

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 102**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)  
**C12N 9/64** (2006.01)  
**A61K 38/36** (2006.01)  
**C07K 14/745** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2004 E 10184851 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2298347**

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

30 Prioridad:

**06.05.2003 US 468837 P**

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

**02.02.2016**

73 Titular/es:

**BIOGEN HEMOPHILIA INC. (100.0%)  
250 Binney Street  
Cambridge MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**RIVERA, DANIEL S;  
PETERS, ROBERT T. y  
BITONTI, ALAN J**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 558 102 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Proteínas quiméricas del factor de coagulación para el tratamiento de un trastorno hemostático

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere generalmente al campo de terapéuticos para trastornos hemostáticos. Más específicamente, la invención se refiere a una proteína quimérica para el tratamiento de un trastorno hemostático.

**Antecedentes de la invención**

10 Los trastornos hemostáticos se caracterizan por hemorragia incontrolada que resulta de la incapacidad o capacidad reducida de formar coágulos de fibrina. Los trastornos hemostáticos pueden resultar de un defecto genético o pueden adquirirse como resultado de una afección médica no relacionada (por ejemplo, quimioterapia de cáncer y relacionada, enfermedad autoinmune) (Kasper 2000, *Hemophilia* 6(Sup):13; Cohen et al. 1996, *Baillere's Clinical Hematology* 9(2):331). Típicamente, los trastornos hemostáticos resultan de la deficiencia de un factor de la coagulación sanguínea específico. Los ejemplos clásicos de trastornos hemostáticos incluyen hemofilia A, que resulta de una deficiencia en el factor VIII; hemofilia B (Enfermedad de Navidad), que resulta de una deficiencia en el factor IX; y enfermedad de von Willebrand, que resulta en un defecto en el factor de von Willebrand. El factor de von Willebrand circula en asociación con el factor VIII y lo estabiliza. Media la adherencia de las plaquetas entre sí y a paredes de vasos sanguíneos dañadas. Además, los trastornos hemostáticos menos comunes incluyen deficiencia en el factor XI (deficiencia PTA), deficiencia en el factor XII, así como deficiencias o anomalías estructurales en fibrinógeno, protrombina, factor V, factor VII, factor X, o factor XIII (Kasper 2000, *Hemophilia* 6(Sup):13).

20 Los factores de coagulación actúan en concierto unos con otros en una cascada de coagulación que finalmente resulta en la formación de un coágulo de fibrina (Figura 1). Estos factores pueden existir en un estado quiescente como una proenzima o zimógeno o en un estado enzimático activado cuando se estimulan para formar un coágulo. La estimulación de estos factores puede ocurrir por dos rutas distintas, la ruta intrínseca y la ruta extrínseca. La ruta intrínseca se refiere a aquellas reacciones que dan lugar a la formación de coágulos a través de la utilización de factores presentes sólo en el plasma. Por el contrario, la ruta extrínseca se refiere a aquellas reacciones que dan lugar a la formación de coágulos a partir de la liberación de factor tisular unido a membrana después de la disrupción del endotelio de los vasos.

30 El factor VII participa en ambas rutas escindiendo el factor X en el factor Xa activado conjuntamente con factor tisular en la ruta extrínseca o interaccionando con el factor IXa en la ruta intrínseca. El factor VII actúa aguas abajo e independientemente de los factores VIII y IX cuando actúa a través de la ruta extrínseca, sorteando así la necesidad de estos factores de coagulación. Por lo tanto, es un candidato terapéutico atractivo para tratar trastornos hemostáticos, especialmente Hemofilia A y B. (Patente U.S. No. 6.310.183; WO 01/58935).

35 El factor VII es una proteína plasmática dependiente de vitamina K sintetizada en el hígado y secretada en la sangre como una glicoproteína de cadena única con un peso molecular de 53 kDa (Broze et al. 1980, *J. Biol. Chem.* 255:1242). El zimógeno de factor VII se convierte en una forma activada (FVIIa) por escisión proteolítica en un único sitio, Arg152-Ile153, resultando en dos cadenas, pesada (254 aminoácidos) y ligera (154 aminoácidos) unidas por un único enlace disulfuro (Hagen et al. 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83:2412). La forma activada del factor VII se une a factor tisular, que entonces convierte el factor X en factor Xa. El factor Xa se requiere para convertir protrombina en trombina, que convierte fibrinógeno en fibrina como una etapa final en la formación de un coágulo de fibrina.

40 El factor VII experimenta modificaciones posteriores a la traducción, incluyendo la carboxilación dependiente de vitamina K que resulta en diez residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico en la región N-terminal de la molécula. Otras modificaciones posteriores a la traducción incluyen unión de restos de azúcar en dos sitios de glicosilación unidos por N naturales en la posición 145 y 322, respectivamente, y en dos sitios de glicosilación unidos por O naturales en la posición 52 y 60, respectivamente (WO 01/58935).

45 La terapia tradicional para trastornos hemostáticos requiere el reemplazo parenteral de factores de coagulación deficientes tales como factor VII, factor VIII o factor IX (véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 6.310.183 y 4.784.950). El tratamiento implica frecuentemente tanto la administración de factores de coagulación para tratar episodios hemorrágicos agudos así como la administración de factores de coagulación para impedir profilácticamente la aparición de episodios hemorrágicos futuros. Se ha encontrado que la profilaxis reduce el riesgo de desarrollar problemas en las articulaciones y artritis asociada con episodios hemorrágicos frecuentes (Petrini 2001, *Hemophilia* 7:99; Fischer et al. 2002, *Blood* 99(7):2337).

55 Las terapias tradicionales, sin embargo, tienen muchos problemas asociados. Actualmente, los factores de coagulación deben administrarse parenteralmente con el fin de conseguir dosis efectivas ya que hasta la fecha los métodos no invasivos no han tenido éxito en conseguir niveles terapéuticos. Los problemas asociados con la administración parenteral incluyen oclusión del sitio de inyección, dolor e infección. El uso de un catéter en línea incrementa el riesgo de todos estos eventos. Los problemas específicos asociados con la administración parenteral de factores de coagulación a infantes y niños pequeños incluyen acceso venoso central. Además, la administración

parenteral de factores de coagulación corre el riesgo de precipitar un episodio hemorrágico. Estos problemas son particularmente relevantes cuando el paciente está siendo sometido a administración profiláctica regular de un factor de la coagulación.

5 Los factores de coagulación tal como factor IX y factor VIII deben proporcionarse frecuentemente y en dosis altas lo que resulta en el desarrollo de anticuerpos inhibidores frente al factor de la coagulación en un número significativo de pacientes (véanse, por ejemplo, Nilsson 1992, *Transfusion Medicine Review* 6(4):285; Cohen et al. 1996, *Bailliere's Clinical Hematology* 9(2):331).

10 Un aspecto de la presente descripción proporciona un tratamiento más efectivo y seguro para trastornos hemostáticos. Otro aspecto de la presente descripción proporciona una vida media sérica incrementada y biodisponibilidad incrementada de los terapéuticos administrados a través de medios no invasivos para el tratamiento de trastornos hemostáticos reduciendo de esta manera el riesgo de incurrir en un episodio hemorrágico, infección y oclusión del sitio de inyección asociados con la administración parenteral. Otro aspecto de la presente descripción proporciona terapia para trastornos hemostáticos con riesgo reducido, comparado con las terapias actuales, de desarrollar anticuerpos inhibidores frente al factor de la coagulación. Otro aspecto más de la presente descripción proporciona un tratamiento profiláctico de un trastorno hemostático.

15 Los aspectos de la presente descripción proporcionan una proteína quimérica comprendida por al menos un factor de la coagulación y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, en la que el factor de la coagulación es capaz de estimular la coagulación de la sangre y/o la formación de coágulos de fibrina.

20 Las proteínas quiméricas que comprenden una parte Fc de una inmunoglobulina son conocidas (véanse, por ejemplo, las Patentes U. S. Nos. 6.030.613, 6.086.875, 6.485.726, y la Solicitud PCT No. US/02/21335) y aunque se han descrito previamente las proteínas quiméricas que comprenden factores de coagulación mutantes sin actividad de coagulación, e inmunoglobulinas (WO 01/02439), no se han descrito proteínas quiméricas que comprenden un factor de la coagulación (es decir, que tienen actividad de coagulación) y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina. Factor de la coagulación como se define más adelante y se usa en la presente memoria se refiere a cualquier molécula con actividad de coagulación.

### Resumen de la invención

30 La presente descripción, incluyendo la presente invención, se refiere a una proteína quimérica mejorada para tratar trastornos hemostáticos. La presente descripción, incluyendo la presente invención, proporciona una proteína quimérica para tratar un trastorno hemostático que puede administrarse parenteralmente o no invasivamente (por ejemplo, mediante una ruta pulmonar, nasal, u oral). La presente descripción, incluyendo la presente invención, se refiere así a una proteína quimérica que comprende al menos un factor de la coagulación y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina.

35 La presente descripción también se refiere a un método para tratar un trastorno hemostático que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína quimérica que comprende al menos un factor de la coagulación y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina.

40 La presente descripción también se refiere a un método para preparar una proteína quimérica que comprende al menos un factor de la coagulación y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina; comprendiendo dicho método transfectar una célula con una construcción de ADN que comprende una primera secuencia de ADN que codifica al menos un factor de la coagulación unido de manera operativa a una segunda secuencia de ADN que codifica al menos una parte de una inmunoglobulina; cultivar dicha célula en condiciones tales que la proteína quimérica se expresa; y aislar dicha proteína quimérica de dicha célula.

La presente descripción también se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica al menos un factor de la coagulación y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina.

45 La presente descripción también se refiere a una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que codifica al menos un factor de la coagulación y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina.

50 Tomando como base la descripción contenida en la presente memoria, la presente invención proporciona una proteína quimérica que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en la que dicha primera cadena comprende una región constante de inmunoglobulina o parte de ésta, que es una pareja de unión del receptor de Fc neonatal (FcRn), y un factor de la coagulación, y en la que dicha segunda cadena comprende una región constante de inmunoglobulina o parte de ésta, que es una pareja de unión de FcRn, sin un factor de la coagulación.

La presente invención también proporciona la proteína quimérica de la invención, para uso en un método de tratamiento, por ejemplo, para uso en el tratamiento de un trastorno hemostático.

55 La presente invención proporciona además una primera construcción de ADN y una segunda construcción de ADN que conjuntamente codifican la proteína quimérica de la invención, en la que la primera construcción de ADN

codifica la primera cadena de dicha proteína quimérica y la segunda construcción de ADN codifica la segunda cadena de dicha proteína quimérica. La presente invención también proporciona un vector que comprende dicha primera y segunda construcciones de ADN de la invención, o un primer vector que codifica dicha primera construcción de ADN y un segundo vector que codifica dicha segunda construcción de ADN.

- 5 La presente invención proporciona además adicionalmente una célula huésped que comprende dicha primera y segunda construcciones de ADN de la invención, o una célula huésped que comprende dicho vector o vectores de la invención, así como un método para preparar la proteína quimérica de la invención, en el que el método comprende cultivar una célula huésped de la invención.

- 10 Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína quimérica de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 15 Aún más, la presente invención proporciona una proteína quimérica que tiene una parte monomérica y una parte dimerica, en la que la parte dimerica comprende dos regiones constantes de inmunoglobulina o partes de éstas, cada una de las cuales es una pareja de unión del receptor Fc neonatal (FcRn), y la parte monomérica comprende un factor de la coagulación que está unido a una de las dos regiones constantes de inmunoglobulina o partes de éstas.

Los objetos y ventajas adicionales de la invención se mostrarán en parte en la descripción que sigue, y en parte serán obvios a partir de la descripción, o pueden aprenderse por la práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención se descubrirán y alcanzarán mediante los elementos y combinaciones destacados particularmente en las reivindicaciones adjuntas.

- 20 Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son sólo ejemplares y explicativas y no son restrictivas de la invención, según se reivindica.

#### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un diagrama que muestra la ruta extrínseca e intrínseca de la cascada de la coagulación.

La Figura 2 es un diagrama de las formas inactiva y activa del factor VIIa-Fc.

- 25 La Figura 3A es la secuencia de aminoácidos de una proteína quimérica que comprende el factor VIIa y un fragmento Fc de una inmunoglobulina (SEQ ID NO:1).

La Figura 3B es la secuencia de aminoácidos de un fragmento Fc de una inmunoglobulina (SEQ ID NO:2).

La Figura 3C es la secuencia de ácido nucleico de un fragmento Fc de una inmunoglobulina (SEQ ID NO:3).

- 30 La Figura 3D es la secuencia de ácido nucleico de una proteína quimérica que comprende el factor VIIa y un fragmento Fc de una inmunoglobulina (SEQ ID NO:4).

La Figura 4 es un diagrama de resultados de un ensayo STA-CLOT que muestran que factor VIIa-Fc tiene actividad de coagulación significativa.

La Figura 5 es un diagrama que muestra que factor VIIa-Fc se une al receptor Fc neonatal humano soluble (shFcRn).

- 35 La Figura 6 demuestra los niveles plasmáticos con el tiempo para factor VIIa-Fc administrado oralmente en ratas neonatales.

- 40 La Figura 7 compara la captación oral en ratas neonatales de híbridos monómero/dímero Factor VIIa-Fc que comprenden dos cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada cadena al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y en la que el factor VII está unido sólo a una de las dos cadenas frente a homodímeros que comprenden dos cadenas polipeptídicas en la que ambas cadenas comprenden al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y ambas cadenas también comprenden el factor VII.

- 45 La Figura 8A demuestra los niveles plasmáticos con el tiempo de factor VIIa-Fc administrado intravenosamente a minicerdos, en el que el factor VIIa-Fc es un híbrido monómero/dímero que comprende dos cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada cadena al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y en la que el factor VII está unido sólo a una de las dos cadenas.

La Figura 8B demuestra actividad de coagulación con el tiempo de factor VIIa-Fc administrado intravenosamente a minicerdos, en el que el factor VIIa-Fc es un híbrido monómero/dímero que comprende dos cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada cadena al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y en la que el factor VII está unido sólo a una de las dos cadenas.

La Figura 9A es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica Factor IX-Fc. En la secuencia está incluido el péptido señal (subrayado) que se escinde por la célula y el propéptido (en negrita) que es reconocido por la  $\gamma$  carboxilasa dependiente de vitamina K que modifica el Factor IX para conseguir actividad completa. La secuencia se escinde posteriormente por PACE para rendir Factor IX-Fc.

- 5 La Figura 9B es la secuencia de ácido nucleico de la proteína quimérica Factor IX-Fc. En la secuencia está incluido el péptido señal (subrayado) y el propéptido (en negrita) que es reconocido por la  $\gamma$  carboxilasa dependiente de vitamina K que modifica el Factor IX para conseguir actividad completa. La secuencia traducida se escinde posteriormente por PACE para rendir Factor IX-Fc maduro.

#### Resumen de las secuencias

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

10

#### Descripción de las realizaciones

##### A. Definiciones

**Etiqueta de afinidad**, tal y como se usa en la presente memoria, significa una molécula unida a una segunda molécula de interés, capaz de interactuar con una pareja de unión específica para el propósito de aislar o identificar dicha segunda molécula de interés.

**Análogos de**, o proteínas o péptidos o sustancialmente idéntico a las proteínas quiméricas de la invención, tal y como se usa en la presente memoria, significa que una secuencia de aminoácidos relevante de una proteína o un péptido es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ó 100% idéntica a una secuencia dada. Como ejemplo, dichas secuencias pueden ser variantes derivadas de varias especies, o pueden derivar de la secuencia dada por truncamiento, delección, sustitución o adición de aminoácidos. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina por algoritmos de alineamiento estándar tales como, por ejemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST) descrito en Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, el algoritmo de Needleman et al. (1970) *J. Mol. Biol.*, 48:444-453; el algoritmo de Meyers et al. (1988) *Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17; o Tatusova et al. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.*, 174:247-250, etc. Dichos algoritmos se incorporan en los programas BLASTN, BLASTP y "BLAST 2 Sequences" (véase [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). Cuando se utilizan dichos programas, pueden usarse los parámetros por defecto. Por ejemplo, para secuencias de nucleótidos pueden usarse los ajustes siguientes para "BLAST 2 Sequences": programa BLASTN, recompensa para concordancia 2, penalización para falta de concordancia -2, penalizaciones para apertura de hueco y extensión de hueco 5 y 2 respectivamente, x\_dropoff de hueco 50, esperado 10, tamaño de palabra 11, filtro ACTIVADO. Por ejemplo, para secuencias de aminoácidos pueden usarse los ajustes siguientes para "BLAST 2 Sequences": programa BLASTP, matriz BLOSUM62, penalizaciones para apertura de hueco y extensión de hueco 11 y 1 respectivamente, x\_dropoff de hueco 50, esperado 10, tamaño de palabra 3, filtro ACTIVADO.

**Biodisponibilidad**, tal y como se usa en la presente memoria, significa el grado y proporción a las que una sustancia se absorbe en un sistema vivo o se vuelve disponible en el sitio de la actividad fisiológica.

**Una proteína quimérica**, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier proteína comprendida por una primera secuencia de aminoácidos derivada de una primera fuente, unida, covalentemente o no covalentemente, a una segunda secuencia de aminoácidos derivada de una segunda fuente, en la que la primera y segunda fuente no son la misma. Una primera fuente y una segunda fuente que no son la misma pueden incluir dos entidades biológicas diferentes, o dos proteínas diferentes de la misma entidad biológica, o una entidad biológica y una entidad no biológica. Una proteína quimérica puede incluir, por ejemplo, una proteína derivada de al menos 2 fuentes biológicas diferentes. Una fuente biológica puede incluir cualquier secuencia de ácido nucleico o aminoácidos que no se produce sintéticamente (por ejemplo, una secuencia genómica o de ADNc, un plásmido o vector viral, un virión nativo o un mutante o análogo, como se describe adicionalmente en la presente memoria, de cualquiera de los anteriores). Una fuente sintética puede incluir una secuencia de proteína o ácido nucleico que se produce químicamente y no por un sistema biológico (por ejemplo, síntesis en fase sólida de secuencias de

aminoácidos). Una proteína quimérica también puede incluir una proteína derivada de al menos 2 fuentes sintéticas diferentes o una proteína derivada de al menos una fuente biológica y al menos una fuente sintética.

