de esta dosis, proporcionando un fibrinógeno más potente.

Sin embargo, otra ventaja es que, debido al uso de acuerdo con la invención, la formación del coágulo es menos dependiente del factor XIII, dependiendo de cuando se utilicen preparados de fibrinógeno derivado del plasma o fibrinógeno HMW. No se requiere factor XIII para formar coágulos firmes. Por lo tanto, en una realización, el preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con la invención está libre de factor XIII.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con la invención. Además del fibrinógeno, la composición puede comprender un activador, tal como trombina o una proteína similar a la trombina tal como reptilasa. También puede comprender excipientes que son adecuados para su uso en un preparado inyectable. El preparado puede estar en forma seca y subsiguientemente ser reconstituido, p. ej., con solución salina tamponada, y similares, o puede estar en forma líquida, ya sea como una suspensión o disolución. Materiales excipientes adecuados pueden incluir disolventes y co-disolventes tales como etanol, glicerol, PEG, aceites, y similares; agentes solubilizantes, humectantes, de suspensión, emulsionantes o espesantes tales como carboximetilcelulosa, gelatina hidrolizada, pluronics, polisorbatos, y similares; agentes quelantes tales como EDTA de calcio, DTPA, y similares; antioxidantes y agentes reductores tales como BHT, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, y similares; conservantes antimicrobianos tales como alcohol bencílico, fenol, parabenos, y similares; tampones y agentes de ajuste del pH, tales como trometamina, fosfato de sodio, acetato de sodio, hidróxido de sodio, y similares; agentes de carga, protectores y ajustadores de tonicidad tales como alanina, albúmina, dextrano, lactosa, sorbitol, cloruro de sodio, histidina, y similares; aditivos especiales tales como simeticona como agente anti-espumante, trehalosa para la reducción de la agregación de proteínas.

La composición que comprende un preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con la invención es una composición farmacéutica y comprende un soporte farmacéuticamente aceptable. "Soporte farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo, agente auxiliar, adyuvante, diluyente, excipiente o soporte con el que se

administra el preparado de fibrinógeno de la invención. Ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, agua, solución salina tamponada, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), dimetilsulfóxido (DMSO), aceites, detergentes, agentes de suspensión o mezclas adecuadas de los mismos. Soportes y formulaciones farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995) y "Remington: The Science And Practice Of Pharmacy " por Alfonso R. Gennaro (Lippincott Williams & Wilkins, 2005).

La composición farmacéutica que comprende un preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con la invención puede ser aplicada por vía tópica y puede incluir soportes que son solubles en agua, absorbentes de agua, insolubles en agua o expandibles en agua. Materiales adecuados incluyen sacáridos tales como mono- y di-sacáridos, incluidos lactosa, manitol y trehalosa, o dextrano y polímeros de dextrano tales como, p. ej., Sephadex, que están disponibles en diferentes tamaños de partículas, almidones, derivados de pululano, ésteres de ácido hialurónico, y similares. Productos de celulosa tales como celulosa microcristalina (gama Avicel), metilcelulosa, carboximetil-celulosa, celulosa microfina o hidroxipropil-celulosa, y otros materiales tales como polivinilpirrolidona (PVP) reticulada, se pueden utilizar solos o en mezcla. También, vehículos adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), que tiene preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 1000; polivinilpirrolidona (PVP), que tiene preferiblemente un peso molecular medio de aproximadamente 50.000; poli(ácido acrílico), PVA, poli (metilviniléter co-anhídrido maleico), poli(óxido de etileno), y dextrano, que tienen típicamente un peso molecular medio de aproximadamente 40.000. Gomas y agentes gelificantes que pueden usarse incluyen, por ejemplo, tragacanto, goma karaya, almidón soluble, gelatina, pectina, goma guar y goma gellan.

Un aditivo particularmente preferido es Emdex®, es decir, una forma hidratada de dextratos (dextrosa cristalizada en aerosol que contiene pequeñas cantidades de oligosacáridos de almidón). Es un producto altamente refinado compuesto de esferas macroporosas blancas, libremente fluyentes y cristalizadas en aerosol con un tamaño medio de partícula de 190- 220 µm.

Un aditivo más preferido es NON-PAREIL SEEDS®: (Esferas de azúcar). Éstas se utilizan en múltiples unidades de fármacos para mejorar la uniformidad del contenido, la liberación consistente y controlada de fármaco y alta estabilidad del fármaco, intervalos de tamaño de 200 a 2000 mm.

La composición farmacéutica que comprende un preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con la invención es adecuada para la administración intravenosa.

Un preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con la invención se puede utilizar para la preparación de un medicamento para el tratamiento de episodios de hemorragia aguda, hiperfibrinólisis, deficiencia en fibrinógeno, ya sea adquirida o congénita, u otros trastornos hemorrágicos.

Con el fin de producir un  $\alpha$ -ext Fib de una manera económicamente viable, se requieren altos niveles de expresión de fibrinógeno intacto, funcional y, por lo tanto, se emplea la producción recombinante. En el contexto de la presente invención, fibrinógeno o una cadena de fibrinógeno está 'en forma intacta' cuando la secuencia de aminoácidos contiene todos los aminoácidos que fueron codificados por la secuencia de nucleótidos, opcionalmente sin los aminoácidos que se separan durante el procesamiento celular normal (secreción). Por lo tanto, las cadenas de alfa-ext que tienen 866 u 847 aminoácidos son ejemplos de una cadena alfa en forma intacta.

La producción recombinante de fibrinógeno tiene muchas ventajas con respecto al uso de materiales derivados de plasma. Estos incluyen su perfil de seguridad preferido, la posibilidad de hacer preparados homogéneos puros de variantes libres de cualquier otro contaminante que proceda de la sangre y el suministro ilimitado. Además, para aplicaciones específicas (p. ej., uso de fibrinógeno como un hemostato intravenoso) se requieren modificaciones post-traducción apropiadas (p. ej., glicosilación). Por lo tanto, se prefiere la expresión en sistemas eucarióticos, en particular, sistemas de mamíferos, más en particular en sistemas de seres humanos.

En una realización preferida, una preparación de fibrinógeno para uso de acuerdo con la invención se prepara por un método que comprende las etapas de:

- proporcionar un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos, secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena de polipéptidos alfa extendida de fibrinógeno;
- transformar una célula eucariota con el vector de expresión;
- mantener la célula eucariótica transformada en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena de polipéptidos alfa extendida de fibrinógeno.