5 **Factor de la coagulación**, tal y como se usa en la presente memoria, significa cualquier molécula, o análogo de ésta, natural o producido recombinantemente que previene o disminuye la duración de un episodio hemorrágico en un sujeto con un trastorno hemostático. En otras palabras, significa cualquier molécula que tiene actividad de coagulación.

**Actividad de coagulación**, tal y como se usa en la presente memoria, significa la capacidad de participar en una cascada de reacciones bioquímicas que culmina en la formación de un coágulo de fibrina y/o reduce la gravedad, duración o frecuencia de hemorragia o episodio hemorrágico.

10 **Construcción de ADN**, tal y como se usa en la presente memoria, significa una molécula de ADN, o un clon de dicha molécula, bien mono o bicatenaria, que se ha modificado a través de la intervención humana para contener segmentos de ADN combinados de una manera tal que como un todo no existiría de otra manera en la naturaleza. Las construcciones de ADN contienen la información necesaria para dirigir la expresión de polipéptidos de interés. Las construcciones de ADN pueden incluir promotores, potenciadores y terminadores de la transcripción. Las construcciones de ADN que contienen la información necesaria para dirigir la secreción de un polipéptido también contendrán al menos una secuencia señal secretora.

15 **Un fragmento**, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 2 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, o de al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos o cualquier delección o truncamiento de una proteína.

20 **Hemostasis**, tal y como se usa en la presente memoria, significa la interrupción del sangrado o hemorragia; o la interrupción del flujo de sangre a través de un vaso sanguíneo o parte corporal.

**Trastorno hemostático**, tal y como se usa en la presente memoria, significa una afección heredada genéticamente o adquirida caracterizada por una tendencia a hemorragia, bien espontáneamente o como resultado de trauma, debido a una capacidad alterada o incapacidad de formar un coágulo de fibrina.

25 **Unido**, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una primera secuencia de ácido nucleico unida covalentemente a una segunda secuencia de ácido nucleico. La primera secuencia de ácido nucleico puede estar unida directamente o yuxtapuesta a la segunda secuencia de ácido nucleico o alternativamente una secuencia intermedia puede unir covalentemente la primera secuencia a la segunda secuencia. Unido tal y como se usa en la presente memoria también puede referirse a una primera secuencia de aminoácidos unida covalentemente a una segunda secuencia de aminoácidos. La primera secuencia de aminoácidos puede estar unida directamente o yuxtapuesta a la segunda secuencia de aminoácidos o alternativamente una secuencia intermedia puede unir covalentemente la primera secuencia de aminoácidos a la segunda secuencia de aminoácidos. Unido también puede referirse a una primera secuencia de aminoácidos unida no covalentemente a una segunda secuencia de aminoácidos. Unido tal y como se usa en la presente memoria también puede referirse a una primera secuencia de aminoácidos unida covalentemente a una secuencia de ácido nucleico o una molécula orgánica o inorgánica pequeña.

30 **Unido de manera operativa**, tal y como se usa en la presente memoria, significa una primera secuencia de ácido nucleico unida a una segunda secuencia de ácido nucleico de manera tal que ambas secuencias son capaces de ser expresadas como un polipéptido biológicamente activo.

35 **Una molécula inorgánica pequeña**, tal y como se usa en la presente memoria, significa una molécula que no contiene átomos de carbono y que no es mayor de 50 kD.

**Una molécula orgánica pequeña**, tal y como se usa en la presente memoria, significa una molécula que contiene al menos un átomo de carbono y que no es mayor de 50 kD.

40 **Alta astringencia**, tal y como se usa en la presente memoria, incluye condiciones determinadas fácilmente por el experto en la técnica tomando como base, por ejemplo, la longitud del ADN. Generalmente, dichas condiciones se definen como condiciones de hibridación como anteriormente, y con lavado a aproximadamente 68°C, 0,2X SSC, 0,1% SDS. El experto en la técnica reconocerá que la temperatura y la concentración de sal de la disolución de lavado pueden ajustarse según sea necesario según factores tales como la longitud de la sonda.

45 **Astringencia moderada**, tal y como se usa en la presente memoria, incluye condiciones que pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la técnica tomando como base, por ejemplo, la longitud del ADN. Las condiciones básicas se muestran por Sambrook et al. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2 ed. Vol. 1, p. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), e incluyen el uso de una disolución de prelavado para los

filtros de nitrocelulosa 5X SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), condiciones de hibridación de 50% formamida, 6X SSC a 42°C (u otra disolución de hibridación similar, tal como disolución de Stark, en 50% formamida a 42°C), y condiciones de lavado de 60°C, 0,5X SSC, 0,1% SDS.

5 **Polipéptido**, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto; así, los péptidos, oligopéptidos, y proteínas están incluidos en la definición de polipéptido. Este término no excluye modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación, pegilación, adición de un resto lipídico, o la adición de cualquier molécula orgánica o inorgánica. Incluidos en la definición, están por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales) y polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto naturales como no naturales.

10 **Tratar, tratamiento, tratando**, tal y como se usa en la presente memoria, significa cualquiera de lo siguiente: la reducción de la gravedad de un trastorno hemostático; la profilaxis de uno o más síntomas asociados con un trastorno hemostático, por ejemplo, un episodio hemorrágico; la reducción de la duración de un curso de enfermedad de un trastorno hemostático, la mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno hemostático; la reducción de la duración de un episodio hemorrágico asociado con un trastorno hemostático; la reducción de la titulación de un anticuerpo inhibidor frente a un factor de la coagulación; el suministro de efectos beneficiosos a un sujeto con un trastorno hemostático, sin curar necesariamente el trastorno hemostático.

### B. Terapéuticos mejorados para trastornos hemostáticos

20 La presente descripción, incluyendo la presente invención, se refiere generalmente a terapéuticos mejorados para trastornos hemostáticos. La presente descripción, incluyendo la presente invención, se refiere así a una proteína química que comprende al menos un factor de la coagulación y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina.

25 Las proteínas químicas de la presente descripción, incluyendo las proteínas químicas de la presente invención, tienen una estabilidad incrementada y otras propiedades mejoradas cuando se compara con agentes terapéuticos conocidos que tienen actividad de coagulación. También pueden administrarse parenteralmente o no invasivamente. De acuerdo con esto, la presente descripción proporciona métodos mejorados para administrar agentes terapéuticos que tienen actividad de coagulación. Mientras los factores de coagulación actualmente se administran generalmente subcutáneamente, intramuscularmente o intravenosamente, las proteínas químicas de la presente descripción, incluyendo las proteínas químicas de la presente invención, pueden administrarse usando medios menos invasivos tales como administración oral, administración nasal, o administración pulmonar. En una realización específica, las proteínas químicas de la presente descripción, incluyendo las proteínas químicas de la presente invención, son útiles en el tratamiento profiláctico de trastornos hemostáticos.

30 La presente descripción, incluyendo la presente invención, también se refiere generalmente a métodos mejorados para preparar factores de coagulación terapéuticos. La presente descripción, incluyendo la presente invención, se refiere a métodos recombinantes para producir factores de coagulación terapéuticos con expresión aumentada y rendimientos mejorados. La presente descripción se refiere así a métodos para preparar proteínas químicas que comprenden al menos un factor de coagulación y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina mediante la transfección de una célula con una construcción de ADN, comprendiendo dicha construcción una secuencia de ADN que codifica al menos un factor de coagulación y una secuencia de ADN que codifica al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina; cultivar dicha célula en condiciones tales que la proteína química se expresa por dicha célula; y aislar dicha proteína química.

### C. Proteínas químicas

35 La presente descripción, incluyendo la presente invención, se refiere generalmente a proteínas químicas que comprenden al menos un factor de la coagulación, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, y opcionalmente un conector. El factor de coagulación puede unirse covalentemente, o no covalentemente a la parte de una región constante de inmunoglobulina. La parte de una región constante de inmunoglobulina tendrá tanto un extremo N, o amino, y un extremo C, o carboxi. En un caso, por ejemplo, en una realización de la presente invención, la proteína química de la presente descripción, por ejemplo, la proteína química de la presente invención, puede tener un factor de coagulación unido al extremo N de la parte de una región constante de inmunoglobulina.

40 La proteína química puede comprender opcionalmente al menos un conector, así el factor de coagulación no tiene que estar unido directamente a la parte de una región constante de inmunoglobulina. El conector puede interponerse entre el factor de coagulación y la parte de una región constante de inmunoglobulina. El conector puede estar unido al extremo N de la parte de una región constante de inmunoglobulina, o al extremo C de una parte de de una región constante de inmunoglobulina. El conector puede estar unido al extremo N del factor de coagulación.

55 La presente descripción se refiere así a una proteína química comprendida por al menos un factor de coagulación (X), opcionalmente, un conector (L), y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (F). En un caso, la presente descripción se refiere a una proteína química comprendida por la fórmula

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

en la que X está unido en su extremo C al extremo N de L, y L está unido en su extremo C al extremo N de F y en la que a es cualquier número entero o cero. Cuando a es cero X está unido directamente en su extremo C al extremo N de F. Por ejemplo, pero no como una limitación, a puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 ó 20.

- 5 En un caso de la presente descripción, por ejemplo, en una realización de la presente invención, la presente descripción, por ejemplo, la presente invención, se refiere a una proteína quimérica que comprende la secuencia de aminoácidos de la Figura 3A (SEQ ID NO:1).

La proteína quimérica de la presente descripción incluye monómeros, dímeros, así como multímeros de orden superior. En un caso, la proteína quimérica es un monómero que comprende un factor de coagulación y una parte de una región constante de inmunoglobulina. En otro caso, la proteína quimérica es un dímero que comprende dos factores de coagulación y dos partes de una inmunoglobulina. En un caso, los dos factores de coagulación son el mismo. En un caso, los dos factores de coagulación son diferentes. En un caso, las dos partes de una inmunoglobulina son la misma. En un caso, las dos partes de una inmunoglobulina son diferentes. En otro caso, por ejemplo, en una realización de la presente invención, la proteína quimérica es un híbrido monómero/dímero en el que la proteína quimérica tiene un aspecto dimérico ya que está comprendida por al menos una parte de dos polipéptidos de región constante de inmunoglobulina y un aspecto monomérico ya que está comprendida sólo por un factor de coagulación unido a una de las dos inmunoglobulinas. La presente descripción, incluyendo la presente invención, se refiere así a una proteína quimérica que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en la que dicha primera cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina unida a un factor de coagulación y dicha segunda cadena comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina sin un factor de coagulación unido a ella.

Las proteínas quiméricas de la presente descripción pueden describirse usando las fórmulas mostradas en la Tabla 1, en las que I, L, y F son como se han descrito anteriormente, y en las que (') indica una molécula diferente que sin (') y en las que (:) indica un enlace no peptídico

25 **TABLA 1**

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

El experto en la técnica entenderá que son posibles combinaciones adicionales incluyendo el uso de conectores adicionales.

### 1. Variantes de proteína quimérica

- 30 Se contemplan todo los derivados y análogos de las proteínas quiméricas de la invención, anticuerpos frente a las proteínas quiméricas de la invención y anticuerpos frente a las parejas de unión de las proteínas quiméricas de la invención, y pueden prepararse alterando sus secuencias de aminoácidos por sustituciones, adiciones, y/o deleciones/truncamientos o introduciendo modificaciones químicas que resultan en moléculas funcionalmente equivalentes. Un experto en la técnica entenderá que determinados aminoácidos en una secuencia de cualquier proteína pueden sustituirse por otros aminoácidos sin afectar de manera adversa la actividad de la proteína.

Pueden hacerse varios cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas quiméricas de la invención o secuencias de ADN codificadoras por lo tanto sin pérdida apreciable de su actividad, función, o utilidad biológica. Los derivados, análogos, o mutantes que resultan de dichos cambios y el uso de dichos derivados están en el alcance de la presente invención. En una realización específica, el derivado es funcionalmente activo, es decir, es capaz de presentar una o más actividades asociadas con las proteínas quiméricas de la invención, por ejemplo, formación de coágulos, activación de un factor de coagulación. La actividad puede medirse por ensayos conocidos

en la técnica, por ejemplo, ensayo StaCLot FVIIa-rTF (Johannessen *et al.* 2000, *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 11:S159) ensayo de tiempo de protrombina (ensayo PT) o un ensayo APTT para el factor IX.

5 Los sustitutos para un aminoácido en la secuencia pueden seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido (véase la Tabla 2). Además, varios aminoácidos se sustituyen comúnmente con aminoácidos neutros, por ejemplo, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, y metionina (véase, por ejemplo, MacLennan *et al.* (1998) *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67; Sasaki *et al.* (1998) *Adv. Biophys.* 35:1-24).

**TABLA 2**

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

10 **2. Factores de coagulación**

Las proteínas quiméricas de la presente descripción, incluyendo las proteínas quiméricas de la presente invención, incluyen al menos un factor de coagulación. El factor de coagulación puede incluir cualquier molécula que tenga actividad de coagulación o active una molécula con actividad de coagulación. El factor de coagulación puede estar comprendido por un polipéptido, una molécula orgánica pequeña, o una molécula inorgánica pequeña. El factor de coagulación puede ser un factor de coagulación mutado o un análogo de un factor de coagulación siempre que

15

mantenga al menos alguna actividad de coagulación. El factor de coagulación puede ser, por ejemplo, pero no como una limitación, el factor VIII, incluyendo factor VIII con dominio B deletado, factor IX (Patente U.S. No. 4.994.371), factor XI, factor XII, fibrinógeno, protrombina, factor V, factor VII, factor X, o factor XIII. En un caso de la presente descripción, por ejemplo, en una realización de la presente invención, el factor de coagulación es el factor VII o factor VIIa. En otro caso, por ejemplo, en otra realización, el factor de coagulación es un factor VII o VIIa mutado (véase, por ejemplo, Persson, et al. 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13583; Solicitud de Patente U.S. Serie No. 10/109498). El factor de coagulación puede ser un factor que participa en la ruta extrínseca. El factor de coagulación puede ser un factor que participa en la ruta intrínseca. Alternativamente, el factor de coagulación puede ser un factor que participa tanto en la ruta extrínseca como intrínseca.

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

El factor de coagulación puede ser un factor de coagulación activado. Alternativamente, el factor de coagulación puede ser una forma inactiva de un factor de coagulación, por ejemplo, un zimógeno. El factor de coagulación inactivo puede experimentar activación después de unirse al menos a una parte de una región constante de inmunoglobulina. El factor de coagulación inactivo puede activarse después de la administración a un sujeto. Alternativamente, el factor de coagulación inactivo puede activarse antes de la administración.

### 3. Inmunoglobulinas

Las proteínas quiméricas de la presente descripción, incluyendo las proteínas quiméricas de la presente invención, incluyen al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas están comprendidas por cuatro cadenas proteicas que se asocian covalentemente-dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena está comprendida además por una región variable y una región constante. Dependiendo del isotipo de inmunoglobulina, la región constante de cadena pesada está comprendida por 3 ó 4 dominios de región constante (por ejemplo, CH1, CH2, CH3, CH4). Algunos isotipos también pueden incluir una región bisagra.

La parte de una región constante de inmunoglobulina puede ser una parte de una región constante de inmunoglobulina obtenida de cualquier mamífero. La parte de una región constante de inmunoglobulina puede incluir, pero no está limitada a, una parte de una región constante de inmunoglobulina humana, una región constante de inmunoglobulina no humana, una región constante de inmunoglobulina bovina, una región constante de inmunoglobulina porcina, una región constante de inmunoglobulina murina, una región constante de inmunoglobulina ovina o una región constante de inmunoglobulina de rata.

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

La inmunoglobulina puede producirse recombinantemente o sintéticamente. La inmunoglobulina puede aislarse de una biblioteca de ADNc. La inmunoglobulina puede aislarse de una biblioteca de fago (véase McCafferty *et al.* 1990, *Nature* 348:552). La inmunoglobulina puede obtenerse por intercambio génico de secuencias conocidas (Mark *et al.* 1992, *Bio/Technol.* 10:779). La inmunoglobulina puede aislarse por recombinación in vivo (Waterhouse *et al.* 1993, *Nucl. Acid Res.* 21:2265). La inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina humanizada (Jones *et al.* 1986, *Nature* 332:323).

La parte de una región constante de inmunoglobulina en las proteínas quiméricas de la presente descripción puede incluir una parte de una IgG, una IgA, una IgM, una IgD, una IgE. En un caso de la presente descripción, la inmunoglobulina es una IgG. En otro caso, por ejemplo, en una de las realizaciones de la presente invención, la inmunoglobulina es IgG1. En otro caso más, por ejemplo, en otra realización de la presente invención, la inmunoglobulina es IgG2.

La parte de una región constante de inmunoglobulina puede incluir un fragmento Fc. Un fragmento Fc puede estar comprendido por los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina y la región bisagra de la inmunoglobulina. El fragmento Fc puede ser el fragmento Fc de una IgG1, una IgG2, una IgG3 o una IgG4. En un caso, por ejemplo, en una realización, la inmunoglobulina es un fragmento Fc de una IgG1. En un caso, por ejemplo, en una realización, la inmunoglobulina es un fragmento Fc de una IgG2. En otro caso, por ejemplo, en otra realización, la parte de una región constante de inmunoglobulina está comprendida por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 (Figura 3B) o un análogo de ésta. En otro caso, por ejemplo, en otra realización, la inmunoglobulina está comprendida por una proteína, o fragmento de ésta, codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:3 (Figura 3C).

La parte de una región constante de inmunoglobulina puede incluir una variante de Fc. Variante de Fc se refiere a una molécula o secuencia que está modificada respecto a Fc nativo pero que todavía comprende un sitio de unión

para el receptor salvaje, FcRn (WO 97/34631). Nativo se refiere a un Fc que no se ha modificado por un ser humano. WO 96/32478 describe variantes de Fc ejemplares, así como interacción con el receptor salvaje. Así, el término "variante de Fc" comprende una molécula o secuencia que está humanizada de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende sitios que pueden eliminarse porque proporcionan características estructurales o actividad biológica que no se requieren para las moléculas de fusión de la presente descripción, por ejemplo, para las moléculas de fusión de la presente invención. Así, la variante de Fc comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos de Fc nativos que afectan o están implicados en (1) la formación de enlace disulfuro, (2) la incompatibilidad con una célula huésped seleccionada (3) la heterogeneidad N-terminal después de la expresión en una célula huésped seleccionada, (4) la glicosilación, (5) la interacción con el complemento, (6) la unión a un receptor Fc distinto de un receptor salvaje, o (7) la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

En otro caso de la presente descripción, por ejemplo, en las realizaciones de la presente invención, la parte de una región constante de inmunoglobulina es una pareja de unión del receptor Fc neonatal (FcRn). Una pareja de unión de FcRn es cualquier molécula que pueda unirse específicamente por el receptor FcRn con transporte activo consecuente por el receptor FcRn de la pareja de unión de FcRn. El receptor FcRn se ha aislado de varias especies de mamíferos incluyendo los seres humanos. Se conocen las secuencias del FcRn humano, FcRn de rata, y FcRn de ratón (Story et al. 1994, *J. Exp. Med.* 180:2377). El receptor FcRn se une a IgG (pero no a otras clases de inmunoglobulinas tales como IgA, IgM, IgD, e IgE) a un pH relativamente bajo, transporta activamente la IgG transcelularmente en una dirección luminal a serosal, y libera entonces la IgG a un pH relativamente mayor encontrado en los fluidos intersticiales. Se expresa en el tejido epitelial adulto (Patentes U.S. Nos. 6.030.613 y 6.086.875) incluyendo el epitelio pulmonar e intestinal (Israel et al. 1997, *Immunology* 92:69) epitelio tubular proximal renal (Kobayashi et al. 2002, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282:F358) así como epitelio nasal, superficies vaginales, y superficies del árbol biliar.

Las parejas de unión de FcRn de la presente descripción engloban cualquier molécula que pueda unirse específicamente por el receptor FcRn incluyendo IgG completa, el fragmento Fc de IgG, y otros fragmentos que incluyen la región de unión completa del receptor FcRn. La región de la parte Fc de IgG que se une al receptor FcRn se ha descrito tomando como base la cristalografía de rayos X (Burmeister et al. 1994, *Nature* 372:379). El área principal de contacto del Fc con el FcRn está cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los contactos Fc-FcRn están todos en una única cadena pesada de Ig. Las parejas de unión de FcRn incluyen IgG completa, el fragmento Fc de IgG, y otros fragmentos de IgG que incluyen la región de unión completa de FcRn. Los sitios principales de contacto incluyen los residuos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, y 314 del dominio CH2 y los residuos de aminoácidos 385-387, 428, y 433-436 del dominio CH3. Las referencias hechas a la numeración de aminoácidos de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas, o regiones, se basan todas en Kabat et al. 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Public Health, Bethesda; MD.

La región Fc de IgG puede modificarse según procedimientos muy reconocidos tales como mutagénesis dirigida a sitio y semejantes para rendir IgG o fragmentos de Fc modificados o partes de éstos que se unirán por FcRn. Dichas modificaciones incluyen modificaciones lejos de los sitios de contacto de FcRn así como modificaciones en los sitios de contacto que preservan o incluso aumentan la unión al FcRn. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos únicos siguientes en Fc de IgG1 humano (Fcγ1) pueden sustituirse sin pérdida significativa de afinidad de unión de Fc para FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, A330S, P331A, P331S, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391 F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A, y K447A, en el que por ejemplo P238A representa prolina de tipo salvaje sustituida por alanina en el número de posición 238. Además de la alanina, otros aminoácidos pueden sustituirse por los aminoácidos de tipo salvaje en las posiciones especificadas anteriormente. Pueden introducirse mutaciones únicamente en Fc dando lugar a más de cien parejas de unión de FcRn distintas de Fc nativo. Además, pueden introducirse combinaciones de dos, tres, o más de estas mutaciones individuales conjuntamente, dando lugar a cientos de más parejas de unión de FcRn.

Algunas de las mutaciones anteriores pueden conferir una nueva funcionalidad a la pareja de unión de FcRn. Por ejemplo, una realización incorpora N297A, eliminando un sitio de N-glicosilación altamente conservado. El efecto de esta mutación es reducir la inmunogenicidad, aumentando de esta manera la vida media circulante de la pareja de unión de FcRn, y rendir una pareja de unión de FcRn incapaz de unirse a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, y FcγRIIIA, sin comprometer la afinidad para FcRn (Routledge et al. 1995, *Transplantation* 60:847; Friend et al. 1999, *Transplantation* 68:1632; Shields et al. 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591). Además, parece que al menos tres receptores Fc gamma humanos reconocen un sitio de unión en IgG en la región bisagra inferior, generalmente los aminoácidos 234-237. Por lo tanto, otro ejemplo de nueva funcionalidad e inmunogenicidad potencial disminuida puede surgir de mutaciones en esta región, como por ejemplo reemplazando los aminoácidos 233-236 de IgG1 humana "ELLG" con la secuencia correspondiente de IgG2 "PVA" (con la delección de un aminoácido). Se ha

mostrado que Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, y Fc $\gamma$ RIII, que median varias funciones efectoras no se unirán a IgG1 cuando se han introducido dichas mutaciones (Ward y Ghetie 1995, *Therapeutic Immunology* 2:77 y Armour et al.1999, *Eur. J. Immunol.* 29:2613). Como un ejemplo adicional de nueva funcionalidad que surge de las mutaciones descritas anteriormente la afinidad para FcRn puede incrementarse más allá de la del tipo salvaje en algunos casos. Esta afinidad incrementada puede reflejar una velocidad "de asociación" incrementada, una velocidad "de disociación" disminuida o tanto una velocidad "de asociación" incrementada como una velocidad "de disociación" disminuida. Se cree que las mutaciones que confieren una afinidad incrementada para FcRn incluyen T256A, T307A, E380A, y N434A (Shields et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591).

En un caso de la presente descripción, por ejemplo, en una realización de la presente invención, la pareja de unión de FcRn es un polipéptido que incluye la secuencia PKNSSMISNTP y opcionalmente incluye además una secuencia seleccionada de HQLSGTO, HQLNSDQK, HQLNSDQK, o VISSHLGQ (Patente U.S. No. 5.739.277).

Dos receptores FcRn pueden unir una única molécula de Fc. Los datos cristalográficos sugieren que cada molécula de FcRn se une a un único polipéptido del homodímero Fc. La unión de la pareja de unión de FcRn, por ejemplo, un fragmento Fc de una IgG, a un factor de coagulación proporciona así un medio para administrar el factor de coagulación oralmente o como un aerosol administrado nasalmente, mediante una ruta ocular o mediante una ruta pulmonar.

El experto en la técnica entenderá que las partes de una región constante de inmunoglobulina para uso en la proteína quimérica de la invención pueden incluir mutantes o análogos de éstas, o pueden incluir regiones constantes de inmunoglobulina modificadas químicamente o fragmentos de éstas (por ejemplo, pegilación) (véase, por ejemplo, Aslam y Dent 1998, *Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences Macmillan Reference*, Londres). En un caso un mutante puede proporcionar una unión aumentada de una pareja de unión de FcRn para el FcRn. También se contemplan para uso en la proteína quimérica de la invención péptido miméticos de al menos una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un péptido mimético de un fragmento Fc o un péptido mimético de una pareja de unión de FcRn. En una realización, el péptido mimético se identifica usando exposición en fago (Véanse, por ejemplo, McCafferty et al. 1990, *Nature* 348:552, Kang et al. 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363; EP 0 589 877 B1).

#### 4. Conectores opcionales

La proteína quimérica de la presente descripción, incluyendo la proteína quimérica de la presente invención, puede comprender opcionalmente al menos una molécula conectora. En un caso, por ejemplo, en una realización, el conector está comprendido por aminoácidos. El conector puede comprender 1-5 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 10-50 aminoácidos, 50-100 aminoácidos, 100-200 aminoácidos. El conector puede comprender la secuencia G<sub>n</sub>. El conector puede comprender la secuencia (GGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO.: 5). En cada caso, n puede ser un número entero, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10. Los ejemplos de conectores incluyen, pero no están limitados a, GGG (SEQ ID NO.: 6), SGGSGGS (SEQ ID NO.: 7), GGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO.: 8), y GGGSGGGSGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO.: 9).

En una realización, el conector no elimina la actividad de coagulación del factor de coagulación. Opcionalmente, el conector aumenta la actividad de coagulación del factor de coagulación, por ejemplo, disminuyendo los efectos del impedimento estérico y haciendo que el factor de coagulación sea más accesible para su sitio de unión diana, por ejemplo, otro factor en la cascada de coagulación.

#### D. Construcciones de ácido nucleico

La presente descripción también se refiere a una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas quiméricas de la presente descripción, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico una primera secuencia de ácido nucleico que codifica, por ejemplo, al menos un factor de coagulación, unida de manera operativa a una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina. La secuencia de ácido nucleico también puede incluir secuencias o elementos adicionales conocidos en la técnica (por ejemplo, promotores, potenciadores, secuencias poli A, secuencia señal). La secuencia de ácido nucleico puede incluir opcionalmente una secuencia que codifica un conector situado entre la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un factor de coagulación y la parte de una inmunoglobulina. La secuencia de ácido nucleico puede incluir opcionalmente una secuencia conectora situada antes o después de la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un factor de coagulación y la parte de una inmunoglobulina.

En un caso, la construcción de ácido nucleico está comprendida por ADN. En otro caso, la construcción de ácido nucleico está comprendida por ARN. La construcción de ácido nucleico puede ser un vector, por ejemplo, un vector viral o un plásmido. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no están limitados a, vector de adeno virus, un vector de virus adeno asociado o un vector de virus de leucemia murina. Los ejemplos de plásmidos incluyen pero no están limitados a, por ejemplo, pUC y pGEX.

En un caso, la construcción de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la Figura 3D (SEQ ID NO:4).

Debido a la degeneración conocida del código genético, en el que más de un codón puede codificar el mismo aminoácido, una secuencia de ADN puede variar de la mostrada en SEQ ID NOS:3 ó 4 y aún así codificar un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS:2 ó 1 respectivamente. Dichas secuencias de ADN variantes pueden resultar de mutaciones silenciosas (por ejemplo, que ocurren durante la amplificación por PCR), o pueden ser el producto de mutagénesis deliberada de una secuencia nativa. La presente descripción proporciona así secuencias de ADN aisladas que codifican polipéptidos de la presente descripción, seleccionadas de: (a) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3 ó 4; (b) ADN que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:1 ó 2; (c) ADN capaz de hibridación con un ADN de (a) o (b) en condiciones de astringencia moderada y que codifica polipéptidos de la presente descripción; (d) ADN capaz de hibridación con un ADN de (a) o (b) en condiciones de astringencia alta y que codifica polipéptidos de la presente descripción, y (e) ADN que está degenerado como resultado del código genético en un ADN definido en (a), (b), (c), o (d) y que codifica polipéptidos de la presente descripción. Por supuesto, los polipéptidos codificados por dichas secuencias de ADN están englobados por la presente descripción.

En otra realización, las moléculas de ácido nucleico de la invención también comprenden secuencias de nucleótidos que son al menos 80% idénticas a la secuencia nativa. También se contemplan realizaciones en las que una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia que es al menos 90% idéntica, al menos 95% idéntica, al menos 98% idéntica, al menos 99% idéntica, o al menos 99,9% idéntica a la secuencia nativa. El porcentaje de identidad puede determinarse por inspección visual y cálculo matemático. Alternativamente, el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico puede determinarse comparando la información de secuencia usando el programa informático GAP, versión 6.0 descrito por Devereux et al. 1984, *Nucl. Acids Res.* 12:387, y disponible en el University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). Los parámetros por defecto preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) para nucleótidos, y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess 1986, *Nucl. Acids Res.* 14:6745, como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., 1979, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, p. 353-358; (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para huecos terminales. También pueden usarse otros programas usados por un experto en la técnica de comparación de secuencias.

### E. Síntesis de proteínas quiméricas

Las proteínas quiméricas que comprenden al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y un factor de coagulación pueden sintetizarse usando técnicas muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, las proteínas quiméricas de la presente descripción, incluyendo las proteínas quiméricas de la presente invención, pueden sintetizarse recombinantemente en células (véanse, por ejemplo, Sambrook et al. 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. y Ausubel et al. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.).

Las secuencias de ADN que codifican inmunoglobulinas, o fragmentos de éstas, o factores de coagulación, o fragmentos de éstos, pueden clonarse a partir de una variedad de bibliotecas genómicas o de ADNc conocidas en la técnica. Las técnicas para aislar dichas secuencias de ADN usando métodos basados en sondas son técnicas convencionales muy conocidas para los expertos en la técnica. Las sondas para aislar dichas secuencias de ADN pueden estar basadas en secuencias de ADN publicadas (véase, por ejemplo, Hieter et al. 1980, *Cell* 22: 197-207). Puede usarse el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrito por Mullis et al. (Patente U.S. No. 4.683.195) y Mullis (Patente U.S. No. 4.683.202). La elección de la biblioteca y la selección de las sondas para el aislamiento de dichas secuencias de ADN está en el nivel de experiencia habitual en la técnica. Alternativamente, las secuencias de ADN que codifican inmunoglobulinas, o fragmentos de éstas, o factores de coagulación pueden obtenerse a partir de vectores que se sabe en la técnica que contienen inmunoglobulinas, o fragmentos de éstas, o factores de coagulación.

Para la producción recombinante, una secuencia polinucleotídica que codifica la proteína quimérica se inserta en un vehículo de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificadora insertada, o en el caso de un vector viral con ARN, los elementos necesarios para la replicación y traducción. El ácido nucleico que codifica la proteína quimérica se inserta en el vector en un marco de lectura apropiado.

En determinados casos, el ácido nucleico también puede codificar un propéptido de factor de coagulación que se modifica por la célula para rendir la proteína quimérica madura de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica madura de la presente invención. En un caso específico, el propéptido de factor de coagulación es reconocido por una  $\gamma$  carboxilasa dependiente de vitamina K que modifica el propéptido de factor de coagulación para conseguir actividad completa (por ejemplo, factor VII, factor IX, factor X, protrombina). Para rendir la proteína quimérica madura de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica madura de la presente invención, la secuencia de propéptido se escinde posteriormente por una endoproteasa, por ejemplo, enzima que escinde aminoácidos básicos emparejados (PACE), o cualquier miembro de la familia PACE, tal como PCSK1-9, incluyendo versiones truncadas de éste, o su equivalente de levadura Kex2 de *S. cerevisiae* y versiones truncadas de Kex2 (véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5.077.204; 5.162.220; 5.234.830; 5.885.821; 6.329.176 (Kex2 1-675)).

El vehículo de expresión se transfecta entonces en una célula diana adecuada que expresará la proteína, por ejemplo, una proteína quimérica. Las técnicas de transfección conocidas en la técnica incluyen, pero no están limitadas a, precipitación con fosfato de calcio (Wigler et al. 1978, *Cell* 14:725) y electroporación (Neumann et al. 1982, *EMBO J.* 1:841). Puede utilizarse una variedad de sistemas huésped-vector de expresión para expresar las proteínas quiméricas descritas en la presente memoria en células eucariotas. En un caso de la presente descripción, por ejemplo, en una realización de la presente invención, la célula eucariota es una célula animal, incluyendo células de mamífero (por ejemplo, células CHO, BHK, Cos, HeLa). Cuando la proteína quimérica se expresa en una célula eucariota, el ADN que codifica la proteína quimérica también puede codificar una secuencia señal que permitirá que la proteína quimérica se secrete. Un experto en la técnica entenderá que mientras la proteína se traduce la secuencia señal se escinde por la célula para formar la proteína quimérica madura. En la técnica se conocen varias secuencias señal, por ejemplo, la secuencia señal del factor VII nativo, la secuencia señal del IX nativo y la secuencia señal de la cadena ligera Igk de ratón. Alternativamente, cuando una secuencia señal no se incluye la proteína quimérica puede recuperarse lisando las células.

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

Los vectores de expresión pueden codificar etiquetas que permiten una purificación o identificación fácil de la proteína producida recombinantemente. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, vector pUR278 (Ruther et al. 1983, *EMBO J.* 2:1791) en el que la secuencia codificadora de la proteína quimérica descrita en la presente memoria puede ligarse en el vector en marco con la región codificadora lac z de manera que se produce una proteína híbrida; pueden usarse vectores pGEX para expresar proteínas con una etiqueta de glutatión S-transferasa (GST). Estas proteínas son habitualmente solubles y pueden purificarse fácilmente de las células por adsorción a lechos de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores incluyen sitios de escisión (por ejemplo, PreCission Protease™ (Pharmacia, Peapack, N.J.)) para la eliminación fácil de la etiqueta después de la purificación.