Vectores de expresión para hospedantes eucariotas son conocidos en la técnica y se puede utilizar cualquiera de los vectores convencionalmente utilizados para la expresión en células eucariotas. Un vector de expresión contiene típicamente un promotor enlazado operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos a ser expresada y sitios de unión al ribosoma, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores

aguas arriba y potenciadores. En una realización, se utiliza un vector de expresión para la expresión en células de mamífero tales como por células CHO o PER.C6®. Tales vectores se conocen en la técnica y ejemplos adecuados incluyen plásmidos pcDNA3.1, GATEWAY (Invitrogen), pCMV/Bsd (Invitrogen), vectores pFN (Promega) y numerosos otros sistemas de vectores.

5 En el presente contexto, 'una cadena de polipéptidos alfa extendida de fibrinógeno' puede referirse a una cadena alfa de fibrinógeno de 866 aminoácidos con una secuencia señal, o a una sin una secuencia señal y a cualesquiera variantes de la misma que han surgido a través de polimorfismos genéticos o diferencias en la glicosilación y fosforilación. Un ejemplo adecuado de una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa extendida se da en SEQ ID N° 1. Las expresiones 'cadena alfa' y 'cadena A $\alpha$ ' se utilizan indistintamente en el contexto de la presente invención.

10 La persona experta entenderá que la célula eucariota también debe contener secuencias de ácidos nucleicos que codifican las cadenas beta y gamma del fibrinógeno para que sea capaz de producir una molécula de fibrinógeno. La producción recombinante de fibrinógeno a partir de cadenas alfa, beta y gamma se han descrito antes, véase, por ejemplo, el documento PCT/EP2009/058754, US 6.037.457 o WO 95/023868.

15 En el contexto de la presente invención, las expresiones 'cadena beta' y 'cadena B $\beta$ ' se utilizan indistintamente. Pueden referirse tanto a tipo salvaje como a variantes de la cadena beta, con o sin la secuencia señal. Un ejemplo adecuado de una secuencia de aminoácidos de la cadena beta de fibrinógeno se da en SEQ ID N° 2.

20 En el contexto de la presente invención, el término 'cadena gamma' y 'cadena  $\gamma$ ' se utilizan indistintamente. Pueden referirse tanto a tipo salvaje como a variantes de la cadena gamma, con o sin la secuencia señal. Ejemplos adecuados de una secuencia de aminoácidos de la cadena gamma de fibrinógeno se dan en SEQ ID N° 3 y 4.

25 Preferiblemente, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican una cadena de fibrinógeno están optimizadas. Una secuencia de ácido nucleico optimizada permite la expresión eficaz de fibrinógeno recombinante en forma intacta. Preferiblemente, están optimizadas para la expresión en un sistema de cultivo celular eucariótico, tal como para la expresión en un sistema de cultivo de células COS, células BHK, células NS0, células Sp2/0, células CHO, una célula PER.C6, una célula HEK293 o de células de insecto. Más preferiblemente, están optimizados para la expresión en un sistema de cultivo de células de mamíferos. Lo más preferiblemente, las secuencias de ácidos nucleicos están optimizadas para la expresión en un sistema de cultivo de células humanas tal como para un sistema de cultivo de células PER.C6 o un sistema de cultivo de células HEK293. La secuencia de nucleótidos que está optimizada puede ser ADN o ARN. Preferiblemente, es ADNc.

30 Una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica una cadena alfa extendida, beta o gamma de fibrinógeno muestra una identidad de al menos el 70% con su respectivo homólogo no optimizado. En una realización, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica una cadena  $\alpha$ -ext Fib, B $\beta$  y  $\gamma$  de fibrinógeno muestra una identidad del 70-80% con sus respectivas secuencias no optimizadas. Preferiblemente, las secuencias de nucleótidos optimizadas que codifican una cadena alfa extendida, beta o gamma de fibrinógeno no contienen sitios que actúan en cis tales como los sitios de corte y empalme y señales poli(A).

35 Una secuencia de nucleótidos optimizada para uso de acuerdo con la invención y que codifica una cadena alfa extendida de fibrinógeno no contiene 39 pares de bases de secuencias de repetición directa que normalmente están presentes en el gen que codifica la cadena alfa del fibrinógeno humano. La secuencia de repetición debe ser cambiada sin cambiar la secuencia de proteínas codificada.

40 En una realización preferida, se utiliza una secuencia de nucleótidos optimizada de acuerdo con SEQ ID N° 5 o la parte de esta secuencia sin la señal (nucleótidos 60 - 2598) para expresar la cadena alfa extendida.

45 En otra realización preferida, se utiliza una secuencia de nucleótidos optimizada de acuerdo con SEQ ID N° 6 o la parte de esta secuencia sin la secuencia señal (nucleótidos 93-1473) para expresar la cadena beta.

50 En otra realización preferida, se utiliza una secuencia de nucleótidos optimizada de acuerdo con SEQ ID N° 7 u 8 o la parte de estas secuencias sin una secuencia señal (nucleótidos 51-1311 de SEQ ID N° 7 y nucleótidos 51-1359 de SEQ ID N° 8) para expresar la cadena gamma.

55 Secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención pueden codificar cualquier tipo de cadenas de fibrinógeno. Preferiblemente, codifican las cadenas de fibrinógeno de mamífero, más preferiblemente codifican cadenas de fibrinógeno de primates, lo más preferiblemente codifican cadenas de fibrinógeno humano. También son posibles combinaciones tales como, por ejemplo, una o dos cadenas de fibrinógeno de mamífero en combinación con una o dos cadenas de fibrinógeno de roedores. La expresión recombinante para uso de acuerdo con la presente invención permite niveles de expresión de Fib420 que son similares a los de HMWFib recombinante.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 Análisis de transferencia Western. La pista 1 es un control que contiene fibrinógeno de tipo salvaje derivado de plasma (FIB3, Enzyme Research Laboratories). La pista 2 contiene el sobrenadante del cultivo del clon W115, clones PER.C6 que expresan un  $\alpha$ -ext rhFib. El marcador de peso molecular (MW) se indica a la izquierda.