Para incrementar la eficiencia de la producción, el polinucleótido puede diseñarse para codificar múltiples unidades de la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, separadas por sitios de escisión enzimática. El polipéptido resultante puede escindir (por ejemplo, por tratamiento con la enzima apropiada) con el fin de recuperar las unidades polipeptídicas. Esto puede incrementar el rendimiento de los polipéptidos dirigidos por un único promotor. Cuando se usa en sistemas de expresión viral apropiados, la traducción de cada polipéptido codificado por el ARNm está dirigida internamente en el transcrito; por ejemplo, por un sitio de entrada de ribosoma interno, IRES. Así, la construcción policistrónica dirige la transcripción de un único ARNm, policistrónico grande que, a su vez, dirige la traducción de múltiples polipéptidos individuales. Esta estrategia elimina la producción y procesamiento enzimático de poliproteínas y puede incrementar significativamente el rendimiento de un polipéptido dirigido por un único promotor.

Los vectores usados en la transformación contendrán habitualmente un marcador seleccionable usado para identificar los transformantes. En sistemas bacterianos, éstos pueden incluir un gen de resistencia a antibiótico tal como ampicilina, blastidina o kanamicina. Los marcadores seleccionables para uso en células de mamífero cultivadas incluyen genes que confieren resistencia a fármacos, tales como neomicina, higromicina, y metotrexato. El marcador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. Un marcador seleccionable amplificable es el gen de la dihidrofolato reductasa (gen DHFR). Otro marcador amplificable es el ADNc de DHFR (Simonsen y Levinson 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80:2495). Los marcadores seleccionables están revisados por Thilly (*Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass.) y la elección de marcadores seleccionables está en el nivel de experiencia habitual en la técnica.

Los marcadores seleccionables pueden introducirse en la célula en un plásmido separado al mismo tiempo que el gen de interés, o pueden introducirse en el mismo plásmido. Si están en el mismo plásmido, el marcador seleccionable y el gen de interés pueden estar bajo el control de diferentes promotores o el mismo promotor, produciendo la última organización un mensaje dicistrónico. Las construcciones de este tipo se conocen en la técnica (por ejemplo, Pat. U.S. No. 4.713.339).

Los elementos de expresión de los sistemas de expresión varían en su fuerza y especificidades. Dependiendo del sistema huésped/vector utilizado, puede usarse en el vector de expresión cualquiera de varios elementos de la transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como pL del bacteriófago  $\lambda$ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y semejantes; cuando se clona en sistemas de células de insectos, pueden usarse promotores tales como el promotor de poliedro de baculovirus; cuando se clona en sistemas de células de plantas,

pueden usarse promotores derivados del genoma de células de planta (por ejemplo, promotores de choque térmico; el promotor para la subunidad pequeña de RUBISCO; el promotor para la proteína de unión a clorofila II a/b) o de virus de plantas (por ejemplo, el promotor de ARN 35S de CaMV; el promotor de la proteína de la cubierta de TMV); cuando se clona en sistemas de células de mamífero, pueden usarse promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5 K del virus vaccinia, el promotor de CMV); cuando se generan líneas celulares que contienen múltiples copias de producto de expresión, pueden usarse los vectores basados en SV40, BPV y EBV con un marcador seleccionable apropiado.

En los casos en los que se usan vectores de expresión de plantas, la expresión de las secuencias que codifican formas lineales o no cicladas de las proteínas quiméricas de la presente descripción, por ejemplo, de las proteínas quiméricas de la presente invención, puede estar dirigida por cualquiera de varios promotores. Por ejemplo, pueden usarse promotores virales tales como los promotores ARN 35S y ARN 19S de CaMV (Brisson et al. 1984, *Nature* 310:511-514), o el promotor de la proteína de cubierta de TMV (Takamatsu et al. 1987, *EMBO J.* 6:307-311); alternativamente, pueden usarse promotores de plantas tales como promotores de la subunidad pequeña de RUBISCO (Coruzzi et al. 1984, *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie et al. 1984, *Science* 224:838-843) o de choque por calor, por ejemplo, hsp17.5-E o hsp17.3-B de soja (Gurley et al. 1986, *Mol. Cell. Biol.* 6:659-665). Estas construcciones pueden introducirse en células de plantas usando plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores virales de plantas, transformación de ADN directa, microinyección, electroporación, etc. Para revisiones de dichas técnicas véanse, por ejemplo, Welssbach y Weissbach 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, p. 421-463; y Grierson y Corey 1988, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed., Blackie, Londres, Cap. 7-9.

En un sistema de expresión de insectos que puede usarse para producir las proteínas quiméricas de la presente descripción, por ejemplo, las proteínas quiméricas de la presente invención, se usa el virus de la polihidrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) como un vector que expresa los genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. Puede clonarse una secuencia codificadora en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de poliedro) del virus y ponerse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de poliedro). La inserción exitosa de una secuencia codificadora resultará en la inactivación del gen de poliedro y la producción de virus recombinantes no ocluidos (es decir, virus que carecen de la cubierta proteínica codificada por el gen de poliedro). Estos virus recombinantes se usan entonces para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las que se expresa el gen insertado. (véanse, por ejemplo, Smith et al. 1983, *J. Virol.* 46:584; Patente U.S. No. 4.215.051). Los ejemplos adicionales de este sistema de expresión pueden encontrarse en Ausubel et al., eds 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley interscience.

En células huéspedes de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se usa un adenovirus como un vector de expresión, puede ligarse una secuencia codificadora a un complejo de control de la transcripción/traducción del adenovirus, por ejemplo, la secuencia del promotor tardío y de líder tripartito. Este gen quimérico puede insertarse entonces en el genoma del adenovirus por recombinación in vitro o in vivo. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar un péptido polipeptídico en huéspedes infectados (véase, por ejemplo, Logan y Shenk 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81:3655-3659). Alternativamente, puede usarse el promotor 7.5 K de vaccinia (véanse, por ejemplo, Mackett et al. 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79:7415; Mackett et al. 1984, *J. Virol.* 49:857; Panicali et al. 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79:4927).

En los casos en los que se usa un adenovirus como un vector de expresión, puede ligarse una secuencia codificadora a un complejo de control de la transcripción/traducción del adenovirus, por ejemplo, la secuencia del promotor tardío y de líder tripartito. Este gen quimérico puede insertarse entonces en el genoma del adenovirus por recombinación in vitro o in vivo. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar un péptido polipeptídico en huéspedes infectados (véase, por ejemplo, Logan y Shenk 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81:3655-3659). Alternativamente, puede usarse el promotor 7.5 K de vaccinia (véanse, por ejemplo, Mackett et al. 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79:7415-7419; Mackett et al. 1984, *J. Virol.* 49:857-864; Panicali et al. 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79:4927).

Las células huésped que contienen construcciones de ADN de la proteína quimérica se crecen en un medio de crecimiento apropiado. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene los nutrientes requeridos para el crecimiento de células. Los nutrientes requeridos para el crecimiento de células pueden incluir una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y factores de crecimiento. En un caso de la presente descripción, por ejemplo, en una realización de la presente invención, el medio contiene vitamina K que es necesaria para que una y carboxilasa celular confiera actividad a un factor de coagulación producido recombinantemente, por ejemplo, factor VII. Opcionalmente, el medio puede contener suero fetal bovino o suero fetal de ternera. El medio de crecimiento seleccionará generalmente células que contienen la construcción de ADN, por ejemplo, por selección de fármaco o deficiencia en un nutriente esencial, que se complementa por el marcador seleccionable en la construcción de ADN o co-transfectado con la construcción de ADN. Las células de mamífero cultivadas se crecen generalmente en medios que contienen suero o sin suero disponibles comercialmente (por ejemplo, MEM, DMEM). La selección de un medio apropiado para la línea celular particular usada está en el nivel de experiencia técnica habitual.

La proteína quimérica producida recombinantemente de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica producida recombinantemente de la presente invención, puede aislarse del medio de cultivo usando procedimientos bien establecidos en la técnica (por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico). La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, puede aislarse del medio de cultivo por cromatografía en columna, por ejemplo, una columna de proteína A, o por cromatografía de intercambio iónico. Cuando se usa una columna de proteína A o una columna de intercambio iónico para separar la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, la separación cromatográfica puede contribuir a la activación de la proteína quimérica, por ejemplo, convirtiendo el factor VII en factor VIIa. El medio de cultivo de células huésped transformadas o transfectadas crecidas apropiadamente se separa del material celular, y se demuestra la presencia de proteínas quiméricas. Un método para detectar las proteínas quiméricas, por ejemplo, es uniendo las proteínas quiméricas o partes de las proteínas quiméricas a un anticuerpo específico que reconoce la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, que reconoce la proteína quimérica de la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo anti-Fc). Un anticuerpo anti-proteína quimérica puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal generado frente a la proteína quimérica en cuestión. Por ejemplo, la proteína quimérica puede contener una parte de una región constante de inmunoglobulina. Los anticuerpos que reconocen la región constante de muchas inmunoglobulinas se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente. Puede usarse un anticuerpo para llevar a cabo un ELISA o una transferencia western para detectar la presencia de la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención.

## 20 **F. Métodos para usar proteínas quiméricas**

Las proteínas quiméricas de la presente descripción, incluyendo las proteínas quiméricas de la presente invención, tienen muchos usos como reconocerá un experto en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, métodos para tratar a un sujeto que tiene un trastorno hemostático y métodos para tratar a un sujeto que necesita un agente hemostático general.

### 25 **1. Métodos para tratar a un sujeto que tiene un trastorno hemostático**

La presente descripción se refiere a un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno hemostático que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una proteína quimérica, en la que la proteína quimérica comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y al menos un factor de coagulación.

30 La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, trata o previene un trastorno hemostático estimulando la formación de un coágulo de fibrina. La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, puede activar cualquier miembro de una cascada de coagulación. El factor de coagulación puede ser un participante en la ruta extrínseca, la ruta intrínseca o ambas. El factor de coagulación puede ser el factor VII o factor VIIa. El factor VIIa puede activar el factor X que interacciona con el factor Va para escindir protrombina en trombina, que a su vez escinde fibrinógeno en fibrina.

#### **a. Afecciones que pueden tratarse**

40 La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, puede usarse para tratar cualquier trastorno hemostático. Los trastornos hemostáticos que pueden tratarse por la administración de la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, por la administración de la proteína quimérica de la presente invención, incluyen, pero no están limitados a, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, deficiencia de factor XI (deficiencia PTA), deficiencia de factor XII, así como deficiencias o anomalías estructurales en fibrinógeno, protrombina, factor V, factor VII, factor X, o factor XIII.

45 En un caso, el trastorno hemostático es un trastorno heredado. En un caso, el sujeto tiene hemofilia A, y la proteína quimérica comprende el factor VIII o factor VIIIa. En otro caso, el sujeto tiene hemofilia A, y la proteína quimérica comprende el factor VII o factor VIIa. En otro caso, el sujeto tiene hemofilia B, y la proteína quimérica comprende el factor IX o factor IXa. En otro caso, el sujeto tiene hemofilia B, y la proteína quimérica comprende el factor VII o factor VIIa. En otro caso, el sujeto tiene anticuerpos inhibidores frente al factor VIII o factor VIIIa y la proteína quimérica comprende el factor VII o factor VIIa. En otro caso más, el sujeto tiene anticuerpos inhibidores frente al factor IX o factor IXa y la proteína quimérica comprende el factor VII o factor VIIa.

50 La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, puede usarse para tratar profilácticamente a un sujeto con un trastorno hemostático. La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, puede usarse para tratar un episodio hemorrágico agudo en un sujeto con un trastorno hemostático.

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

En otro caso, el trastorno hemostático puede ser un trastorno adquirido. El trastorno adquirido puede resultar de una enfermedad o afección secundaria subyacente. La afección no relacionada puede ser, como un ejemplo, pero no como una limitación, cáncer, una enfermedad auto-inmune, o embarazo. El trastorno adquirido puede resultar de edad avanzada o de medicación para tratar un trastorno secundario subyacente (por ejemplo, quimioterapia de cáncer).

## 2. Métodos para tratar a un sujeto que necesita un agente hemostático general

La presente descripción también se refiere a métodos para tratar a un sujeto que no tiene un trastorno hemostático o una enfermedad o afección secundaria que resulta en la adquisición de un trastorno hemostático. La presente descripción se refiere así a un método para tratar a un sujeto que necesita un agente hemostático general que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una proteína quimérica, en la que la proteína quimérica comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y al menos un factor de coagulación.

### a. Afecciones que pueden tratarse

En un caso, el sujeto que necesita un agente hemostático general está sometido, o va a someterse, a cirugía. La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, puede administrarse antes de, durante o después de la cirugía como un profiláctico. La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, puede administrarse antes de, durante, o después de la cirugía para controlar un episodio hemorrágico agudo. La cirugía puede incluir, pero no está limitada a, trasplante de hígado, resección hepática, o trasplante de células madre.

La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, puede usarse para tratar a un sujeto que tiene un episodio hemorrágico agudo que no tiene un trastorno hemostático. El episodio hemorrágico agudo puede resultar de trauma severo, por ejemplo, cirugía, un accidente de automóvil, herida, laceración por disparo de arma, o cualquier otro evento traumático que resulta en hemorragia incontrolada.

### b. Modalidades de tratamiento

La proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, la proteína quimérica de la presente invención, puede administrarse intravenosamente, subcutáneamente, intra-muscularmente, o a través de cualquier superficie mucosal, por ejemplo, oralmente, sublingualmente, bucalmente, nasalmente, vaginalmente o a través de la ruta pulmonar. La proteína quimérica puede implantarse en o unida a un soporte sólido de biopolímero que permite la liberación lenta de la proteína quimérica en el sitio de la hemorragia o implantarse en vendajes/apósitos.

La dosis de la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, de la proteína quimérica de la presente invención, variará dependiendo del sujeto y de la ruta particular de administración usada. Las dosificaciones pueden variar de 0,1 a 100.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal. En un caso, el intervalo de dosificación es 0,1-1.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . La proteína puede administrarse continuamente o en intervalos de tiempo específicos. Los ensayos in vitro pueden emplearse para determinar los intervalos de dosis óptimos y/o los programas de administración. Los ensayos in vitro que miden la actividad de factor de coagulación se conocen en la técnica, por ejemplo, el ensayo de coagulación STA-CLOT VIIa-rTF. Además, las dosis efectivas pueden extrapolarse de curvas de dosis-respuesta obtenidas de modelos animales, por ejemplo, un perro hemofílico (Mount et al. 2002, *Blood* 99(8):2670).

La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un factor de la coagulación, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences por E.W. Martin. Los ejemplos de excipientes pueden incluir almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y semejantes. La composición también puede contener reactivos tamponadores del pH, y agentes humectantes o emulsionantes.

Para la administración oral, la composición farmacéutica puede tomar la forma de comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales. La composición también puede prepararse como un líquido por ejemplo un jarabe o una suspensión. El líquido puede incluir agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles), agentes emulsionantes (lecitina o goma arábiga), vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres grasos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados), y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden incluir agentes saporíferos, colorantes y edulcorantes. Alternativamente, la composición puede presentarse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado.

Para la administración bucal, la composición puede tomar la forma de comprimidos o pastillas según protocolos convencionales.

Para administración por inhalación, los compuestos para uso según la presente descripción, por ejemplo, los compuestos para uso según la presente invención, se administran convenientemente en la forma de un aerosol

nebulizado con o sin excipientes o en la forma de una pulverización de aerosol de un envase o nebulizador presurizado, opcionalmente con un propelente, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla del polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica puede formularse para administración parenteral (es decir, intravenosa o intramuscular) por inyección en bolo. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en contenedores multidosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones, o emulsiones en vehículos grasos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua sin pirógenos.

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

### c. Terapia de combinación

En otro caso, la presente descripción se refiere a un método para tratar a un sujeto con un trastorno hemostático que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una proteína quimérica que comprende al menos un factor de coagulación y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina en combinación con al menos otro factor de coagulación o agente que estimula la hemostasis. Dicho otro factor de coagulación o agente que estimula la hemostasis puede ser cualquier terapéutico con actividad de coagulación demostrada. Como un ejemplo, pero no como una limitación, el factor de coagulación o agente hemostático puede incluir el factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, protrombina, fibrinógeno, factor de von Willebrand o factor tisular soluble recombinante (rsTF) o formas activadas de cualquiera de los anteriores. El factor de coagulación o agente hemostático también puede incluir fármacos anti-fibrinolíticos, por ejemplo, ácido épsilon-amino-caproico, ácido tranexámico.

### G. Kits

La presente descripción proporciona un kit para el diagnóstico de un trastorno hemostático. El kit puede incluir un contenedor y una proteína quimérica que comprende al menos un factor de coagulación y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina. La proteína quimérica puede proporcionarse en un tampón o disolvente apropiado. El tampón puede ser un tampón acuoso, por ejemplo, PBS o alternativamente la proteína quimérica puede estar liofilizada. El kit también puede proporcionar instrucciones para detectar la presencia de un factor de coagulación en una muestra, por ejemplo, poniendo en contacto una alícuota de una muestra con la proteína quimérica de la presente descripción, por ejemplo, con la proteína quimérica de la presente invención, y detectar la presencia de un coágulo. La detección puede incluir detección visible. El kit puede proporcionar opcionalmente una alícuota de sangre que carece de un factor de coagulación conocido.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Clonación de pcDNA 3.1-Flag-Fc

La secuencia para el péptido FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys)(SEQ ID NO: 23), una etiqueta de afinidad común usada para identificar o purificar proteínas, se clonó en el plásmido pcDNA 3.1-Fc, que contiene la secuencia señal de Igk de ratón seguida del fragmento Fc de IgG1 humana (aminoácidos 221-447, numeración EU). La construcción se creó por PCR de superposición usando los cebadores siguientes:

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

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

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

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

El molde de pcDNA 3.1-Fc se añadió entonces a dos reacciones de PCR separadas que contenían 50 pmoles cada una de las parejas de cebadores FlagFc-F1/R1 o FlagFc-F2/R2 en una reacción de 50 µl usando ADN polimerasa Pfu Ultra (Stratagene, CA) según el protocolo estándar del fabricante en un Termociclador MJ usando los ciclos siguientes: 95°C 2 minutos; 30 ciclos de (95°C 30 segundos, 52°C 30 segundos, 72°C 45 segundos), seguido de 72°C durante 10 minutos. Los productos de estas dos reacciones se mezclaron en otra reacción de PCR (2 µl cada una) con 50 pmoles de cebadores FlagFc-F1 y FlagFc-R2 en una reacción de 50 µl usando ADN polimerasa Pfu

Ultra (Stratagene, CA) según el protocolo estándar del fabricante en un Termociclador MJ usando los ciclos siguientes: 95°C 2 minutos; 30 ciclos de (95°C 30 segundos, 52°C 30 segundos, 72°C 45 segundos), seguido de 72°C durante 10 minutos. El fragmento resultante se purificó con gel, se digirió y se insertó en el plásmido pcDNA 3.1-Fc NheI-Bam HI. El plásmido resultante contiene la secuencia señal de I<sub>g</sub>k de ratón produciendo la proteína FlagFc.

#### Ejemplo 2: Clonación de la construcción PACE

La secuencia codificadora para PACE (enzima de escisión de aminoácidos básicos emparejados) humana, una endoproteasa, se obtuvo por RT-PCR. Se usaron los cebadores siguientes:

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

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

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

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

El cebador PACE-F1 añade un sitio HindIII en el extremo 5' de la secuencia PACE empezando con 3 nucleótidos antes del codón de inicio, mientras el cebador PACE-R2 añade un codón de parada después del aminoácido 715, lo que ocurre en el extremo del dominio extracelular de PACE, así como añade un sitio EcoRI en el extremo 3' del codón de parada. Los cebadores PACE-R1 y -F2 hibridan en los lados 3' y 5' de un sitio BamHI interno, respectivamente. Se pusieron a punto dos reacciones de RT-PCR usando 25 pmoles cada una de las parejas de cebadores de PACE-F1/R1 o PACE-F2/R2 con 20 ng de ARN de hígado humano adulto (Clontech; Palo Alto, CA) en una reacción de 50 µl de RT-PCR usando la RT-PCR de Una Etapa Superscript™ con sistema PLATINUM® Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) según el protocolo del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un Termociclador MJ usando los ciclos siguientes: 50°C 30 minutos; 94°C 2 minutos; 30 ciclos de (94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C 2 minutos), seguido de 72°C 10 minutos. Estos fragmentos se ligaron cada uno en el vector pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) y se secuenciaron completamente. El fragmento F2-R2 se subclonó en pcDNA6 V5/His (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando los sitios BamHI/EcoRI, y el fragmento F1-R1 se clonó en esta construcción usando los sitios HindIII/BamHI. El plásmido final, pcDNA6-PACE, produce una forma soluble de PACE (aminoácidos 1-715), al haberse delecionado la región transmembrana. La secuencia de PACE en pcDNA6-PACE es esencialmente como se describe en Harrison et al. 1998, Seminars in Hematology 35:4.

#### Ejemplo 3: Clonación de la construcción Fc-Factor VII

La secuencia codificadora para el Factor VII, se obtuvo por RT-PCR de ARN de hígado fetal humano (Clontech, Palo Alto, CA). La región clonada está comprendida por la secuencia de ADNc de pb 36 a pb 1430 terminando justo antes del codón de parada. Se introdujo un sitio SbfI en el extremo N. Se introdujo un sitio BspEI en el extremo C. La construcción se clonó por PCR usando los cebadores:

En dirección 3': 5' GCTACCTGCAGGCCACCATGGTCTCCAGGCCCTCAGG 3' (SEQ ID NO: 19)

En dirección 5': 5' CAGTTCCGGAGCTGGGCACGGCGGCACGTGTGAGTTTTGTCTGGGAAAT GG 3' (SEQ ID NO: 20)

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

El fragmento se digirió SbfI - BspE I y se insertó en pED.dC-Fc un plásmido que codifica el fragmento Fc de una IgG1.

#### Ejemplo 4: Expresión y purificación del híbrido monómero-dímero factor VII-Fc

Se establecieron células CHO DG-44 que expresan Factor VII-Fc. Las células CHO DG-44 se crecieron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, en MEM Alfa más nucleósido y ribonucleósidos y suplementado con 5% suero bovino fetal inactivado con calor hasta la transfección.

Las células DG44 se sembraron en placas en placas petri de cultivo tisular de 100 mm y se crecieron hasta una confluencia de 50%-60%. Se usó un total de 10 µg de ADN para transfectar una placa de 100 mm: bien 9 µg pED.dC.FVII-Fc + 1 µg de pcDNA6-PACE para la transfección de dímero, ó 7,5 µg de pED.dC.FVII-Fc + 1,5 µg pcDNA3/Fiag-Fc + 1 µg de pcDNA6-PACE para la transfección de monómero. Las células se transfectaron como se describe en el manual del reactivo de transfección Superfect (Qiagen, Valencia, CA). El medio se retiró después de 48 horas y se reemplazó por MEM Alfa sin nucleósidos más 5% suero bovino fetal dializado y 10 µg/ml de Blastidicina (Invitrogen, Carlsbad, CA) para ambas transfecciones, mientras la transfección de híbrido monómero-dímero también se suplementó con 0,2 mg/ml geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 10 días, las células se liberaron de la placa con 0,25% tripsina y se transfirieron a matraces de cultivo tisular T25, y la selección se

continuó durante 10-14 días hasta que las células empezaron a crecer bien al establecerse líneas celulares estables. La expresión de proteínas se amplificó posteriormente por la adición de 25 nM metotrexato.

Aproximadamente  $2 \times 10^7$  células se usaron para inocular 300 ml de medio de crecimiento en una botella rotatoria de 1.700 cm<sup>2</sup> (Coming, Coming, NY) suplementado con 5 µg/L de vitamina K<sub>3</sub> (bisulfito sódico de menadiona) (Sigma, St Louis, MO). Las botellas rotatorias se incubaron en 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante 72 horas. El medio de crecimiento se intercambiaba con 300 ml de medio de producción sin suero (DMEM/F12 con 5 µg/ml insulina bovina y 10 µg/ml Gentamicina) suplementado con 5 µg/L de vitamina K<sub>3</sub>. El medio de producción (medio condicionado) se recogió cada día durante 10 días y se almacenó a 4°C. Se añadió medio de producción fresco a las botellas rotatorias después de cada recogida y la botellas se retornaron al incubador. El medio combinado se aclaró en primer lugar usando un filtro de fibra de vidrio Sartoclean (3,0 µm + 0,2 µm) (Sartorius Corp. Gottingen, Alemania) seguido de un filtro Acropack 500 (0,8 µm + 0,2 µm) (Pall Corp., East Hills, NY). El medio aclarado se concentró aproximadamente 20 veces usando casetes de filtración de flujo tangencial Pellicon Biomax (10 kDa MWCO) (Millipore Corp., Billerica, MA).

Las quimeras de Fc se capturaron del medio concentrado por paso sobre una Columna de Flujo Rápido Sefarosa Proteína A 4 (AP Biotech, Piscataway, NJ). Una columna de 5 x 5 cm (100 ml) se cargó con ≤5 mg proteína Fc por ml de volumen de columna a una velocidad de flujo lineal de 100 cm/hora para conseguir un tiempo de residencia de ≥ 3 minutos. La columna se lavó con >5 volúmenes de columna de 1X DPBS para eliminar las proteínas unidas no específicamente. Las proteínas unidas se eluyeron con 100 mM Glicina pH 3,0. Las fracciones de la elución que contenían el pico de proteína se neutralizaron añadiendo 1 parte de 1 M Tris-HCL, pH 8 por 10 partes de fracción de eluato. El paso de la proteína quimérica sobre la columna de Proteína A convirtió el factor VII inactivo en factor VIIa activado (figura 2). Podría conseguirse una activación adicional pasando la proteína sobre una columna de intercambio aniónico (Peders et al. 1989, *Biochemistry* 28:9331-36).

La muestra de proteína de transfección híbrido monómero-dímero se sometió a una purificación adicional, ya que contenía una mezcla de homodímero FVII-Fc:FVII-Fc, híbrido monómero-dímero FVII-Fc: FLAG-Fc, y homodímeros FLAG-Fc: FLAG-Fc. Para eliminar los homodímeros FLAG-Fc de la preparación, el combinado de Proteína A Sefarosa 4 de Flujo Rápido se dializó en primer lugar en 20 mM MES, 20 mM NaCl, pH 6,1 y se pasó sobre una columna de intercambio catiónico Unosphere S (BioRad Corp., Richmond, CA). En las condiciones de operación para la columna, el híbrido monómero-dímero FLAG-Fc tiene una carga neutra neta (FLAG-Fc pI teórico=6,19) y fluye a través de la columna mientras las construcciones hFVII-Fc están cargadas positivamente, y así se unen a la columna y eluyen a una fuerza iónica mayor. El material dializado se cargó en una columna 1,1 x 11 cm (9,9 ml) a 150 cm/hora. Durante el lavado y elución, la velocidad de flujo se incremento hasta 500 cm/hora. La columna se lavó secuencialmente con 8 volúmenes de columna de 20 mM MES, 20 mM NaCl, pH 6,1 y 8 volúmenes de columna de 20 mM MES, 40 mM NaCl, pH 6,1. La proteína unida se eluyó con 20 mM MES, 750 mM NaCl, pH 6,1. Las fracciones de la elución que contenían el pico de proteína se combinaron y se esterilizaron por filtración a través de un disco de filtro de 0,2 µm antes de almacenamiento a -80°C.

Se usó una columna de afinidad anti-FLAG MAB para separar los dímeros de Fc quiméricos con hFVII fusionado a ambas moléculas de Fc de aquellos con un péptido FLAG y una fusión hFVII. El combinado del eluato de Unosphere S se diluyó 1:1 con 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8 y se cargó en una columna de sefarosa M2 anti-FLAG de 1,6 x 5 cm (Sigma Corp., St. Louis, MO) a una velocidad de flujo lineal de 60 cm/hora. La carga se dirigió a < 2,5 mg híbrido monómero-dímero/ml de volumen de columna. Después de cargar la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0, entonces los híbridos monómero-dímero se eluyeron con 100 mM Glicina, pH 3,0. Las fracciones de la elución que contenían el pico de proteína se neutralizaron añadiendo 1 parte de 1 M Tris-HCL, pH 8 por 10 partes de fracción de eluato. Los combinados se almacenaron a -80°C.

#### **Ejemplo 5: Análisis de la actividad de coagulación de homodímero e híbridos monómero/dímero de Factor VII-Fc**

El kit de ensayo StaClot FVIIa-rTF se adquirió en Diagnostica Stago (Parsippany, NJ) y se modificó como se describe en Johannessen et al. 2000, *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 11: S159. Se realizó una curva estándar con el estándar 89/688 de FVIIa de la Organización Mundial de la Salud. El ensayo comparó un homodímero comprendido por dos moléculas de factor VII y dos moléculas de Fc con un híbrido monómero/dímero comprendido por una molécula de factor VII y dos moléculas de Fc. Se observó una actividad de coagulación significativa tanto para el híbrido monómero/dímero como para el homodímero. La actividad de coagulación del híbrido monómero/dímero comparada con la del homodímero fue casi cuatro veces tan alta (Figura 4).

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

La unión de factor VII-Fc al receptor de Fc neonatal humano soluble (shFcRn) se analizó usando un instrumento Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia). Se recubrió un chip CM5 (Biacore, Uppsala, Suecia) con 3.500 unidades de resonancia (RU) de shFcRn usando química de amina. El factor VII-Fc se diluyó, 10 veces ó 100 veces, en 50 mM PO<sub>4</sub>, pH 6,0, 100 mM NaCl, 0,01 % Tween-20 y se inyectó (en duplicado) sobre la superficie durante 10 minutos a 10 µL/minuto. Las muestras también se inyectaron sobre una superficie con recubrimiento simulado que sirvió

como un control de referencia. El chip se regeneró con 100 mM PO<sub>4</sub> pH 8,0. La respuesta (en RU), registrada 30 segundos antes de que parara la inyección, indicó unión específica (Figura 5).

#### Ejemplo 7: Captación oral de Factor VII-Fc en ratas neonatales

5 Se adquirieron ratas recién nacidas de 9 días de 25 gramos en Charles River (Wilmington, MA) y se dejó que se aclimataran durante 24 horas. Las ratas se dosificaron oralmente con homodímero FVIIa-Fc, o híbrido monómero/dímero (que consistía en dos cadenas de Fc, una de las cuales estaba unida a Fc-VII). Se usó un volumen de 200 µl de una disolución de FVIIa-Fc para una dosis de 1 mg/kg. La disolución estaba comprendida por un tampón Tris-HCl pH 7,4 con 5 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja. Las ratas se sacrificaron por eutanasia con CO<sub>2</sub> a varios puntos de tiempo, y se recogieron 200 µl de sangre por punción cardiaca. El plasma se obtuvo por adición de un volumen 1/10 de disolución al 3,8% de citrato de sodio y se centrifugó a temperatura ambiente a una velocidad de 1.268xg. Las muestras de plasma se usaron en los ensayos frescas o congeladas a -20° C.

15 Las muestras se analizaron por ELISA. El ELISA Asserachrom Factor VII:Ag se realizó en las muestras de plasma de ratas neonatales. Un ensayo ELISA Factor VII:Ag se adquirió en Diagnostica Stago (Parsippany, NJ) y se realizó como se describe en el manual del kit con un cambio. El estándar para la curva estándar se reemplazó con Factor VIIa-Fc purificado. Para los experimentos in vivo, el estándar se corrió en el mismo porcentaje de plasma de animal normal que el se estaba analizando. Los resultados mostraron que la administración oral tanto de híbridos monómero/dímero como de dímeros fue exitosa (Figura 7). Un ensayo de curso de tiempo usando híbridos monómero/dímero demostró niveles plasmáticos sostenidos de Factor VIIa-Fc administrado oralmente con el tiempo con un T<sub>1/2</sub> de 18 horas (Figura 6).

#### 20 Ejemplo 8: Dosificación intravenosa de Factor VII-Fc en minicerdos

Se adquirieron minicerdos adultos Gottingen (6 kg) en Marshall Farms y se dejó que se aclimataran durante dos semanas. Los cerdos se anestesiaron con 12 mg/kg de Telazol y 8 mg/kg de Xilaxina y se dosificaron intravenosamente a través de la vena yugular con 3 ml de una disolución de 0,5 mg/kg de Factor VIIa-Fc en un tampón Tris-HCl pH 7,4. Se recogieron tres mls de sangre en tubos vacutainer citrados (BD Sciences, Franklin Lakes, NJ) a varios puntos de tiempo mediante punción venosa. El plasma se obtuvo centrifugando las muestras a temperatura ambiente a una velocidad de 1.268xg. Las muestras de plasma se congelaron a -20°C y posteriormente se analizaron por ELISA.

30 Se realizó el ELISA Asserachrom Factor VII:Ag en las muestras de minicerdo. Un ensayo ELISA Factor VII:Ag se adquirió en Diagnostica Stago (Parsippany, NJ) y se realizó como se describe en el manual del kit con un cambio. El estándar para la curva estándar se reemplazó con Factor VIIa-Fc purificado. Para los experimentos in vivo, el estándar se corrió en el mismo porcentaje de plasma de animal normal que el se estaba analizando. Los niveles plasmáticos de híbrido monómero/dímero administrado intravenosamente se muestran en la Figura 8A. Se determinó que la vida media era 9,4 horas. Un ensayo de curso de tiempo usando proteína química híbrida monómero/dímero demostró niveles plasmáticos sostenidos de Factor VIIa-Fc administrado intravenosamente con el tiempo con un T<sub>1/2</sub> de 22 horas (Figura 8A).

La actividad de coagulación se midió con el kit de ensayo StaClot FVIIa-rTF (Figura 8B). Se encontró que el T<sub>1/2</sub> para coagulación era 6,4 horas para un cerdo y 5,7 para el otro cerdo.

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

40 La secuencia codificadora del Factor IX humano, incluyendo la secuencia de prepropéptido, se obtuvo por amplificación con RT-PCR de ARN de hígado humano adulto usando los cebadores siguientes:

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

F9-R: 5'-TTTTTCGAATTCAGTGAGCTTTGTTTTTTCCTTAATCC-3' (SEQ ID NO: 22)

45 Se añadieron 20 ng de ARN de hígado humano adulto (Clontech, Palo Alto, CA) y 25 pmoles de cada cebador a una reacción de RT-PCR usando la RT-PCR en Una Etapa Superscript™ con sistema PLATINUM® Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) según el protocolo del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un Termociclador MJ usando los ciclos siguientes: 50°C 30 minutos; 94°C 2 minutos; 35 ciclos de (94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C 1 minuto), y un final de 72°C durante 10 minutos. El fragmento se purificó con gel usando el Kit de Extracción en Gel Qiagen (Qiagen, Valencia, CA), y se digirió con PstI-EcoRI, se purificó con gel, y se clonó en el digerido correspondiente del plásmido pED.dC.XFc. Las secuencias de aminoácidos y de ADN del factor IX-Fc se muestran en la Figura 9.