Figura 2 La imagen muestra un gel de proteína teñido con Coomassie cargado con material de material derivado de plasma degradado con plasmina (ERL FIB3; panel superior, y  $\alpha$ -ext Fib (panel inferior). Las condiciones se indican en la parte superior del gel; y se muestra también el tiempo de incubación (0, 1, 5, 30, 60 y 120 minutos y o/n (durante la noche)). A la derecha del gel se muestra el marcador PM.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1 Preparación de construcciones de ADNc optimizadas

ADNcs que codifican cadenas de polipéptidos de fibrinógeno humanos de  $\alpha$ -ext Fib (Fib420), B $\beta$  y  $\gamma$  se sintetizaron en formato optimizado en codones por GeneArt (Regensburg, Alemania): (i) se separaron sitios de actuación cis (sitios de corte y empalme, señales poli(A)); (ii) se modificó la secuencia de repetición de la cadena A $\alpha$ ; (iii) se incrementó el contenido de GC para la semivida prolongada del ARNm; (iv) se adaptó el uso de codones a CHO (índice de adaptación de codones - CAI- > 0,95).

Los ADNcs optimizados en codones para la cadena  $\alpha$ -ext Fib (SEQ ID N° 5), B $\beta$  (SEQ ID N° 6) y  $\gamma$  (SEQ ID N° 6) se subclonaron en derivados de pcDNA3.1.

A $\alpha$ -extendido (Fib420) en pcDNA3.1(+)*neo*, cadenas B $\beta$  en pcDNA3.1(+)*hygro* y cadena  $\gamma$  en pcDNA3.1(-)*hygro* (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.).

### Ejemplo 2 líneas de células PER.C6 que expresan $\alpha$ -ext Fib humana recombinante.

La generación de líneas celulares PER.C6 productoras de fibrinógeno humano recombinante es similar a la descrita antes en el documento PCT/EP2009/058754. En resumen, las células se cultivaron en suspensión en medio MAb y se transfectaron utilizando el dispositivo de nucleofección AMAXA (programa A-27) y utilizando el Nucleofector kit T con tres vectores que codifican las tres cadenas diferentes de la proteína fibrinógeno humano (cadenas A $\alpha$ -ext, B $\beta$  y  $\gamma$ ) y que contiene las cadenas de ADNc optimizado (SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6 y SEQ ID N° 7, respectivamente).

Después de la transfección y la extensión en placas de 96 pocillos, se transfirieron 325 clones y se seleccionaron en placas de 48 pocillos. Al final de la trayectoria de expansión, se transfirieron 24 clones a matraces con agitador, de los cuales 8 fueron seleccionados para el análisis de la estabilidad y la expresión en el ensayo de cultivo en tandas continuo.

Los rendimientos en cultivo en tandas eran similares a los rendimientos obtenidos con las líneas celulares que expresan la cadena A $\alpha$  en formato de 610 ó 625 aminoácidos, lo que indica que la extensión de la cadena A $\alpha$  no afecta los niveles de expresión. Esto no se esperaba de antemano, ya que el fibrinógeno derivado de plasma sólo contiene 1-3% de la cadena A $\alpha$  extendida en comparación con el fibrinógeno con contenido en la cadena A $\alpha$  610/625. El análisis de proteínas utilizando SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia Western indican que el fibrinógeno recombinante se produce en formato intacto, teniendo la cadena  $\alpha$  el tamaño esperado (Figura 1).

### Ejemplo 3 Purificación de fibrinógeno $\alpha$ -extendido a partir de medio de cultivo de células PER.C6.

Fibrinógeno  $\alpha$ -extendido recombinante humano se purificó a partir de sobrenadante de cultivo celular de acuerdo con métodos estándar. En síntesis, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se añadió al sobrenadante del cultivo a una saturación del 40% y el precipitado se recogió mediante centrifugación. Subsiguientemente, el precipitado se disolvió en tampón de carga TMAE (Tris-HCl 5 mM pH 8,5, Tween-20 al 0,01%), seguido de diálisis para el mismo tampón. A continuación, la disolución de proteínas se cargó en una columna de intercambio de iones Fractogel EMD TMAE (m) 40-90  $\mu$ m (3 ml) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Fibrinógeno  $\alpha$ -extendido recombinante humano se eluyó subsiguientemente utilizando un gradiente de sal continuo de NaCl 0 - 1 M en 20 volúmenes de columna. Fibrinógeno recombinante humano en las fracciones de los picos se precipitó de nuevo añadiendo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a una saturación del 40% y se recogió mediante centrifugación. Finalmente, el material se disolvió en TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM) y se dializó frente a TBS para separar cualquier (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> restante.

### Ejemplo 4 Digestión de plasmina de $\alpha$ -ext rhFib y fibrinógeno derivado del plasma.

La fibrinogenólisis de  $\alpha$ -ext rhFib humano purificado recombinante se sometió a ensayo mediante incubación con plasmina. En síntesis, el fibrinógeno se diluyó en TBST (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, Tween-20 al

0,01%), se añadió  $\text{CaCl}_2$  o EDTA (concentración final 5 mM) y se añadió plasmina (concentración final 10 nM), seguido de incubación a 37°C. A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras y se mezclaron inmediatamente con tampón de muestra de SDS-PAGE (tampón de muestra NuPAGE LDS, Invitrogen, nº de cat NP0007). Las muestras se sometieron entonces a separación por tamaño en un gel de SDS-PAGE no reducido (NuPAGE Tris-Acetato al 3-8%, Invitrogen, nº de cat WG1602). La proteína se visualizó mediante tinción de Coomassie (SimplyBlue SafeStain, Invitrogen, nº de cat LC6060).

Los resultados, tal como se muestran en la Figura 2, indican que la digestión mediada por plasmina de  $\alpha$ -ext rhFib es significativamente más lenta que para el fibrinógeno derivado del plasma. Por ejemplo, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , después de 60 minutos, todo el fibrinógeno derivado del plasma se degrada a las especies de fragmentos D y E. Para  $\alpha$ -ext rhFib esto supone más de 120 minutos y sólo la incubación durante una noche muestra la generación de cantidades sustanciales de fragmento E, que ya están presentes en el producto de digestión del fibrinógeno derivado del plasma después de 30 minutos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ProFibrix BV
- 5 <120> Preparados de fibrinógeno enriquecidos en fibrinógeno con una cadena alfa extendida
- <130> P631WO
- <140> PCT/EP2011/050191
- 10 <141> 07-01-2011
- <150> EP10150391.0
- <151> 08-01-2010
- 15 <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 20 <211> 866
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- 25

```

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