#### Ejemplo 10: Expresión y purificación del homodímero e híbrido monómero-dímero de Factor IX-Fc

Se establecieron células CHO DG-44 que expresan Factor IX-Fc. Las células DG44 se sembraron en placas en placas petri de cultivo tisular de 100 mm y se crecieron hasta una confluencia de 50%-60%. Se usó un total de 10 µg de ADN para transfectar una placa de 100 mm: para la transfección del homodímero, se usaron 8 µg de

pED.dC.Factor IX-Fc + 2 µg de pcDNA6-PACE; para la transfección del híbrido monómero-dímero, se usaron 8 µg de pED.dC.Factor IX-Fc + 1 µg de pcDNA3-FlagFc + 1 µg pcDNA6-PACE. Las células se transfectaron como se describe en el manual del reactivo de transfección Superfect (Qiagen, Valencia, CA). El medio se retiró de la transfección después de 48 horas y se reemplazó por MEM Alfa sin nucleósidos más 5% suero bovino fetal dializado y 10 µg/ml de Blastidina (Invitrogen, Carlsbad, CA) para ambas transfecciones, mientras la transfección de híbrido monómero-dímero también se suplementó con 0,2 mg/ml geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 3 días, las células se liberaron de la placa con 0,25% tripsina y se transfirieron a matraces de cultivo tisular T25, y la selección se continuó durante 10-14 días hasta que las células empezaron a crecer bien al establecerse líneas celulares estables. La expresión de proteína se amplificó posteriormente por la adición de 10 nM ó 100 nM metotrexato para el homodímero o híbrido monómero-dímero, respectivamente.

Para ambas líneas celulares, aproximadamente  $2 \times 10^7$  células se usaron para inocular 300 ml de medio de crecimiento en una botella rotatoria de 1.700 cm<sup>2</sup> (Coming, Coming, NY), suplementado con 5 µg/L de vitamina K<sub>3</sub> (bisulfito sódico de menadiona) (Sigma, St Louis, MO). Las botellas rotatorias se incubaron en 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante aproximadamente 72 horas. El medio de crecimiento se intercambiaba con 300 ml de medio de producción sin suero (DMEM/F12 con 5 µg/ml insulina bovina y 10 µg/ml Gentamicina), suplementado con 5 µg/L de vitamina K<sub>3</sub>. El medio de producción (medio condicionado) se recogió cada día durante 10 días y se almacenó a 4°C. Se añadió medio de producción fresco a las botellas rotatorias después de cada recogida y la botellas se retornaron al incubador. Antes de la cromatografía, el medio se aclaró usando un filtro SuporCap-100 (0,8/0,2 µm) de Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Todas las etapas siguientes se realizaron a 4°C. El medio aclarado se aplicó a una Proteína A Sefarosa, se lavó con 5 volúmenes de columna de 1X PBS (10 mM fosfato, pH 7,4, 2,7 mM KCl, y 137 mM NaCl), se eluyó con 0,1 M glicina, pH 2,7, y se neutralizó con 1/10 volumen de 1 M Tris-HCl, pH 9,0. La proteína se dializó en PBS.

La muestra de proteína de transfección híbrido monómero-dímero se sometió a purificación adicional, ya que contenía una mezcla de homodímero FIX-Fc:FIX-Fc, híbrido monómero-dímero FIX-Fc:Flag-Fc, y homodímero Flag-Fc:Flag-Fc. El material se concentró y se aplicó a una columna de Grado Prep Superdex 200 de 2,6 cm x 60 cm (318 ml) a una velocidad de flujo de 4 ml/minuto (36 cm/hora) y se eluyó con 3 volúmenes de columna de 1X PBS. Las fracciones correspondientes a dos picos en el detector UV se recogieron y analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones del primer pico contenían bien el homodímero FIX-Fc:FIX-Fc o el híbrido monómero-dímero FIX-Fc:FlagFc, mientras el segundo pico contenía el homodímero FlagFc:FlagFc. Todas las fracciones que contenían el híbrido monómero-dímero pero no el homodímero FlagFc se combinaron y se aplicaron directamente a una columna de M2 anti-FLAG sefarosa de 1,6 x 5 cm (Sigma Corp., St. Louis, MO) a una velocidad de flujo lineal de 60 cm/hora. Después de cargar, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de PBS. Los híbridos monómero-dímero se eluyeron con 100 mM Glicina, pH 3,0. Las fracciones de la elución que contenían el pico de proteína se neutralizaron añadiendo 1/10 volumen de 1 M Tris-HCl, y se analizaron por SDS-PAGE reductora y no reductora. Las fracciones se dializaron en PBS, se concentraron hasta 1-5 mg/ml, y se almacenaron a -80°C.

Debe entenderse que todos los números que expresen cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc. usados en la especificación y las reivindicaciones están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". De acuerdo con esto, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos indicados en la especificación y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan obtener por la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico se debe considerar a la luz del número de dígitos significativos y las estrategias de redondeo habituales.

Las realizaciones específicas descritas en la presente memoria se ofrecen sólo como ejemplo y no se pretende que sean limitantes de ninguna manera. Se pretende que la especificación y los ejemplos se consideren sólo como ejemplares, indicándose un alcance cierto de la invención por las reivindicaciones.

Los casos preferidos de la presente descripción se describen a continuación y se refieren como casos E1 a E15.

E1. Una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que dicha proteína quimérica comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina que es una pareja de unión de FcRn, un factor de coagulación seleccionado de Factor VII, un análogo del Factor VII, Factor VIIa y un análogo del Factor VIIa, y opcionalmente al menos un conector y en la que dicha composición farmacéutica es para el tratamiento de un trastorno hemostático.

E2. La composición farmacéutica de E1, que reduce el riesgo de incurrir en un episodio hemorrágico, infección, u oclusión del sitio de infección asociado con una administración parenteral.

E3. La composición farmacéutica de uno cualquiera de E1 ó 2, que tiene una vida media sérica o biodisponibilidad incrementada.

E4. La composición farmacéutica de E1, que se formula para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, sublingual, bucal, nasal, rectal, vaginal o a través de la ruta pulmonar o a través de una superficie mucosal

## ES 2 558 102 T3

- E5. La composición farmacéutica de uno cualquiera de E1-4, que se formula para administración a una dosis de 0,1-1.000 µg/kg.
- E6. La composición farmacéutica de uno cualquiera de E1-5, en la que la al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina comprende un fragmento Fc.
- 5 E7. La composición farmacéutica de E6, en la que el fragmento Fc es SEQ ID NO: 2.
- E 8. La composición farmacéutica de uno cualquiera de E1-7, en la que la proteína quimérica comprende SEQ ID NO: 1.
- E 9. La composición farmacéutica de uno cualquiera de E1-8, en la que dicha proteína quimérica es un dímero.
- E 10. La composición farmacéutica de E9, en la que dicho dímero es un homodímero.
- 10 E 11. La composición farmacéutica de uno cualquiera de E1-9, en la que dicha proteína quimérica es un híbrido monómero dímero.
- E 12. La composición farmacéutica de E1, en la que la proteína quimérica comprende la fórmula
- X-L-F
- 15 En la que F es un fragmento Fc de una inmunoglobulina y L es un conector o un enlace directo, y X es Factor VII, un fragmento biológicamente activo del Factor VII, Factor VIIa, o un fragmento biológicamente activo del Factor VIIa.
- E 13. La composición farmacéutica de uno cualquiera de E1-12, en la que dicho conector comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 20 aminoácidos.
- E 14. La composición farmacéutica de uno cualquiera de E1-13, en la que el conector comprende la secuencia - (GGS)<sub>n</sub>- o (GGGS)<sub>n</sub>, en las que n es un número entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 10.
- 20 E 15. Una proteína quimérica que comprende (i) al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina que es una pareja de unión de FcRn, (ii) un factor de coagulación seleccionado de Factor VII, un análogo del Factor VII, Factor VIIa y un análogo del Factor VIIa, y opcionalmente (iii) al menos un conector, para el tratamiento de un trastorno hemostático.

**Listado de secuencias**

<110> RIVERA, DANIEL S.  
 PETERS, ROBERT T.  
 BITONTI, ALAN J.

5 <120> PROTEÍNAS QUIMÉRICAS FACTOR DE COAGULACIÓN-FC PARA TRATAR HEMOFILIA

<130> 08945.0005-00000

<140> PCT/US04/13940

<141> 06-05-2004

<150> 60/468,837

10 <151> 06-05-2003

<160> 31

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 664

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de aminoácidos sintética

<400> 1

```

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

20

ES 2 558 102 T3

Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg  
145 150 155 160

Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Pro Trp Gln  
165 170 175

Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile  
180 185 190

Asn Thr Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile  
195 200 205

Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu  
210 215 220

Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Val Ala Gln Val  
225 230 235 240

Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
245 250 255

Leu Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val  
260 265 270

Pro Leu Cys Leu Pro Glu Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala  
275 280 285

Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gly Gln Leu Leu Asp  
290 295 300

Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu  
305 310 315 320

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
325 330 335

Pro Asn Ile Thr Glu Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
340 345 350

Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Gly Pro His Ala Thr  
355 360 365

His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gly  
370 375 380

Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser  
385 390 395 400

Gln Tyr Ile Glu Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg  
405 410 415

Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Phe Pro Asp Lys Thr His Thr  
420 425 430

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Ser Val  
435 440 445

ES 2 558 102 T3

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 450 455 460

Pro Glu Val Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 465 470 475 480

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 485 490 495

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Thr Tyr Arg  
 500 505 510

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 515 520 525

Glu Tyr Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 530 535 540

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 545 550 555 560

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Thr Lys Asn Gln  
 565 570 575

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 580 585 590

Val Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 595 600 605

Thr Pro Val Leu Asp Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 610 615 620

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 625 630 635 640

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Lys  
 645 650 655

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 660

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 2

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

Leu Gly Gly Pro Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp



<400> 4  
gccaacgcgt tcctggagga gctgcggccg ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60  
cagtgctcct tccgaggagc ccgggagatc ttcaaggacg cgggagaggac gaagctgttc 120  
tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180  
tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcca gggccggaac 240  
tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300  
tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360  
ctggcagacg ggggtgtcctg cacacccaca gttgaatc catgtgaaa aatacctatt 420  
ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480  
aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttgggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540  
accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggccact gtttcgaaa aatcaagaac 600  
tggaggaacc tgatcgcggt gctgggagag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag 660  
cagagccggc ggggtggcga ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720  
cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtggtgccc 780  
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgtgg ccttcgtgcy cttctcattg 840  
gtcagcggct ggggcccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900  
aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt ggggactcc 960  
ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020  
aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtgta cctgacggc 1080  
atcgtcagct ggggcccagg ctgcgcaacc gtgggcccact ttgggggtgta caccagggtc 1140  
tcccagtaca tccgagtggc gcaaaagctc atgctcag agccacgccc aggagtctc 1200  
ctgcgagccc catttcccga caaaactcac acgtgcccgc cgtgcccagc tccggaactg 1260  
ctgggagcac cgtagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacacct catgatctcc 1320  
cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 1380  
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 1440  
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtccctaccg tctgcacca ggactggctg 1500  
aatggcaagg agtacaatgt caaggtctcc aacaaagccc ctcccagccc ccatcgagaa 1560  
aacctctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc 1620  
ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaag gcttctatcc 1680  
cagcagacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac 1740  
gcctcccggtg ttggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa 1800  
gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa 1860  
ccaactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1900

<210> 5  
<211> 30  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido conector sintético

10 <220>  
<221> REPETICIÓN  
<222> (1)..(30)  
<223> Este péptido puede englobar 3 a 30 residuos como se especifica en la solicitud

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

15 <210> 6  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido conector sintético

<400> 6  
Gly Gly Gly  
1

25 <210> 7  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido conector sintético

<400> 7  
**Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser**  
 1 5

<210> 8  
 <211> 15  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido conector sintético

<400> 8  
**Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly**  
 10 1 5 10 15

<210> 9  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido conector sintético

<400> 9  
**Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly**  
 1 5 10 15

**Gly Ser**

20 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

25 <400> 10  
 gctggctagc caccatgga 19

<210> 11  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 11  
 cttgtcatcg tcgtccttgt agtcgtcacc agtggaaacct ggaac 45

35 <210> 12  
 <211> 67  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 40 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 12  
**gactacaagg acgacgatga caaggacaaa actcacacat gccaccgtg cccagctccg 60**  
**gaactcc 67**

<210> 13  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 13  
 tagtgatcc tcattacc g 21

5 <210> 14  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

10 <400> 14  
 ggtaagcttg ccatggagct gaggccctgg ttgc 34

<210> 15  
 <211> 27

15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

20 <400> 15  
 gtttcaatc tctaggacc actcgcc 27

<210> 16  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 16  
 gccaggccac atgactactc cgc 23

30 <210> 17  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

35 <400> 17  
 ggtgaattct cactcaggca ggtgtgaggg cagc 34

<210> 18  
 <211> 38  
 <212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 18  
 gctacctgca ggccaccatg gtctcccagg ccctcagg 38

45 <210> 19  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

50

<400> 19  
 cagttccgga gctgggcacg gcgggcacgt gtgagtttg tcgggaaatg g 51  
  
 <210> 20  
 <211> 33  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 <400> 20  
 10 ttactgcaga aggttatgca gcgcgtgaac atg 33  
  
 <210> 21  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 <400> 21  
 tttttcgaat tcagtgagct ttgttttc ctaatcc 38  
  
 <210> 22  
 20 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 25 <400> 22  
**Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys**  
 1 5  
  
 <210> 23  
 <211> 696  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de aminoácidos sintética

ES 2 558 102 T3

<400> 23

```

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
 1           5           10           15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
           20           25           30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
           35           40           45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
           50           55           60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
 65           70           75           80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
           85           90           95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
           100           105           110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
           115           120           125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
 130           135           140

```

ES 2 558 102 T3

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

ES 2 558 102 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 690 695

<210> 24

<211> 2091

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de oligonucleótido sintética

```

<400> 24
atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcacat ctgcctttta 60
ggatatctac tcagtgtctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt 120
ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaacctt 180
gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag cacgagaagt tttgaaaaac 240
actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat 300
ccatgtttaa atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc 360
tttggatttg aaggaaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga 420
tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaagggtg tttgctcctg tactgagggg 480
tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga 540
gtttctgttt cacaaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgttttcc tgatgtggac 600
tatgtaaatt ctactgaagc tgaaccatt ttggataaca tcaactcaaag cacccaatca 660
tttaatgact tcaactcgggt tgttggtgga gaagatgcca aaccaggtca attcccttgg 720
caggttgttt tgaatgtaaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa 780
tggattgtaa ctgctgcccc ctgtgttgaa actggtgtta aaattacagt tgtcgcaggt 840
gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt 900
cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ccttctggaa 960
ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa 1020
tacacgaaca tcttcctcaa atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc 1080
cacaaagggg gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc 1140
acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat 1200
gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa 1260
gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tgggggtgag agtgtgcaat gaaaggcaaa 1320
tatggaatat ataccaaggt atcccgggat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc 1380
actgaattcg ccggcgccgc tgcggtcgac aaaactcaca catgcccacc gtgccagca 1440
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaaaccaa ggacaccctc 1500
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct 1560
gaggtcaagt tcaactggta cgtggacgpc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 1620
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag 1680
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc 1740
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1800
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggg 1860
ttctatcccc gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1920
aagaccacgc ctcccgtgtt ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1980
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 2040
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaatg a 2091

```

<210> 25

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 25

```

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

```

10

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 26

```

His Gln Ser Leu Gly Thr Gln
1           5

```

20

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

25

<400> 27

```

His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys
1           5

```

<210> 28  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 28  
**His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys**  
 1 5

10 <210> 29  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <400> 29  
**Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln**  
 1 5

<210> 30  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido conector sintético

<220>  
 <221> REPETICIÓN  
 25 <222> (1)..(10)  
 <223> Este péptido puede englobar 1 a 10 residuos según se especifica en la solicitud

<400> 30  
**Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly**  
 1 5 10

<210> 31  
 <211> 50  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido conector sintético

35 <220>  
 <221> REPETICIÓN  
 <222> (1)..(50)  
 <223> Este péptido puede englobar 5 a 50 residuos según se especifica en la solicitud

<400> 31  
**Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly**  
 1 5 10 15  
**Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly**  
 20 25 30  
**Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly**  
 35 40 45  
 Gly Ser  
 40 50

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una proteína quimérica que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en la que dicha primera cadena comprende una región constante de inmunoglobulina o parte de ésta, que es una pareja de unión del receptor de Fc neonatal (FcRn), y un factor de la coagulación, y en la que dicha segunda cadena comprende una región constante de inmunoglobulina o parte de ésta, que es una pareja de unión de FcRn, sin un factor de la coagulación.
2. La proteína quimérica de la reivindicación 1, en la que el factor de coagulación es factor VIII, factor IX, factor XI, factor XII, fibrinógeno, protrombina, factor V, factor X, factor XIII, factor VII o factor VIIa.
3. La proteína quimérica de la reivindicación 2, en la que el factor de coagulación es factor VIII.
- 10 4. La proteína quimérica de la reivindicación 2, en la que el factor de coagulación es factor IX.
5. La proteína quimérica de la reivindicación 2, en la que el factor de coagulación es factor VII o factor VIIa.
6. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la parte de la región constante de inmunoglobulina en la primera cadena es un fragmento Fc y la parte de la región constante de inmunoglobulina en la segunda cadena es un fragmento Fc.
- 15 7. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en un método de tratamiento.
8. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de un trastorno hemostático.
9. La proteína quimérica para uso de la reivindicación 8, en la que el trastorno hemostático es hemofilia A o B.
- 20 10. Una primera construcción de ADN y una segunda construcción de ADN que conjuntamente codifican la proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la primera construcción de ADN codifica la primera cadena de dicha proteína quimérica y la segunda construcción de ADN codifica la segunda cadena de dicha proteína quimérica.
- 25 11. Un vector que comprende la primera y segunda construcciones de ADN de la reivindicación 10, o un primer vector que codifica la primera construcción de ADN de la reivindicación 10 y un segundo vector que codifica la segunda construcción de ADN de la reivindicación 10.
12. Una célula huésped que comprende la primera y segunda construcciones de ADN de la reivindicación 10, o el vector o vectores de la reivindicación 11.
13. Un método para preparar una proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el método comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 12, en la que la proteína quimérica se expresa.
- 30 14. Una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. La proteína quimérica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7, 8 ó 9, en la que la proteína quimérica es para administrarse intravenosamente, subcutáneamente, intramuscularmente, o a través de una superficie mucosal.
- 35 16. Una proteína quimérica que tiene una parte monomérica y una parte dimérica, en la que la parte dimérica comprende dos regiones constantes de inmunoglobulina o partes de éstas, cada una de las cuales es una pareja de unión del receptor Fc neonatal (FcRn), y la parte monomérica comprende un factor de la coagulación que está unido a una de las dos regiones constantes de inmunoglobulina o partes de éstas.

**Células Tisulares  
Endotelio Dañado  
Macrófagos Activados**

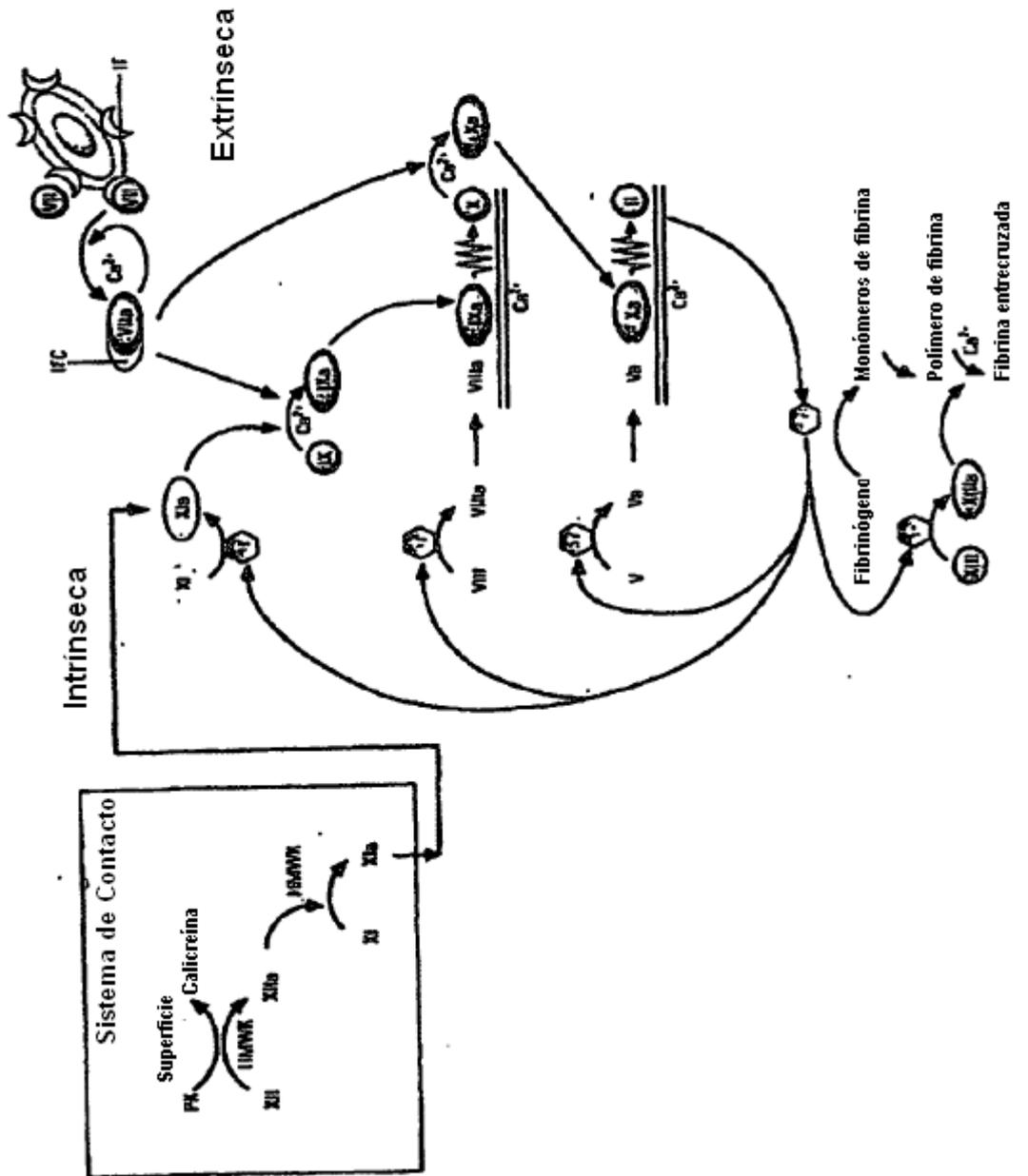


Fig. 1

# Factor VIIa/Fc

Fig. 2

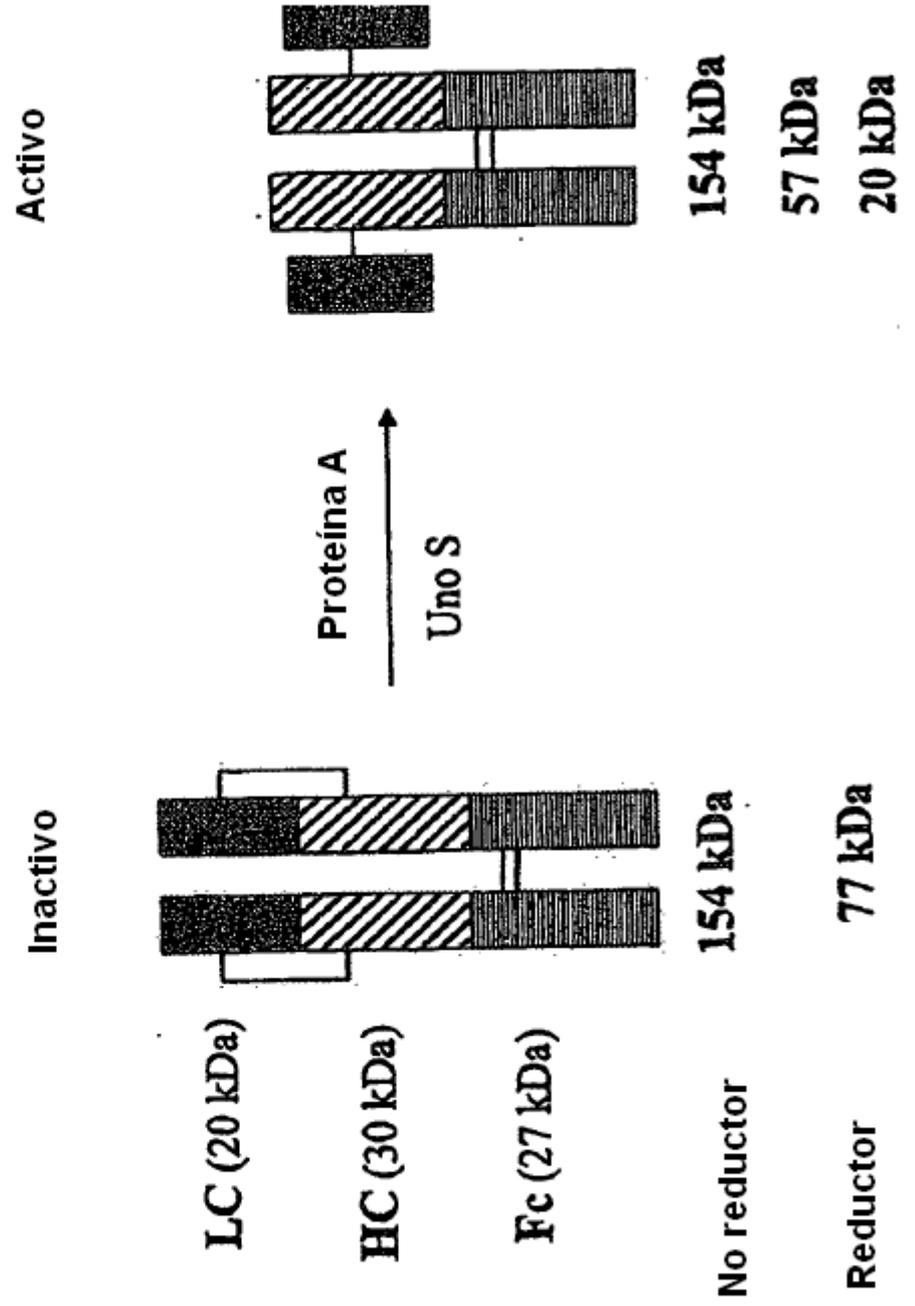


Fig. 3A

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

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

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

Fig. 3B

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

**Fig. 3C**

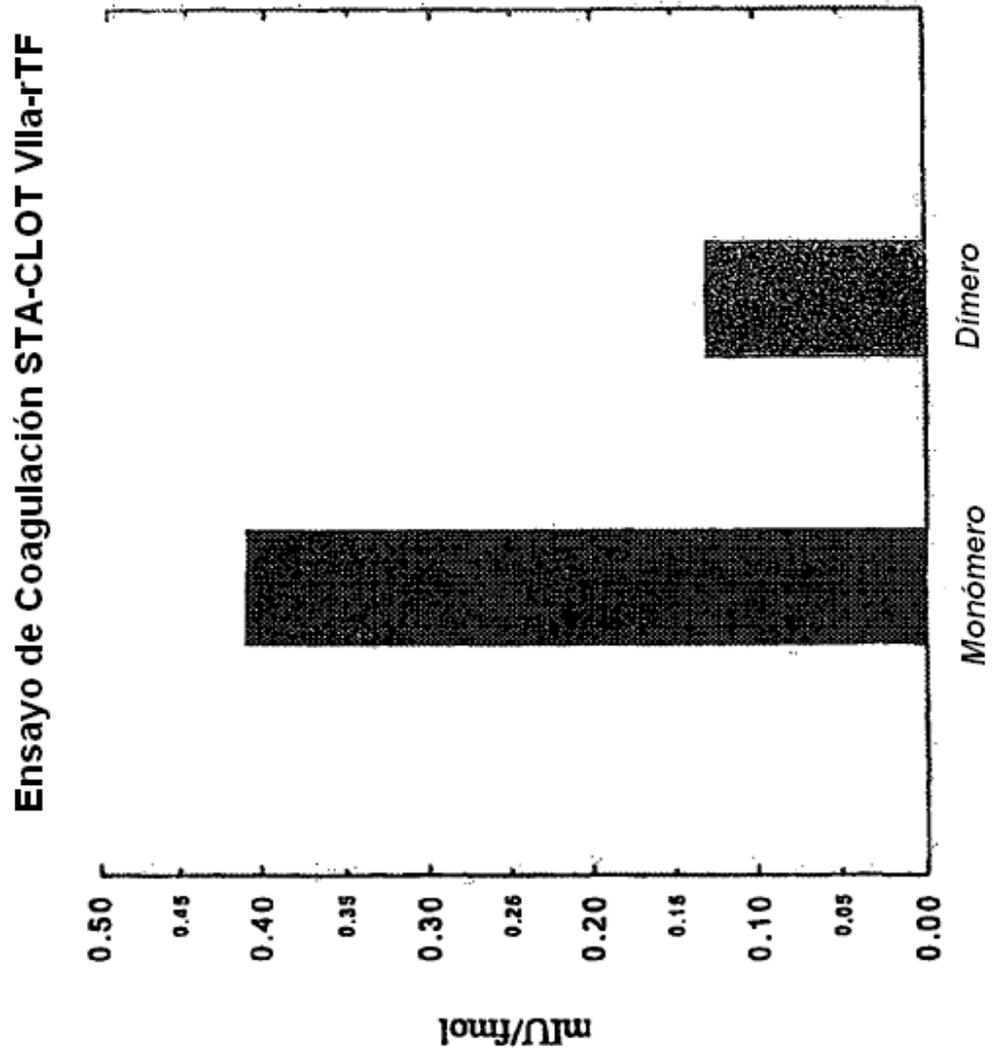
gacaaaactcacacgtgcccgccgtgccagctccggaactgctgggçggaccgt  
cagtcttctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggacccc  
tgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc  
aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggagg  
agcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacctcctgcaccagga  
ctggctgaatggcaaggagtacaatgtcaaggtctccaacaaagcccctcccagc  
ccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtg  
tacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct  
gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgg  
gcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgttgactccgacggctcc  
ttcttctctacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacg  
tcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagag  
ccttccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:3)

Fig. 3D

gccaacgcggtcctggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcaagg  
 aggagcagtgctccttcgaggaggcccgaggatcttcaaggacgcggagaggac  
 gaagctgttctggatttcttacagtgatggggaccagtggtgcctcaagtccatgc  
 cagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttctgcctcc  
 ctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgt  
 gaacgagaacggcggctgtgagcagtactgcagtgaccacacgggcaccaagcgc  
 tcctgtcggtgccacgaggggtactctctgctggcagacgggggtgctcctgcacac  
 ccacagttgaatatccatgtggaataatcctattctagaaaaaagaaatgccag  