```

ES 2 524 886 T3

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

Gln Trp His Ser Glu Ser Gly Ser Phe Arg Pro Asp Ser Pro Gly Ser  
 385 390 395 400  
 Gly Asn Ala Arg Pro Asn Asn Pro Asp Trp Gly Thr Phe Glu Glu Val  
 405 410 415  
 Ser Gly Asn Val Ser Pro Gly Thr Arg Arg Glu Tyr His Thr Glu Lys  
 420 425 430  
 Leu Val Thr Ser Lys Gly Asp Lys Glu Leu Arg Thr Gly Lys Glu Lys  
 435 440 445  
 Val Thr Ser Gly Ser Thr Thr Thr Thr Arg Arg Ser Cys Ser Lys Thr  
 450 455 460  
 Val Thr Lys Thr Val Ile Gly Pro Asp Gly His Lys Glu Val Thr Lys  
 465 470 475 480  
 Glu Val Val Thr Ser Glu Asp Gly Ser Asp Cys Pro Glu Ala Met Asp  
 485 490 495  
 Leu Gly Thr Leu Ser Gly Ile Gly Thr Leu Asp Gly Phe Arg His Arg  
 500 505 510  
 His Pro Asp Glu Ala Ala Phe Phe Asp Thr Ala Ser Thr Gly Lys Thr  
 515 520 525  
 Phe Pro Gly Phe Phe Ser Pro Met Leu Gly Glu Phe Val Ser Glu Thr  
 530 535 540  
 Glu Ser Arg Gly Ser Glu Ser Gly Ile Phe Thr Asn Thr Lys Glu Ser  
 545 550 555 560  
 Ser Ser His His Pro Gly Ile Ala Glu Phe Pro Ser Arg Gly Lys Ser  
 565 570 575  
 Ser Ser Tyr Ser Lys Gln Phe Thr Ser Ser Thr Ser Tyr Asn Arg Gly  
 580 585 590  
 Asp Ser Thr Phe Glu Ser Lys Ser Tyr Lys Met Ala Asp Glu Ala Gly  
 595 600 605  
 Ser Glu Ala Asp His Glu Gly Thr His Ser Thr Lys Arg Gly His Ala  
 610 615 620  
 Lys Ser Arg Pro Val Arg Asp Cys Asp Asp Val Leu Gln Thr His Pro



ES 2 524 886 T3

<211> 491  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 2

Met Lys Arg Met Val Ser Trp Ser Phe His Lys Leu Lys Thr Met Lys  
 1 5 10 15  
 His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly  
 20 25 30  
 Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg Gly His Arg Pro  
 35 40 45  
 Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro  
 50 55 60  
 Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala Arg Pro Ala Lys Ala Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Thr Gln Lys Lys Val Glu Arg Lys Ala Pro Asp Ala Gly Gly Cys Leu  
 85 90 95  
 His Ala Asp Pro Asp Leu Gly Val Leu Cys Pro Thr Gly Cys Gln Leu  
 100 105 110  
 Gln Glu Ala Leu Leu Gln Gln Glu Arg Pro Ile Arg Asn Ser Val Asp  
 115 120 125  
 Glu Leu Asn Asn Asn Val Glu Ala Val Ser Gln Thr Ser Ser Ser Ser  
 130 135 140  
 Phe Gln Tyr Met Tyr Leu Leu Lys Asp Leu Trp Gln Lys Arg Gln Lys  
 145 150 155 160  
 Gln Val Lys Asp Asn Glu Asn Val Val Asn Glu Tyr Ser Ser Glu Leu  
 165 170 175  
 Glu Lys His Gln Leu Tyr Ile Asp Glu Thr Val Asn Ser Asn Ile Pro  
 180 185 190  
 Thr Asn Leu Arg Val Leu Arg Ser Ile Leu Glu Asn Leu Arg Ser Lys  
 195 200 205

ES 2 524 886 T3

Ile Gln Lys Leu Glu Ser Asp Val Ser Ala Gln Met Glu Tyr Cys Arg  
 210 215 220

Thr Pro Cys Thr Val Ser Cys Asn Ile Pro Val Val Ser Gly Lys Glu  
 225 230 235 240

Cys Glu Glu Ile Ile Arg Lys Gly Gly Glu Thr Ser Glu Met Tyr Leu  
 245 250 255

Ile Gln Pro Asp Ser Ser Val Lys Pro Tyr Arg Val Tyr Cys Asp Met  
 260 265 270

Asn Thr Glu Asn Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Asn Arg Gln Asp Gly  
 275 280 285

Ser Val Asp Phe Gly Arg Lys Trp Asp Pro Tyr Lys Gln Gly Phe Gly  
 290 295 300

Asn Val Ala Thr Asn Thr Asp Gly Lys Asn Tyr Cys Gly Leu Pro Gly  
 305 310 315 320

Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Asp Lys Ile Ser Gln Leu Thr Arg Met Gly  
 325 330 335

Pro Thr Glu Leu Leu Ile Glu Met Glu Asp Trp Lys Gly Asp Lys Val  
 340 345 350

Lys Ala His Tyr Gly Gly Phe Thr Val Gln Asn Glu Ala Asn Lys Tyr  
 355 360 365

Gln Ile Ser Val Asn Lys Tyr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Ala Leu Met  
 370 375 380

Asp Gly Ala Ser Gln Leu Met Gly Glu Asn Arg Thr Met Thr Ile His  
 385 390 395 400

Asn Gly Met Phe Phe Ser Thr Tyr Asp Arg Asp Asn Asp Gly Trp Leu  
 405 410 415

Thr Ser Asp Pro Arg Lys Gln Cys Ser Lys Glu Asp Gly Gly Gly Trp  
 420 425 430

Trp Tyr Asn Arg Cys His Ala Ala Asn Pro Asn Gly Arg Tyr Tyr Trp  
 435 440 445

Gly Gly Gln Tyr Thr Trp Asp Met Ala Lys His Gly Thr Asp Asp Gly

450 455 460

Val Val Trp Met Asn Trp Lys Gly Ser Trp Tyr Ser Met Arg Lys Met  
465 470 475 480

Ser Met Lys Ile Arg Pro Phe Phe Pro Gln Gln  
485 490

- <210> 3
- <211> 437
- <212> PRT
- 5 <213> Homo sapiens
- <400> 3

Met Ser Trp Ser Leu His Pro Arg Asn Leu Ile Leu Tyr Phe Tyr Ala  
1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Ser Ser Thr Cys Val Ala Tyr Val Ala Thr Arg Asp  
20 25 30

Asn Cys Cys Ile Leu Asp Glu Arg Phe Gly Ser Tyr Cys Pro Thr Thr  
35 40 45

Cys Gly Ile Ala Asp Phe Leu Ser Thr Tyr Gln Thr Lys Val Asp Lys  
50 55 60

Asp Leu Gln Ser Leu Glu Asp Ile Leu His Gln Val Glu Asn Lys Thr  
65 70 75 80

Ser Glu Val Lys Gln Leu Ile Lys Ala Ile Gln Leu Thr Tyr Asn Pro  
85 90 95

Asp Glu Ser Ser Lys Pro Asn Met Ile Asp Ala Ala Thr Leu Lys Ser  
100 105 110

Arg Lys Met Leu Glu Glu Ile Met Lys Tyr Glu Ala Ser Ile Leu Thr  
115 120 125

His Asp Ser Ser Ile Arg Tyr Leu Gln Glu Ile Tyr Asn Ser Asn Asn  
130 135 140

Gln Lys Ile Val Asn Leu Lys Glu Lys Val Ala Gln Leu Glu Ala Gln  
145 150 155 160

Cys Gln Glu Pro Cys Lys Asp Thr Val Gln Ile His Asp Ile Thr Gly  
165 170 175

ES 2 524 886 T3

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

Arg Leu Thr Ile Gly Glu Gly Gln Gln His His Leu Gly Gly Ala Lys  
 420 425 430

Gln Ala Gly Asp Val  
 435

- <210> 4
- <211> 453
- <212> PRT
- 5 <213> Homo sapiens
- <400> 4

Met Ser Trp Ser Leu His Pro Arg Asn Leu Ile Leu Tyr Phe Tyr Ala  
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Ser Ser Thr Cys Val Ala Tyr Val Ala Thr Arg Asp  
 20 25 30

Asn Cys Cys Ile Leu Asp Glu Arg Phe Gly Ser Tyr Cys Pro Thr Thr  
 35 40 45

Cys Gly Ile Ala Asp Phe Leu Ser Thr Tyr Gln Thr Lys Val Asp Lys  
 50 55 60

Asp Leu Gln Ser Leu Glu Asp Ile Leu His Gln Val Glu Asn Lys Thr  
 65 70 75 80

Ser Glu Val Lys Gln Leu Ile Lys Ala Ile Gln Leu Thr Tyr Asn Pro  
 85 90 95

Asp Glu Ser Ser Lys Pro Asn Met Ile Asp Ala Ala Thr Leu Lys Ser  
 100 105 110

Arg Lys Met Leu Glu Glu Ile Met Lys Tyr Glu Ala Ser Ile Leu Thr  
 115 120 125

His Asp Ser Ser Ile Arg Tyr Leu Gln Glu Ile Tyr Asn Ser Asn Asn  
 130 135 140

Gln Lys Ile Val Asn Leu Lys Glu Lys Val Ala Gln Leu Glu Ala Gln  
 145 150 155 160

Cys Gln Glu Pro Cys Lys Asp Thr Val Gln Ile His Asp Ile Thr Gly  
 165 170 175

Lys Asp Cys Gln Asp Ile Ala Asn Lys Gly Ala Lys Gln Ser Gly Leu  
 180 185 190

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

ES 2 524 886 T3

Gln Val Arg Pro Glu His Pro Ala Glu Thr Glu Tyr Asp Ser Leu Tyr  
 435 440 445

Pro Glu Asp Asp Leu  
 450

- <210> 5
- <211> 2598
- <212> ADN
- 5 <213> Homo sapiens
- <400> 5

```

atgttcagca tgaggatcgt gtgcctggtg ctgtccgtgg tgggcaccgc ctggaccgcc      60
gacagcggcg agggcgactt cctggccgag ggcggtggcg tgaggggcc caggggtggtg     120
gagaggcacc agagcgctgt caaggacagc gactggccct tctgcagcga cgaggactgg     180
aactacaagt gccccagcgg ctgcaggatg aagggcctga tcgacgaggt gaaccaggac     240
ttaccaaca ggatcaaca gctgaagaac agcctgttcg agtaccagaa gaacaacaag     300
gacagccaca gcctgaccac caacatcatg gaaatcctga ggggcgattt ctctagcgcc     360
aacaacaggg acaacaccta caacagggtg tccgaggacc tgagggtccag gatcgagggtg     420
ctgaagagga aggtgatcga gaaggtgcag cacatccagc tgctgcagaa gaacgtcagg     480
gcccagctgg tcgacatgaa gaggtggaa gtggacatcg acatcaagat caggtcctgc     540
aggggcagct gcagccgggc tctggctaga gaggtggacc tgaaggacta cgaggaccag     600
cagaaacagc tggaacagggt gatcgccaag gacctgctgc ccagcagggg caggcagcac     660
ctgccccctga tcaagatgaa gcccgtgcc gacctggtgc ccggcaactt caagagccag     720
ctgcagaaag tgcccccgga gtggaaggcc ctgaccgaca tgccccagat gaggatggaa     780
ctggaaggcc caggcggcaa cgagatcacc aggggcggca gcaccagcta cggcaccggc     840
agcgagaccg agagccccag gaaccccagc agcgccggca gctggaactc cggcagcagc     900
ggcccaggct ccaccggcaa caggaacccc ggctccagcg gcaccggcgg cacagccacc     960
tggaagcccg gcagctccgg ccctggcagc accggctctt ggaacagcgg cagctctggc    1020
accgggagca caggcaacca gaaccaggc agccccaggc ctggctctac cgggacctgg    1080
aaccaggct cctccgagag gggctctgcc ggccactgga ccagcgagag cagcgtgagc    1140
ggcagcacag gccagtggca cagcgagtcc ggcagcttca ggcccgacag ccccggcagc    1200
ggcaacgcca ggccaacaa ccccactgg ggcaccttcg aggaagtgag cggcaacgtg    1260
agccccggca ccaggcggga gtaccacacc gagaagctgg tgaccagcaa gggcgacaaa    1320
gagctgagga ccggcaaaga aaaggtgacc agcggctcta ccaccaccac caggcgggagc    1380

```

15

ES 2 524 886 T3

tgcagcaaga ccgtgaccaa gacagtgatc ggccccgacg gccacaaaga ggtgaccaa 1440  
 gaagtcgtga ccagcgagga cggcagcgac tgccccgagg ccatggacct gggcaccctg 1500  
 agcggcatcg gcaccctgga cggcttcagg cacaggcacc ccgacgaggc cgccttcttc 1560  
 gacaccgcca gcaccgcaa gaccttcccc ggcttcttca gccccatgct gggcgagttc 1620  
 gtgtccgaga ccgagtcccc cggcagcgag agcggcatct tcaccaacac caaagagtcc 1680  
 agcagccacc atccccgat cgctgagttc cccagcaggg gcaagagcag ctcttacagc 1740  
 aagcagttca ccagcagcac cagctacaac aggggcgaca gcaccttca gagcaagagc 1800  
 tacaagatgg ccgacgaggc cggctctgag gccgaccacg agggcaccca cagcaccaag 1860  
 aggggccacg ccaagagcag gcccgtgagg gactgcgacg acgtgctgca gaccaccccc 1920  
 agcggcacc agtctggcat ctcaacatc aagctgcccc gcagcagcaa gatcttcagc 1980  
 gtgtactgcg accaggaaac cagcctgggc ggctggctgc tgatccagca gaggatggac 2040  
 ggcagcctga acttcaacag gacctggcag gactacaaga ggggcttcgg ctccctgaac 2100  
 gacgagggcg agggcgagtt ctggctgggc aacgactacc tgcacctgct gaccagagg 2160  
 ggatctgtcc tgagggtcga gctggaagat tgggccggca acgaggccta cgccgagtac 2220  
 cacttcagag tgggcagcga ggccgagggc tacgctctgc aggtgtccag ctacgagggc 2280  
 acagccggcg acgcccgat cgagggcagc gtggaagagg gcgccgagta caccagccac 2340  
 aacaacatgc agttctccac cttcgacagg gacgccgacc agtgggagga aaactgccc 2400  
 gaggtgtacg gcggaggggtg gtggtacaac aactgccagg ccgccaacct gaacggcatc 2460  
 tactaccag gcggcagcta cgacccaggg aacaacagcc cctacgagat cgagaacggc 2520  
 gtggtgtggg tgtccttcag aggcgccgac tacagcctga gggccgtgag gatgaagatc 2580  
 agccccctgg tgacccag 2598

<210> 6  
 <211> 1473  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

atgaagagga tgggtctctg gtccttccac aagctgaaaa caatgaagca cctgctcctc 60  
 ctctcctct gcgtgttctt ggtgaagagc cagggcgtga acgacaacga agagggcttc 120  
 ttcagcgcca gaggacaccg ccccctggac aagaagagag aagaggcccc cagcctgaga 180  
 cccgccccac ccccaatcag cggcggaggg tacagagcca ggcccccaa ggctgccgcc 240  
 acccagaaga aggtcgaacg gaaggctccc gacgccggag gatgcctgca cgccgacccc 300  
 gacctgggcg tgctgtgccc caccggctgc cagctgcagg aagctctgct ccagcaggaa 360

10

15

ES 2 524 886 T3

aggcccatca gaaacagcgt ggacgagctg aacaacaacg tggaggccgt gagccagacc 420  
 agcagcagca gcttccagta catgtacctg ctgaaggacc tgtggcagaa gaggcagaag 480  
 caggtcaaag acaacgagaa cgtggtgaac gagtacagca gcgagctgga gaagcaccag 540  
 ctgtacatcg acgagaccgt gaacagcaat atcccaacca acctgagggt gctgagaagc 600  
 atcctggaga acctgaggtc caagatccag aagctggaga gcgacgtcag cgcccagatg 660  
 gagtactgca ggacccccctg caccgtgtcc tgcaacatcc cagtgggtgtc cggcaaggaa 720  
 tgcgaggaaa tcatcaggaa gggcggcgag accagcgaga tgtacctgat ccagccccgac 780  
 agcagcgtga agccctacag ggtgtactgc gacatgaaca ccgagaatgg gggctggacc 840  
 gtcacccaga acaggcagga cggcagcgtg gacttcggca ggaagtggga cccctacaag 900  
 cagggtctcg gcaacgtggc caccaacacc gacggcaaga actactgagg cctgcctggc 960  
 gagtattggc tgggaaacga caagatcagc cagctgacca ggatgggccc aaccgagctg 1020  
 ctgatcgaga tggaggactg gaagggcgac aaggtgaaag cccactacgg cggcttcacc 1080  
 gtgcagaacg aggccaacaa gtaccagatc agcgtgaaca agtacagggg caccgccggc 1140  
 aacgccctga tggacggcgc ctcccagctg atgggcgaga acaggaccat gaccatccac 1200  
 aacggcatgt tcttcagcac ctacgacagg gacaacgacg gctggctgac cagcgacccc 1260  
 agaaagcagt gcagcaagga agatggcgga ggatgggtgtt acaacaggtg ccacgccgcc 1320  
 aaccccaacg gcaggtacta ctggggcgga cagtacacct gggacatggc caagcacggc 1380  
 accgacgacg gcgtgggtgtg gatgaactgg aaggggtcct ggtacagcat gaggaagatg 1440  
 agcatgaaga tcaggccatt cttccacag cag 1473

<210> 7  
 <211> 1311  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7

atgagctggt ccctgcaccc caggaacctg atcctgtact tctacgccct gctgttcctg 60  
 agcagcakat gcgtgccta tgtggctacc agggacaact gctgcatcct ggacgagagg 120  
 ttcggcagct actgccccac cacctgcggc atcggcgact ttctgagcac ctaccagacc 180  
 aaggtggaca aggacctgca gagcctggag gacatcctgc accaggtgga gaacaagacc 240  
 agcagagtgga agcagctgat caaggccatc cagctgacct acaaccccga cgagagcagc 300  
 aagcccaaca tgatcgacgc cgccaccctg aagagcagga agatgctgga ggaaatcatg 360  
 aagtacgagg ccagcatcct gaccacgac agcagcatca gatacctgca ggaaatctac 420  
 aacagcaaca accagaagat cgtcaacctg aaggaaaagg tcgcccagct ggaagcccag 480

10

15

ES 2 524 886 T3

tgccaggaac cctgcaagga caccgtgcag atccacgaca tcaccggcaa ggactgccag 540  
 gacatcgcca acaagggcgc caagcagagc ggctgtact tcatcaagcc cctgaaggcc 600  
 aaccagcagt tcctggtgta ctgcgagatc gacggcagcg gcaacggctg gaccgtgttc 660  
 cagaagaggc tggacggcag cgtggacttc aagaagaact ggattcagta caaggaaggc 720  
 ttcggccacc tgagccccac cggcaccacc gagttctggc tgggcaacga gaagatccac 780  
 ctgatcagca cccagagcgc catcccatac gccctgaggg tggagctgga ggactggaac 840  
 ggcaggacca gcaccgccga ctacgccatg ttcaaagtgg gacccgaggc cgacaagtac 900  
 aggtgacct acgcctactt tgccggaggg gacgctggcg acgccttcga cggcttcgac 960  
 ttcggcgagc accccagcga caagttcttc accagccaca acggcatgca gttcagcacc 1020  
 tgggacaacg acaacgacaa gttcgagggc aactgcgccg agcaggacgg ctccgggtgg 1080  
 tggatgaaca agtgccacgc cgggcacctg aacggcgtgt actaccaggc cggcacctac 1140  
 agcaaggcca gcacccccaa cggctacgac aacggcatca tctgggccac ctggaaaacc 1200  
 aggtggtaca gcatgaaaaa aaccaccatg aagatcatcc cattcaacag actgaccatc 1260  
 ggcgagggcc agcagcacca cctgggcgga gccaaagcagg ctggcgacgt g 1311

<210> 8  
 <211> 1359  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 8

atgagctggt ccctgcacc caggaacctg atcctgtact tctacgccct gctgttcctg 60  
 agcagcacat gcgtgccta tgtggctacc agggacaact gctgcatcct ggacgagagg 120  
 ttcggcagct actgccccac cacctgcggc atcgccgact ttctgagcac ctaccagacc 180  
 aaggtggaca aggacctgca gagcctggag gacatcctgc accaggtgga gaacaagacc 240  
 agcagagtgga agcagctgat caaggccatc cagctgacct acaacccccga cgagagcagc 300  
 aagcccaaca tgatcgacgc cgccaccctg aagagcagga agatgctgga ggaaatcatg 360  
 aagtacgagg ccagcatcct gaccacgac agcagcatca gatacctgca ggaaatctac 420  
 aacagcaaca accagaagat cgtcaacctg aaggaaaagg tcgcccagct ggaagcccag 480  
 tgccaggaac cctgcaagga caccgtgcag atccacgaca tcaccggcaa ggactgccag 540  
 gacatcgcca acaagggcgc caagcagagc ggctgtact tcatcaagcc cctgaaggcc 600  
 aaccagcagt tcctggtgta ctgcgagatc gacggcagcg gcaacggctg gaccgtgttc 660  
 cagaagaggc tggacggcag cgtggacttc aagaagaact ggattcagta caaggaaggc 720  
 ttcggccacc tgagccccac cggcaccacc gagttctggc tgggcaacga gaagatccac 780

10

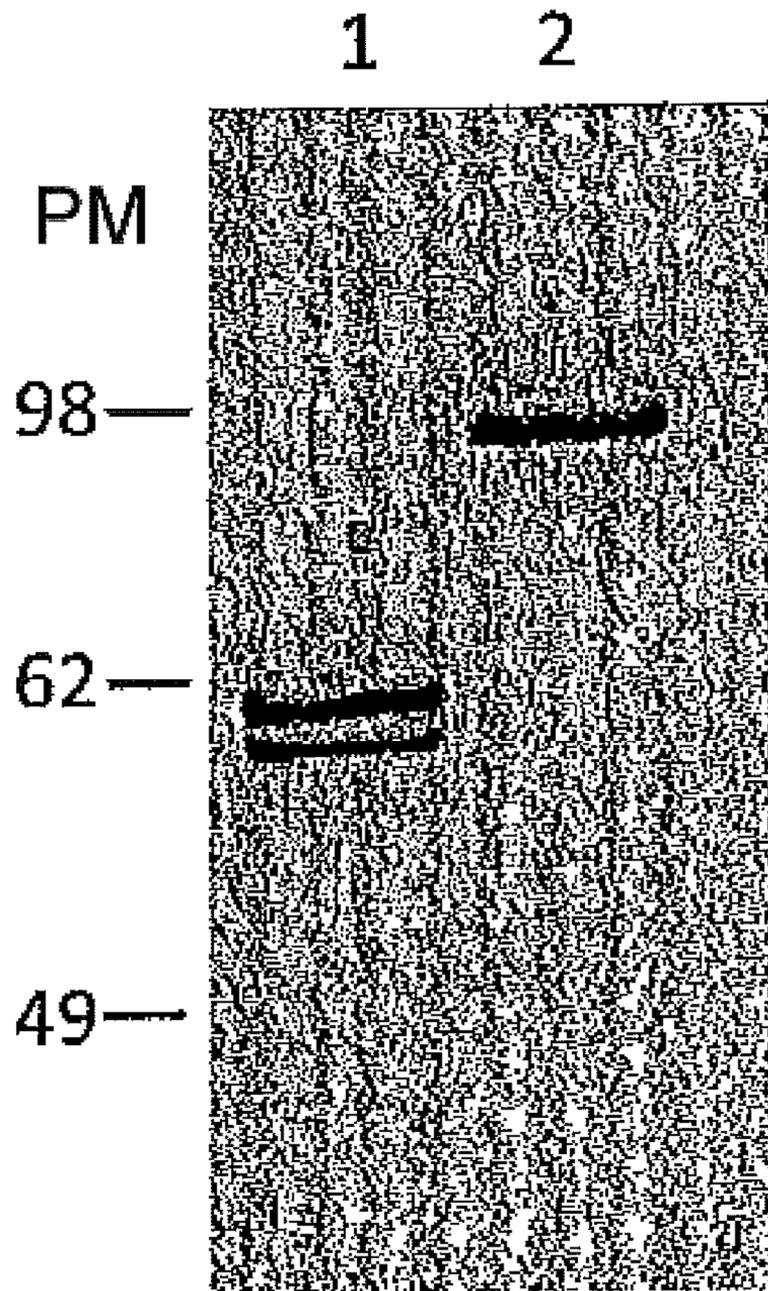
15

ES 2 524 886 T3

ctgatcagca	cccagagcgc	catcccatac	gccctgaggg	tggagctgga	ggactggaac	840
ggcaggacca	gcaccgccga	ctacgccatg	ttcaaagtgg	gacccgaggc	cgacaagtac	900
aggctgacct	acgcctactt	tgccggaggg	gacgctggcg	acgccttcga	cggttcgac	960
ttcggcgacg	acccagcga	caagttcttc	accagccaca	acggcatgca	gttcagcacc	1020
tgggacaacg	acaacgacaa	gttcgagggc	aactgcgccg	agcaggacgg	ctccgggtgg	1080
tggatgaaca	agtgccacgc	cgggcacctg	aacggcgtgt	actaccaggg	cggcacctac	1140
agcaaggcca	gcaccccaa	cggctacgac	aacggcatca	tctgggccac	ctggaaaacc	1200
aggtggtaca	gcatgaaaaa	aaccacatg	aagatcatcc	cattcaacag	actgaccatc	1260
ggcgagggcc	agcagcacca	cctgggcgga	gccaaagcagg	tgcggccaga	gcaccccgcc	1320
gagacagagt	acgacagcct	gtaccccgag	gacgacctg			1359

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un preparado de fibrinógeno que contiene al menos 95% (p/p) de fibrinógeno basado en la proteína total, y en donde al menos 10% (p/p) del fibrinógeno está en forma de Fib420, para uso en un método para tratar episodios de hemorragia aguda, hiperfibrinólisis, deficiencia en fibrinógeno u otros trastornos hemorrágicos, y en donde el Fib420 se prepara mediante tecnología recombinante.
- 10 2. Un preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el Fib240 se prepara mediante un método que comprende:  
- proporcionar un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena de polipéptidos alfa extendida de fibrinógeno;  
- transformar una célula de mamífero con el vector de expresión;  
- mantener la célula de mamífero transformada en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena de polipéptidos alfa extendida de fibrinógeno.
- 15 3. Un preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica una cadena de polipéptidos alfa extendida de fibrinógeno está optimizada para la expresión en un sistema de cultivo de células de mamífero.
- 20 4. Un preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia optimizada de acuerdo con SEQ ID N° 5.
5. Un preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con las reivindicaciones 2-4, en donde la célula de mamífero es una célula humana.
- 25 6. Un preparado de fibrinógeno para uso de acuerdo con las reivindicaciones 2-5, en donde la célula de mamífero es una célula PER.C6.



**Fig. 1**

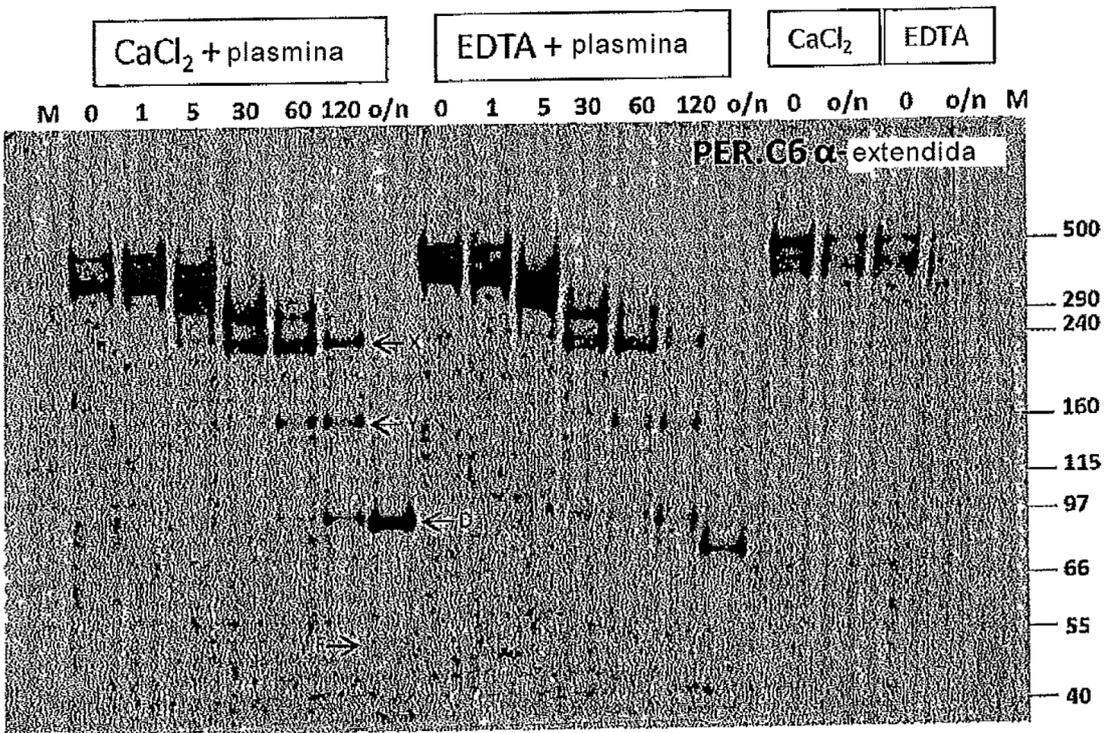
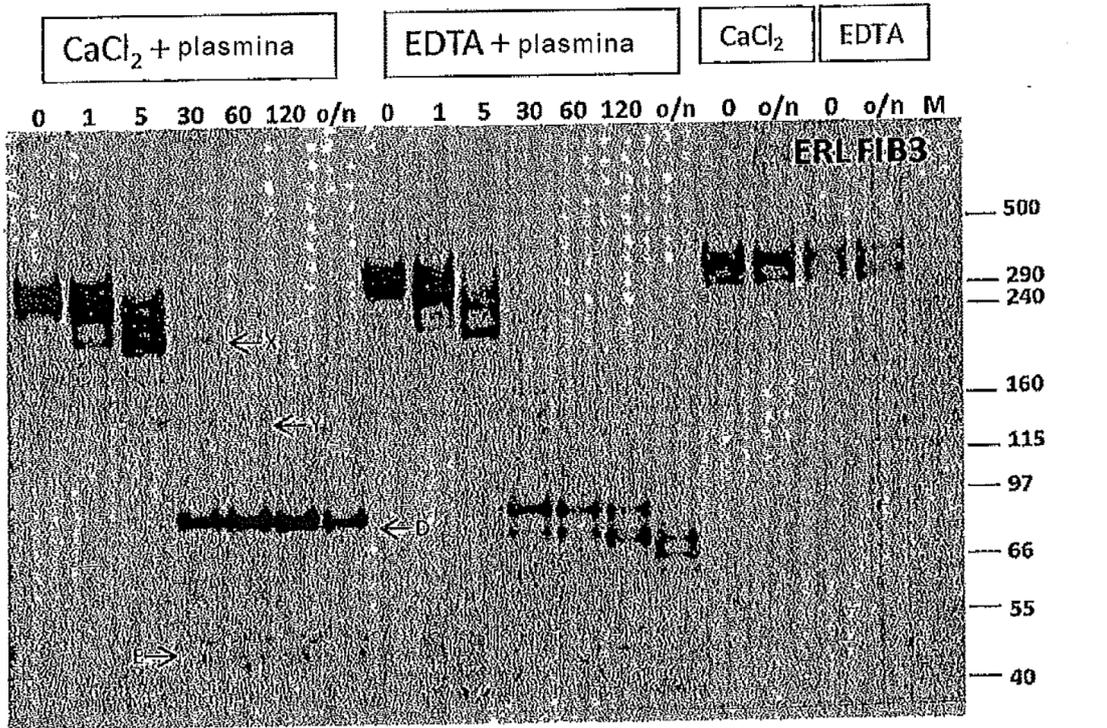


Fig. 2