 caaacccaaggccgaattgtggggggcaagggtgtgccccaaaggggagtggtcca  
 tggcaggtcctgttgttggtgaatggagctcagttgtgtggggggaccctgatca  
 acaccatctgggtggtctccgcggccactgttctgacaaaatcaagaactggag  
 gaacctgatcgcggtgctgggcgagcacgacctcagcgagcacgacgggggatgag  
 cagagccggcgggtggcgcaggtcatcatccccagcacgtacgtcccgggacca  
 ccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagccgtggtcctcactgacca  
 tgtggtgcccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttc  
 gtgcgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctggaccgtggcgccacgg  
 ccctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgaccaggactgcctgca  
 gcagtcacggaagggtgggagactccccaaatatcacggagtacatgttctgtgcc  
 ggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtgagggccacatg

ccaccactaccgggacacgtggtacctgacgggcatcgtcagctggggccaggg  
ctgcgcaaccgtgggccactttgggggtgtacaccagggtctcccagtaacatcgag  
tggetgcaaaagctcatgcgctcagagccacgcccaggagtcctcctgagagccc  
catttcccgacaaaactcacacgtgcccgcctgcccagctccggaactgctggg  
cggaccgtcagctctcctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcc  
cggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgagg  
tcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagcc  
gcgggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacctcctg  
caccaggactggctgaatggcaaggagtacaatgtcaaggtctccaacaaagccc  
ctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaac  
cacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcag  
cctgacctgcttgggtcaaaggcttctatcccagcgcacatcgccgtggagtgaggag  
agcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgttgactccg  
acggtccttcttctctacagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagca  
ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg  
cagaagagcctctccctgtctccgggtaa (SEQ ID NO:4)

Actividad de Coagulación de Proteínas  
FVIIa-Fc **Fig. 4**



Unión de Factor Villa-Fc a shFcRn

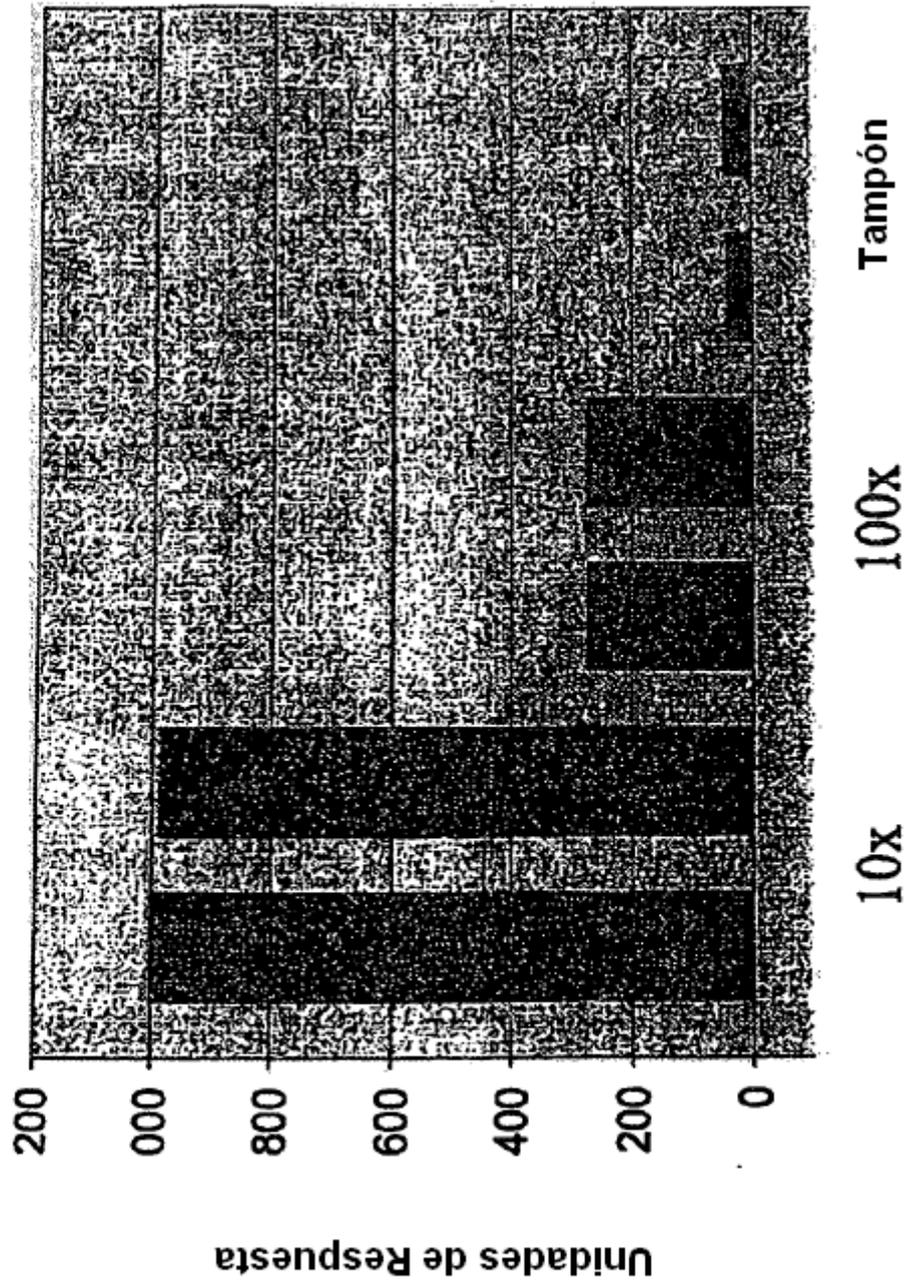


Fig. 5

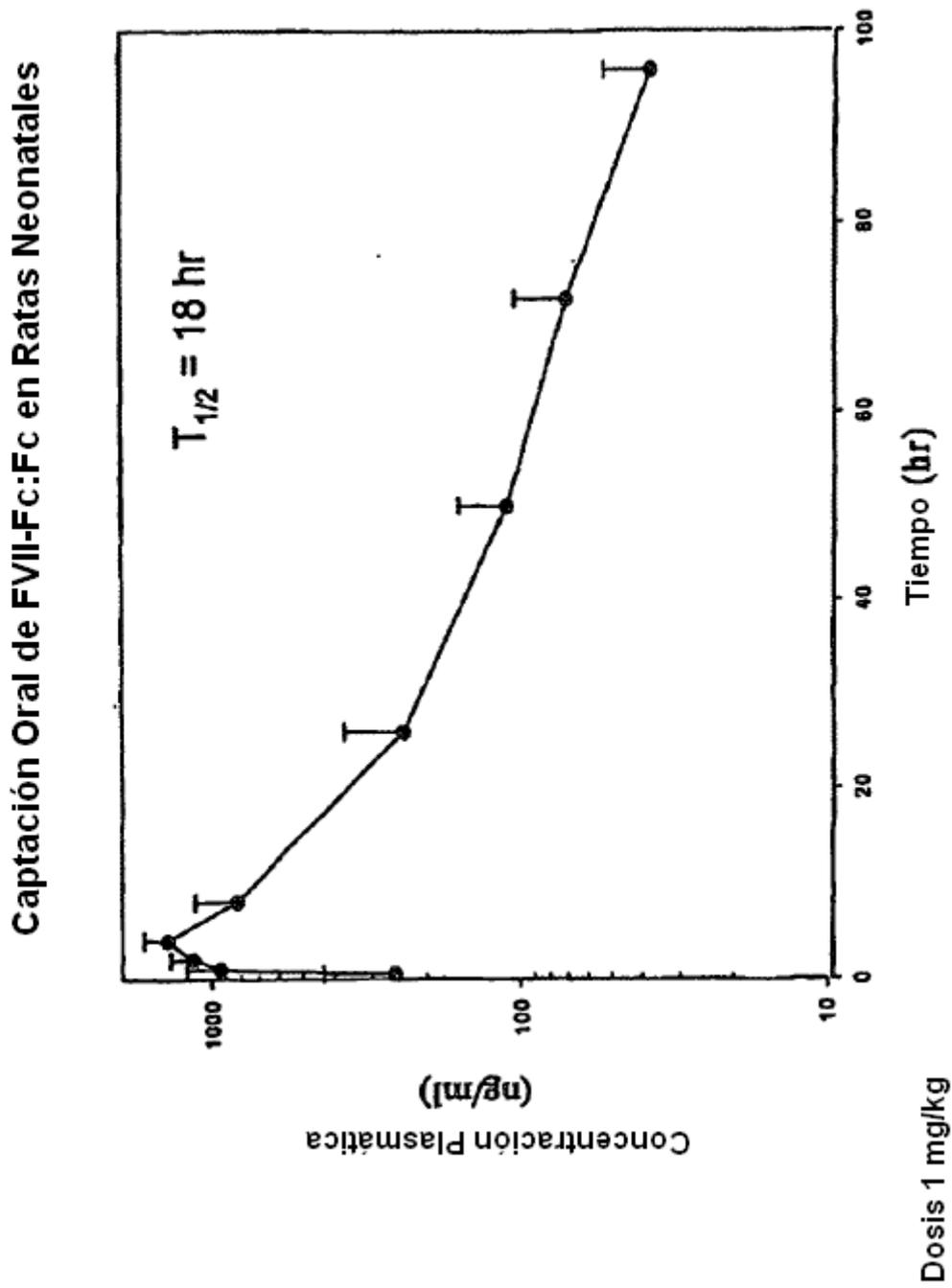
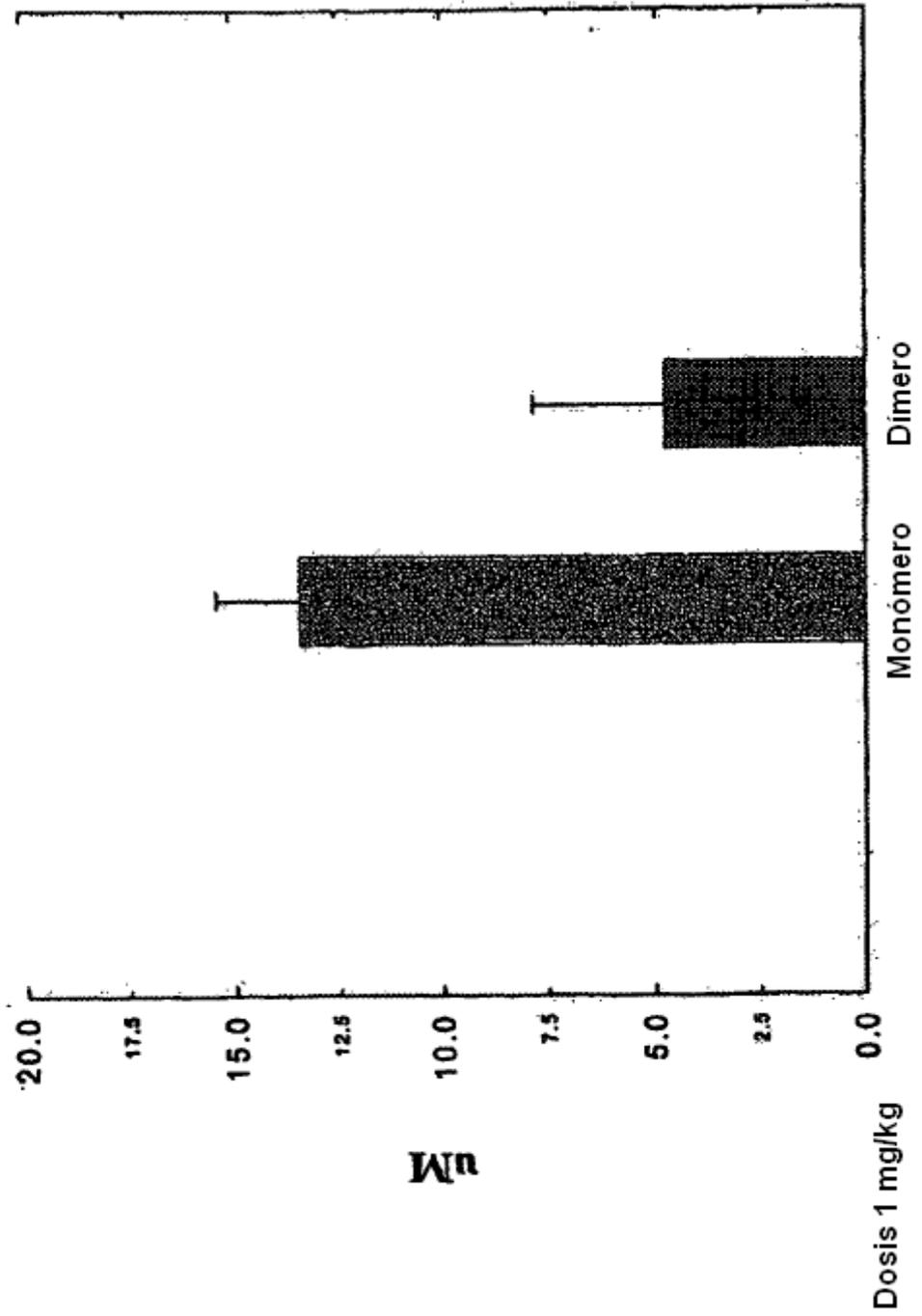


Fig. 6

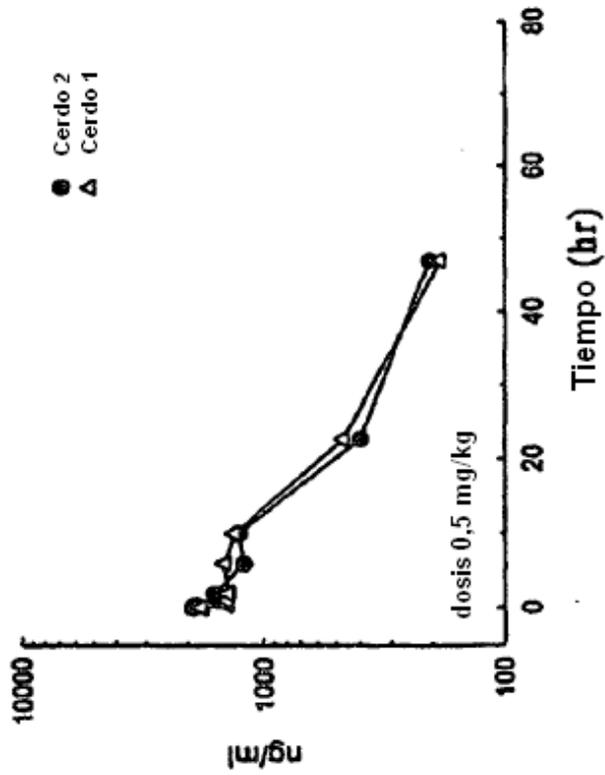
**Fig. 7**  
**ELISA FVII:Ag**  
**Captación Oral en Ratas Neonatales**



**PK Intravenoso de FVIIaFc:Fc en Minicerdos**

**Fig. 8A**

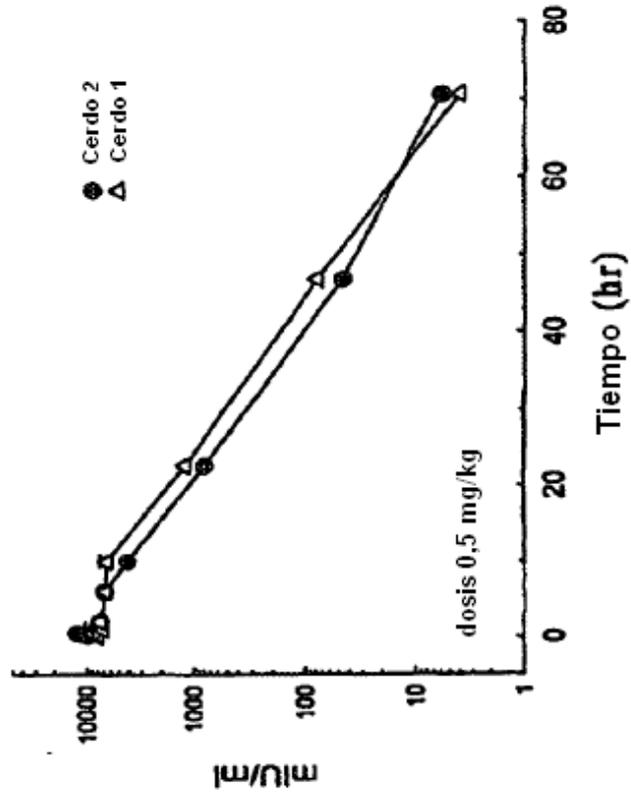
**Niveles Plasmáticos**



	$T_{1/2}$
Cerdo# 1	9.6 hr
Cerdo# 2	9.2 hr

**Fig. 8B**

**Actividad de Coagulación**



	$T_{1/2}$
Cerdo# 1	6.4 hr
Cerdo# 2	5.7 hr

Fig. 9a

Factor IX - Secuencia de aminoácidos de Fc (péptido señal subrayado, propéptido en negrita)

1	<u>MQRVNMIMAE</u>	<u>SPGLITICLL</u>	<u>GYLLSAECTV</u>	<u>FLDHENANKI</u>	<u>LNRPKRYNSG</u>
51	<b>KLEEFVQGNL</b>	<b>ERECMBEEKCS</b>	<b>FEEAREVPFEN</b>	<b>TERTTEFWKQ</b>	<b>YVDGDQCESN</b>
101	<b>PCLNGGCKD</b>	<b>DINSYECWCP</b>	<b>FGFEGKNCBL</b>	<b>DVTCNIKNGR</b>	<b>CEQFCIKNSAD</b>
151	<b>NKVVCSTEG</b>	<b>YRLAENQKSC</b>	<b>EPAVFPFCGR</b>	<b>VSVSQTSKLT</b>	<b>RAETVFPDVD</b>
201	<b>YVNSTEAETI</b>	<b>LDNITQSTQS</b>	<b>FNDFTRVVG</b>	<b>EDAKPGQFPW</b>	<b>QVVLNGKVDA</b>
251	<b>FCGGSIVNEK</b>	<b>WIVTAAHCVE</b>	<b>TGVKITVVAG</b>	<b>EHNIETEHT</b>	<b>EQRNVIRII</b>
301	<b>PHNYNAAIN</b>	<b>KYNHDIALLE</b>	<b>LDEPLVLNSY</b>	<b>VTPICIADKE</b>	<b>YTNIFLKFGS</b>
351	<b>GYVSGWGRVF</b>	<b>HKGRSALVLQ</b>	<b>YLRVPLVDRA</b>	<b>TCLRSTKFTI</b>	<b>YNNMFCAGFH</b>
401	<b>EGGRDSCQGD</b>	<b>SGGPHVTEVE</b>	<b>GTSFLTGIIS</b>	<b>WGBECAMK GK</b>	<b>YGIYTKVSR Y</b>
451	<b>VNWIKEKTKL</b>	<b>TEFAGAAAVD</b>	<b>KTHTCPPCPA</b>	<b>PELLGGPSVF</b>	<b>LFPFKPKDTL</b>
501	<b>MISRTPEVTC</b>	<b>VVVDVSHEDP</b>	<b>EVKFNWYVDG</b>	<b>VEVHNAKTKP</b>	<b>REEQYNSTYR</b>
551	<b>VVSVLTVLHQ</b>	<b>DWLNGKEYKC</b>	<b>KVSNKALPAP</b>	<b>IEKTISKAKG</b>	<b>QPREPQVYTL</b>
601	<b>PPSRDELTKN</b>	<b>QVSLTCLVKG</b>	<b>FYPSDIAVEW</b>	<b>ESNGQPENNY</b>	<b>KTPPVLDSD</b>
651	<b>GSFFLYSKLT</b>	<b>VDKSRWQGN</b>	<b>VPSCSVMHBA</b>	<b>LHNHYTQKSL</b>	<b>SLSPGK</b>

Fig. 9B

Factor IX - Secuencia de nucleótidos de Fc (péptido señal subrayado, propéptido en negrita)

atgcagcgcggtgaacatgatcatgqcagaatcaccaggectcatcaccatctgccttttaggat  
**atctactcagtgctgaatgtacagtttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaaatcg**  
**gccaagaggtataattcaggtaaattggaagagtttggtcaagggaaaccttgagagagaatgt**  
**atggaagaaaagtgtagtttgaagaagcagcagaagttttgaaaacactgaaagaacaactg**  
**aattttggaagcagtatgttgatggagatcagtggtgagtc caatccatgtttaaatggcggcag**  
**ttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtccctttggatttgaaggaaagaactgt**  
**gaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgagcagcagtttgtaaaaaatagtgctg**  
**ataacaaggtggtttgctcctgtactgagggatcgacttgcagaaaaccagaagtcctgtga**  
**accagcagtgccatttccatgtggaagagtttctgtttcacaaacttctaagctcaccogtgct**  
**gagactgttttctctgatgtggactatgtaaaattctactgaagctgaaaccattttggataaca**  
**tcactcaaagcaccatcatttaatgacttcaactcgggttggtgggagaagatgccaacc**  
**aggtcaattcccttggcaggttggtttgaaatggtaaaagttgatgcattctgtggaggctctatc**  
**gttaatgaaaaatggattgtaactgctgcccactgtgttgaaactgggtgtaaaattacagttg**  
**tcgcaggtgaacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaat**  
**tattcctcaccacaactacaatgcagctattaataagtacaaccatgacattgoccttctggaa**  
**ctggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacacctat ttgcattgctgacaaggaataca**  
**cgaacatcttctcctcaaatttggatctggctatgtaagtggctggggaagagcttccacaaagg**  
**gagatcagctttagttcttcagtaccttagagttccacttggtgaccgagccacatgtcttcca**  
**tctacaaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagatt**  
**catgtcaaggagatagtgggggacccatgttactgaagtggaaggaccagttcttaactgg**  
**aattattagctggggtgaagagtggtgcaatgaaaggcaaatatggaatatataccaaggtatcc**  
**cggtatgtcaactggattaaggaaaaaacaagctcactgaattcgccggcgccgctgcggtcg**

acaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtcttcct  
ctccccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctgggtg  
gtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtg  
ataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtaaacagcacgtaccgtggtcagcgtct  
cacgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtcccaacaaagca  
ctcccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgaggaaccacaggtg  
acacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtta  
aggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaactac  
aagaccacgcctcccgtgttggaactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcacgtgg  
acaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaca  
ccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga