

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 209**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36	(2006.01)
C07K 14/59	(2006.01)
C12N 9/64	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2010 PCT/IL2010/000532**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO2011004361**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2010 E 10796803 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2451473**

54 Título: **Factores de coagulación de acción prolongada y métodos para producir los mismos**

30 Prioridad:

09.07.2009 US 224366 P

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

21.06.2017

73 Titular/es:

**OPKO BIOLOGICS LTD. (100.0%)
16 Ashlegan Street
Kiryat Gat, 8211804, IL**

72 Inventor/es:

**FIMA, UDI EYAL y
HART, GILI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 618 209 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

Factores de coagulación de acción prolongada y métodos para producir los mismos.

Campo de la invención

5 Se describen polipéptidos y polinucleótidos que codifican los mismos que comprenden péptidos carboxi-terminales (CTP) de gonadotropina coriónica unidos a un extremo C (extremo carboxi) de los factores de coagulación Factor VII, Factor VIIa o Factor IX. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el polipéptido y polinucleótidos de la invención y métodos para usar los mismos.

Antecedentes de la invención

10 Los polipéptidos son susceptibles de desnaturalización o degradación enzimática en la sangre, hígado o riñón. De acuerdo con esto, los polipéptidos tienen típicamente vidas medias circulatorias cortas de varias horas. Debido a su baja estabilidad, los fármacos peptídicos se administran habitualmente en una frecuencia sostenida de manera que se mantiene una concentración plasmática efectiva del péptido activo. Además, como los fármacos peptídicos se administran habitualmente por infusión, la inyección frecuente de los fármacos peptídicos causa un malestar considerable a un sujeto. Así, existe una necesidad de tecnologías que prolongarán las vidas medias de los polipéptidos terapéuticos mientras se mantiene una alta eficacia farmacológica de éstos. Dichos fármacos peptídicos deseados también deberán cumplir los requerimientos de estabilidad en suero aumentada, alta actividad y una baja probabilidad de inducir una respuesta inmune indeseada cuando se inyectan en un sujeto.

15 La farmacocinética desfavorable, tal como una vida media en suero corta, puede prevenir el desarrollo farmacéutico de muchos candidatos a fármaco de otra manera prometedoros. La vida media en suero es una característica empírica de una molécula, y debe determinarse experimentalmente para cada nuevo fármaco potencial. Por ejemplo, con los fármacos polipeptídicos de menor peso molecular, los mecanismos de aclaramiento fisiológicos tales como filtración renal pueden hacer que el mantenimiento de niveles terapéuticos de un fármaco no sea factible debido al coste o frecuencia del régimen de dosificación requerido. A la inversa, una vida media en suero larga no es deseable cuando un fármaco o sus metabolitos tienen efectos secundarios tóxicos. US2007/0190611 describe un polipéptido que comprende al menos dos péptidos carboxi-terminales (CTP) de gonadotropina coriónica unidos a un péptido de interés.

Resumen de la invención

20 La presente invención proporciona un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa, o un factor de coagulación y tres CTP de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX, en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (es decir, la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS).

25 En otra realización, la presente invención proporciona además una molécula de polinucleótido que comprende una parte codificadora que codifica un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa, o que codifica un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y tres CTP de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX, en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (es decir, la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS).

30 En otra realización, la presente invención proporciona además un método para prolongar la vida media biológica de un factor de coagulación, que comprende la etapa de unir cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa, o unir tres CTP de gonadotropina coriónica humana al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX, en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (es decir, la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS), mejorando de esta manera la vida media biológica de dicho factor de coagulación.

35 En otra realización, la presente invención proporciona además un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) de un factor de coagulación, que comprende la etapa de unir cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa, o unir tres CTP de gonadotropina coriónica humana al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX, en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (es decir, la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS), mejorando de esta manera el área bajo la curva (AUC) de dicho factor de coagulación.

40 La invención también proporciona un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el

que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (es decir, la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS), para uso en el tratamiento de hemofilia, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa.

5 La invención también proporciona un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y tres péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (es decir, la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS), para uso en el tratamiento de hemofilia, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX.

10 En una realización, al menos un CTP comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

En una realización, al menos un CTP comprende al menos un sitio de glicosilación.

En otra realización, al menos un CTP se une a dicho factor de coagulación mediante un conector, conector que puede ser un enlace peptídico.

15 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el polipéptido, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, y una célula o una composición que comprende el vector de expresión.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama que ilustra la construcción rFVII-CTP (A), construcción rFVII-CTP-CTP (B), construcción rFIX-CTP (C), y construcción rFIX-CTP-CTP (D).

20 La Figura 2A es un gráfico de barras que muestra recolectas de células transfectadas con clon y seleccionadas con dilución limitada con variantes de FVII-CTP en presencia de 5µg/ml de Vitamina K3. El nivel de FVII se cuantificó usando ELISA de FVII (AssayPro).

La Figura 2B es un gráfico de barras que muestra recolectas de células transfectadas y seleccionadas con dilución limitada con variantes de FVII-CTP en presencia de 5µg de actividad de Vitamina K3. La actividad de FVII se cuantificó usando un ensayo de actividad cromogénico de FVII (AssayPro).

25 La Figura 2C es un gráfico de barras que muestra recolectas de células transfectadas y seleccionadas con dilución limitada con variantes de FVII-CTP en presencia de 5µg de Vitamina K3. La actividad específica de FVII se calculó para cada versión dividiendo el valor de actividad por la concentración de recolecta FVII.

30 La Figura 2D es un gráfico que muestra recolectas de células transfectadas y seleccionadas con dilución limitada con actividad de coagulación de FVII, FVII-CTP y FVII-(CTP)₂ comparado con la actividad de coagulación de plasma humano combinado normal.

La Figura 2E es un gráfico que muestra el perfil de PK de recolectas de FVII, FVII-CTP-CTP, y FVII-CTP.

35 La Figura 3A es un gráfico de barras que muestra recolectas de células transfectadas y seleccionadas con dilución limitada con variantes de FIX-CTP y FIX-CTP-CTP en presencia de 5µg/ml de Vitamina K3. El nivel de FIX se cuantificó usando un kit de ELISA de FIX humano (Affinity Biologicals; No. de cat. FIX-AG RUO), la concentración de proteína calculada (µg/ml) es el promedio de dos operaciones independientes.

40 La Figura 3B representa micrográficos de gel de SDS-PAGE de reconocimiento del Ab de FIX. El micrográfico A representa el reconocimiento del anticuerpo anti-FIX en transferencia Western; el micrográfico B representa el reconocimiento del anticuerpo anti-carboxilación y en transferencia Western. El carril 1 en A-B se cargó con una muestra que contenía FIX recombinante. El carril 2 en A-B se cargó con una muestra que contenía recolectas de FIX-CTP. El carril 3 en A-B se cargó con una muestra que contenía recolecta de FIX-(CTP)₂.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la actividad cromogénica comparativa de recolectas de FIX-CTP y FIX-(CTP)₂ (medida por una la concentración CE₅₀) comparado con rhFIX (American Diagnostics).

La Figura 5 es un gráfico que muestra la actividad de coagulación de recolectas de FIX-CTP y FIX-(CTP) comparado con la actividad de coagulación de rhFIX (American Diagnostics).

45 La Figura 6 es un gráfico que muestra el perfil de PK de rhFIX, recolecta de FIX-CTP-CTP, y recolecta de FIX-CTP.

La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra recolectas de FIX-CTP y FIX-CTP-CTP_MOD-3011 y MOD-3012, respectivamente recolectas y nivel de antígeno FIX de proteína purificada MOD3012 según se determina usando un kit ELISA de FIX humano (Affinity Biologicals; No. de cat. FIX-AG RUO), la concentración de proteína calculada (µg/ml) es el promedio de dos operaciones independientes.

La Figura 8 representa micrográficos de gel de SDS-PAGE de reconocimiento del Ab de FIX. El micrográfico A representa una tinción con azul de coomassie; el micrográfico B representa el reconocimiento del anticuerpo anti-FIX en transferencia Western; el micrográfico C representa el reconocimiento del anticuerpo anti-carboxilación y en transferencia Western. El carril 1 en A-C se cargó con una muestra que contenía FIX-(CTP)₂ (MOD-3012). El carril 2 en A-C se cargó con una muestra que contenía FIX-(CTP)₂ no unido. El carril 3 en A-C se cargó con una muestra que contenía una elución concentrada de FIX-(CTP)₂ (MOD-3012).

La Figura 9 es un gráfico que muestra la actividad cromogénica comparativa de MOD3012 (concentración de muestra/D.O.) comparado con plasma humano normal combinado y rhFIX (American Diagnostics).

La Figura 10 es un gráfico que muestra la actividad de coagulación comparativa de MOD3012 comparado con plasma humano normal combinado y rhFIX.

La Figura 11 es un gráfico que muestra el perfil de PK de MOD3012 purificado, rhFIX, recolecta de FIX-CTP-CTP, y recolecta de FIX-CTP.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona factores de coagulación de acción prolongada, métodos para producirlos y usos médicos de éstos. Los factores de coagulación de acción prolongada comprenden péptido carboxi terminal (CTP, también referido como unidad CTP) de Gonadotropina Coriónica humana (hCG). En otra realización, CTP actúa como un protector frente a la degradación de los factores de coagulación. En otra realización, CTP prolonga la C_{max} de los factores de coagulación. En otra realización, CTP prolonga el T_{max} de los factores de coagulación. En otra realización, CTP prolonga las vidas medias circulatorias de los factores de coagulación. En algunas realizaciones, CTP aumenta la potencia de los factores de coagulación.

Así, la presente invención proporciona un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa, o un factor de coagulación y tres CTP de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX, en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (es decir, la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS).

En otra realización, en la presente memoria se proporciona un método para prolongar una vida media biológica de un factor de coagulación, que comprende la etapa de unir cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa, o unir tres CTP de gonadotropina coriónica humana al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX, en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (es decir, la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS), mejorando de esta manera una vida media biológica del factor de coagulación.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) de un factor de coagulación, que comprende la etapa de unir cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa, o unir tres CTP de gonadotropina coriónica humana al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX, en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (es decir, la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS), mejorando de esta manera el área bajo la curva (AUC) del factor de coagulación.

En una realización de esta invención, el factor de coagulación es Factor VIIa (FVIIa). En otra realización, el factor de coagulación es Factor VII (FVII). En otra realización, el factor de coagulación es Factor IX (FIX).

En otra realización, el factor de coagulación es una glicoproteína, típicamente una glicoproteína dependiente de la vitamina K. En otra realización, el factor de coagulación es una proteína recombinante, tal como una glicoproteína recombinante. En otra realización, el factor de coagulación es un FVII recombinante. En otra realización, el factor de coagulación es un FIX recombinante. En otra realización, el factor de coagulación es un FVIIa recombinante.

En otra realización, el factor de coagulación se sintetiza como precursores con propéptido N-terminal. En otra realización, el factor de coagulación tal y como se usa en la presente memoria está en una forma pro-enzima inactiva. En otra realización, el factor de coagulación se produce en los hepatocitos. En otra realización, el factor de coagulación comprende un sitio de acoplamiento para gammacarboxilasa que convierte ácidos glutámicos (Glu) en ácidos glutámicos gamma carboxi (Gla). En otra realización, el factor de coagulación tal y como se usa en la presente memoria es un factor de coagulación disponible comercialmente.

En otra realización, la secuencia de aminoácidos del factor VII comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECK
EEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFCLPAF
EGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVE
YPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPCGECPWQVLLLNGAQLCGGTLINTIWWV
SAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLR
LHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPR
LMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFAGYSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLT
GIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (SEQ ID NO:

9). En otra realización, la secuencia de aminoácidos del factor VII comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECK
EEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFCLPAF
EGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVE
YPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPCGECPWQVLLLNGAQLCGGTLINTIWWV
SAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLR
LHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPR
LMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFAGYSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLT
GIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP*GCGR (SEQ
ID NO: 10).

5 En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el factor VII comprende la secuencia de ácido nucleico siguiente:

CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCA
GGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCCACGGCGTCTTGCA
CCGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGA
GAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAA
GGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTG
TGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTAT

ES 2 618 209 T3

ATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATG
ACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACC
ACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAG
ACGGGGTGTCTGACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCTATTCT
AGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGT
GCCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTT
GTGTGGGGGGACCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTC
GACAAAATCAAGAACTGGAGGAACTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCAGCAGCCTC
AGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCC
AGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACC
AGCCCGTGGTCTCACTGACCATGTGGTGCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTT
CTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAG
CTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCTCAACGTGCCCGGC
TGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAATA
TCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCAA
GGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACCTGAC
GGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTA
CACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCC
ACGCCAGGAGTCTCCTGCGAGCCCCATTTCCCTGAGGATGCGGCCGC (SEQ ID
NO: 11).

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el factor VII-CTP (unido al extremo carboxi) comprende la secuencia de ácido nucleico siguiente:

CTCGAGGACATGGTCTCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCA
GGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCACGGCGTCTTGCA
CCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGA
GAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAA
GGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTG
TGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTTAT
ATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATG
ACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACC
ACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAG
ACGGGGTGTCTGACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCTATTCT
AGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGT

GCCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTT
 GTGTGGGGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTC
 GACAAAATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTC
 AGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCC
 AGCACGTACGTCCCAGGCACCAACACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACC
 AGCCCGTGGTCCTACTGACCATGTGGTGCCCCCTCTGCCTGCCCCAACGGACGTT
 CTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAG
 CTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCCTAACGTGCCCCGGC
 TGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATA
 TCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCAA
 GGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
 TGACCGGCATCGTGAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCCACCGTGGGCCACTTCGGCG
 TGTACACCAGGGTGTCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAGAACTGATGAGAAGCG
 AGCCCAGACCCGGCGTGCTGCTGAGAGCCCCCTTCCCCAGCAGCAGCTCCAAGG
 CCCCTCCCCCTAGCCTGCCAGCCCTAGCAGACTGCCTGGGCCAGCGACACCCC
 CATCCTGCCCCAGTGAGGATCCGCGGCCGC (SEQ ID NO: 12).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos del factor VII-CTP (unido al extremo carboxi) comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECK
 EEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAF
 EGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTRKRCHEGYSLLADGVSCTPTVE
 YPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTI WVV
 SAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLR
 LHQPVVLT DHV VPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVR
 LMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMF CAGYS DGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLT
 GIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPSL
 PPSRLPGPSDTPILPQ* (SEQ ID NO: 13).

- 5 En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el factor VII-CTP-CTP (unido al extremo carboxi) comprende la secuencia de ácido nucleico siguiente:

CTCGAGGACATGGTCTCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCA
 GGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCCACGGCGTCTGCA
 CCGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGA

GAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAA
GGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTG
TGCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTAT
ATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATG
ACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACC
ACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAG
ACGGGGTGTCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCTATTCT
AGAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGT
GCCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTT
GTGTGGGGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTC
GACAAAATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTC
AGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCC
AGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACC
AGCCCGTGGTCTCACTGACCATGTGGTGCCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTT
CTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAG
CTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCTCAACGTGCCCGGGC
TGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAATA
TCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCAA
GGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACCTGAC
CGGCATCGTGAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCCACCGTGGGCCACTTCGGCGTGTA
CACCAGGGTGTCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAGAACTGATGAGAAGCGAGCC
CAGACCCGGCGTGCTGCTGAGAGCCCCCTTCCCCAGCAGCAGCTCCAAGGCCCT
CCCCCTAGCCTGCCAGCCCTAGCAGACTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCC
TGCCACAGAGCAGCTCCTCTAAGGCCCTCCTCCATCCCTGCCATCCCCCTCCCG
GCTGCCAGGCCCTCTGACACCCCTATCCTGCCTCAGTGATGAAGGTCTGGATCC
GCGGCCGC (SEQ ID NO: 14).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos del factor VII-CTP-CTP (unido al extremo carboxi) comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECK
EEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAF
EGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTRKSCRHEGYSLADGVSCTPTVE
YPCGKPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPCGECWQVLLLVNQAQLCGGTLINTIWVV
SAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLR
LHQPVVLTDHVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPR
LMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFACAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLT
GIVSWGQGCATVGHFVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSL
PSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ** (SEQ ID NO: 15).

5

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el factor IX comprende la secuencia de ácido nucleico siguiente:

GCGATCGCCATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATC
 ACCATTGCCTTTTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCAT
 GAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTG
 GAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGT
 TTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGA AACACTGAAAGAACA ACTGAATTTTGG
 AAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCA
 GTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGG
 AAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCA
 GTTTTGTAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGACTGAGGGATAT
 CGACTTGAGAAAACCAGAAGTCCGTGTAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGA
 AGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTCTGA
 TGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACATTTTGGATAACATCACTCAA
 AGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGAGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAAC
 CAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGG
 AGGCTCTATCGTTAATGAAAATGGATTGTA ACTGCTGCCACTGTGTTGAAACT
 GGTGTTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACAT
 ACAGAGCAAAAAGCGAAATGTGATTCTGAATTATTCCTCACCACAACTACAATGCA
 GCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGA ACTGGACGAACCCTTAG
 TGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACAT
 CTTCCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAA
 GGGAGATCAGCTTTAGTTCTCCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCA
 CATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTC
 CATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACT
 GAAGTGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGT
 GCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGG
 ATTAAGGAAAAAACAAAGCTCACTTGAACGCGGCCGC (SEQ ID NO: 16).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos del factor IX comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQ
 GNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINS
 YECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSC
 EPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVV
 GGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNI
 EETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIADKEYTNI
 FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFH
 EGGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKK
 TKLT* (SEQ ID NO: 17).

5 En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el factor IX-CTP (unido al extremo carboxi) comprende la secuencia de ácido nucleico siguiente:

GCGATCGCCATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATC
 ACCATCTGCCTTTTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCA
 TGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATT
 GGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAG
 TTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACA ACTGAATTTTG
 GAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGC
 AGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAG
 GAAAGA ACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGC
 AGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTG TACTGAGGGATA
 TCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCGTGTAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGA
 AGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTCTCGA
 TGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAA
 AGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGAGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAAC
 CAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGG
 AGGCTCTATCGTTAATGAAAATGGATTGTA ACTGCTGCCACTGTGTTGAAACT
 GGTGTTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACAT
 ACAGAGCAAAGCGAAATGTGATTTCGAATTATTCCTCACCACA ACTACAATGCA
 GCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGA ACTGGACGAACCCTTAG
 TGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACAT
 CTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAA
 GGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTGACCGAGCCA
 CATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTC
 CATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACT
 GAAGTGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGT
 GCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGG
 ATTAAGGAAAAAACAAGCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCCCTCCCCGAGC
 CTGCCCTCCCCAAGCAGGCTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCCTGCCACAGT
 GATGAAGGTCTGGATCCGCGGCCGC (SEQ ID NO: 18).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos del factor IX-CTP (unido al extremo carboxi) comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQ
 GNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINS
 YECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSC
 EPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVV
 GGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNI
 EETEHTEQKRN VIRIIPHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIADKEYTNI
 FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFH
 EGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKK
 5 TKLTSSSSKAPPPSLPSPRLPGSDTPILPQ** (SEQ ID NO: 19).

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el factor IX-CTP-CTP (unido al extremo carboxi) comprende la secuencia de ácido nucleico siguiente:

ES 2 618 209 T3

GCGATCGCCATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATC
ACCATCTGCCTTTTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCA
TGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAAATTCAGGTAAATT
GGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAG
TTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGA AAAACACTGAAAGAACA ACTGAATTTG
GAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGC
AGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAG
GAAAGA ACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGC
AGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTG TACTGAGGGATA
TCGACTTG CAGAAAACCAGAAGTCCGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGA
AGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCTGA
TGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAA
AGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGAGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAAC
CAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGG
AGGCTCTATCGTTAATGAAAATGGATTGTA ACTGCTGCCACTGTGTTGAAACT
GGTGTTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACAT
ACAGAGCAA AAGCGAAATGTGATTTCGAATTATTCCTCACCACA ACTACAATGCA
GCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGA ACTGGACGAACCCTTAG
TGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTACAAGGAATACACGAACATC
TTCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAG
GGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCAC
ATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCC
ATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTG
AAGTGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTG
CAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGA
TTAAGGAAAAAACA AAGCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCCCTCCCCGAGCC
TGCCCTCCCCAAGCAGGCTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCCTGCCACAGAG
CAGCTCCTCTAAGGCCCTCCTCCATCCCTGCCATCCCCCTCCCGGCTGCCTGGCC
CCTCTGACACCCCTATCCTGCCTCAGTGATGAAGGTCTGGATCCGCGGCCGC
(SEQ ID NO: 20).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos del factor IX-CTP-CTP (unido al extremo carboxi) comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQ
 GNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINS
 YECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSC
 EPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVV
 GGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIKNEKWIWVTAHCVETGVKITVVAGEHNI
 EETEHEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI
 FLKFGSGYVSGWGRVFKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFH
 EGGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKK
 TKLTSSSSKAPPSLPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGSDTPILPQ**

(SEQ ID NO: 21).

5 En otra realización, se añade furina a una célula que expresa el factor de coagulación-CTP de la invención. En otra realización, la furina incrementa la eficiencia de la producción de un factor de coagulación-CTP de la invención en una célula. En otra realización, la furina se co-transfecta con el vector que comprende la secuencia codificadora del factor de coagulación-CTP de la invención. En otra realización, la furina está codificada por un vector separado. En otra realización, la furina y un factor de coagulación-CTP están codificados por un vector. En otra realización, la secuencia codificadora de la furina se inserta en pCI-DHFR. En otra realización, la secuencia codificadora de la furina se prepara por ingeniería en pCI-dhfr/smal+NotI, Furin/AsiI F.I.+NotI.

10 En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica la furina comprende la secuencia de ácido nucleico siguiente:

tctagagtgcacccCGCCATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGCTATGGGTGGTAGCAGCAACA
 GGAACCTTGGTCCTGCTAGCAGCTGATGCTCAGGGCCAGAAGGTCTTACCAACA
 CGTGGGCTGTGCGCATCCCTGGAGGCCAGCGGTGGCCAACAGTGTGGCACGGA
 AGCATGGGTTCCCTCAACCTGGGCCAGATCTTCGGGGACTATTACCACTTCTGGCA
 TCGAGGAGTGACGAAGCGGTCCCTGTCGCCTCACCGCCCGCGGCACAGCCGGCT
 GCAGAGGGAGCCTCAAGTACAGTGGCTGGAACAGCAGGTGGCAAAGCGACGGA
 CTAAACGGGACGTGTACCAGGAGCCACAGACCCCAAGTTTCCCTCAGCAGTGGT
 ACCTGTCTGGTGTCACTCAGCGGGACCTGAATGTGAAGGCGGCCTGGGCGCAGG
 GCTACACAGGGCACGGCATTGTGGTCTCCATTCTGGACGATGGCATCGAGAAGA
 ACCACCCGACTTGGCAGGCAATTATGATCCTGGGGCCAGTTTTGATGTCAATGA
 CCAGGACCCTGACCCCCAGCCTCGGTACACACAGATGAATGACAACAGGCACGG
 CACACGGTGTGCGGGGGAAGTGGCTGCGGTGGCCAACAACGGTGTCTGTGGTGT
 AGGTGTGGCCTACAACGCCCGCATTGGAGGGGTGCGCATGCTGGATGGCGAGGT
 GACAGATGCAGTGGAGGCACGCTCGCTGGGCCTGAACCCCAACCACATCCACAT
 CTACAGTGCCAGCTGGGGCCCCGAGGATGACGGCAAGACAGTGGATGGGCCAGC
 CCGCCTCGCCGAGGAGGCCTTCTTCCGTGGGGTTAGCCAGGGCCGAGGGGGGCT
 GGGCTCCATCTTTGTCTGGGCCTCGGGGAACGGGGGCGGGAACATGACAGCTG
 CAACTGCGACGGCTACACCAACAGTATCTACACGCTGTCCATCAGCAGCGCCAC
 GCAGTTTGGCAACGTGCCGTGGTACAGCGAGGCCTGCTCGTCCACACTGGCCACG
 ACCTACAGCAGTGGCAACCAGAATGAGAAGCAGATCGTGACGACTGACTTGGCG
 CAGAAGTGCACGGAGTCTCACACGGGCACCTCAGCCTCTGCCCCCTTAGCAGCCG
 GCATCATTGCTCTCACCTGGAGGCCAATAAGAACCTCACATGGCCGGGACATGC

ES 2 618 209 T3

AACACCTGGTGGTACAGACCTCGAAGCCAGCCCACCTCAATGCCAACGACTGGG
CCACCAATGGTGTGGGCCGAAAGTGAGCCACTCATATGGCTACGGGCTTTTGG
ACGCAGGCGCCATGGTGGCCCTGGCCCAGAATTGGACCACAGTGGCCCCCAGC
GGAAGTGCATCATCGACATCCTCACCGAGCCCAAAGACATCGGGAAACGGCTCG
AGGTGCGGAAGACCGTGACCGGTGCCTGGGCGAGCCCAACCACATCACTCGGC
TGGAGCACGCTCAGGCGGGCTCACCTGTCTATAATCGCCGTGGCGACCTGGC
CATCCACCTGGTCAGCCCCATGGGCACCCGCTCCACCCTGCTGGCAGCCAGGCCA
CATGACTACTCCGCAGATGGGTTTAATGACTGGGCCTTCATGACAACTCATTCT
GGGATGAGGATCCCTCTGGCGAGTGGGTCTAGAGATTGAAAACACCAGCGAAG
CCAACAATATGGGACGCTGACCAAGTTACCCCTCGTACTCTATGGCACCGCCCC
TGAGGGGCTGCCCCGTACCTCCAGAAAGCAGTGGCTGCAAGACCCTCACGTCCAG
TCAGGCCTGTGTGGTGTGCGAGGAAGGCTTCTCCCTGCACCAGAAGAGCTGTGTC
CAGCACTGCCCTCAGGCTTCGCCCCCAAGTCCTCGATACGCACTATAGCACCG
AGAATGACGTGGAGACCATCCGGGCCAGCGTCTGCGCCCCCTGCCACGCCTCAT
GTGCCACATGCCAGGGGCCGGCCCTGACAGACTGCCTCAGCTGCCCCAGCCACG
CCTCCTTGACCTGTGGAGCAGACTTGCTCCCGCAAAGCCAGAGCAGCCGAG
AGTCCCCGCCACAGCAGCAGCCACCTCGGCTGCCCCGGAGGTGGAGGCGGGGC
AACGGCTGCGGGCAGGGCTGCTGCCCTCACACCTGCCTGAGGTGGTGGCCGGCC
TCAGCTGCGCCTTCATCGTGCTGGTCTTCGTCACCTGTCTTCTGGTCTGCAGCTG
CGCTCTGGCTTTAGTTTTCGGGGGTGAAGGTGTACACCATGGACCGTGGCCTCA
TCTCTACAAGGGGCTGCCCCCTGAAGCCTGGCAGGAGGAGTGGCCGTCTGACTC
AGAAGAGGACGAGGGCCGGGGCGAGAGGACCGCCTTTATCAAAGACCAGAGCG
CCCTCTGAACGCGGCCGC (SEQ ID NO: 22).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos de la furina comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGF
LNLGQIFGDYYHFWHRGVTKRSLSPHRPHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKRDV
YQEPTDPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQGYTGHGIVVSILDDGIEKNHPDLA
NYDPGASFDVNDQDPDPQRYTQMNDNRHGTRCAGEVAAVANNGVCGVGVAYNA
RIGGVRMLDGEVTDAVEARSLGLNPNHIHYSASWGPEDDGKTVDGPARLAEAEFFR
GVSQGRGGLGSIFVWASGNGGREHDSNCNDGYTNSIYTLSSSATQFGNVPWYSEAC
SSTLATTYSSGNQNEKQIVTTDLRQKCTESHTGTSASAPLAAGIALTLEANKNLTWR
DMQHLVVQTSKPAHLNANDWATNGVGRKVSHSYGYGLLDAGAMVALAQNWTTV
APQRKCIIDILTEPKDIGKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQARLTLSYNRRGLAI
HLVSPMGTRSTLLAARPHDYSADGFNDWAFMTTHSWDEDPSGEWVLEIENTSEANN
YGTLTkFTLVLYGTAPEGLPVPPESSGCKTLTSSQACVVCEEGFSLHQKSCVQHCPG
FAPQVLDTHYSTENDVETIRASVCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPSHASLDPVEQTC
SRQSQSSRESPPQQPPRLPPEVEAGQRLRAGLLPSHLPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFL
VLQLRSGFSFRGVKVVYTMDRGLISYKGLPPEAWQECPDSEDEGRGERTAFIKDQ
SAL* (SEQ ID NO: 23).

En algunas realizaciones, el término factor de coagulación incluye además homólogos de factores de coagulación conocidos que tienen una actividad coagulante. En algunas realizaciones, la homología según la presente invención también engloba variantes de delección, inserción, o sustitución, incluyendo una sustitución de aminoácido de éstas y fragmentos polipeptídicos biológicamente activos de éstas.

5 En otra realización, la invención incluye homólogos de un factor de coagulación como se describe en la presente memoria que tienen una actividad de coagulación. En otra realización, los homólogos, por ejemplo, polipéptidos que son al menos 85%, al menos 87%, al menos 89%, al menos 91%, al menos 93%, al menos 95% o, es más, 99% homólogos a un factor de coagulación según se determina usando software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parámetros por defecto.

10 En otra realización, la invención incluye homólogos de la furina. En otra realización, los homólogos, por ejemplo, polipéptidos que son al menos 85%, al menos 87%, al menos 89%, al menos 91%, al menos 93%, al menos 95% o, es más, 99% homólogos a una furina según se determina usando software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parámetros por defecto.

15 En otra realización, un factor de coagulación preparado por ingeniería como se describe en la presente memoria es al menos equivalente al factor de coagulación no modificado con CTP, en términos de medidas farmacológicas tales como farmacocinética y/o farmacodinámica.

En otras realizaciones, un factor de coagulación preparado por ingeniería se pretende para usarse para el tratamiento de pacientes con hemofilia B. En otras realizaciones, un factor de coagulación preparado por ingeniería puede reducir la velocidad de las infusiones, reducir las dosis requeridas, o una combinación de éstas.

20 Tal y como se describe en la presente memoria, el factor de coagulación IX que comprende 2 CTP en tándem en su extremo carboxi (MOD-3012) presenta un perfil de PK mejorado mientras mantiene su actividad de coagulación frente a recolecta de FIX-CTP o rhFIX. También como se describe en la presente memoria, el factor de coagulación IX que comprende 2 CTP en tándem en su extremo carboxi (MOD-3012) presenta un incremento de 3 veces en su vida media y una AUC 4,5 veces mayor comparado con rhFIX.

25 Los términos "péptido CTP", "péptido carboxi terminal" y "secuencia CTP" se usan indistintamente en la presente memoria. En una realización, el péptido carboxi terminal es un CTP de longitud completa. En otra realización, el péptido carboxi terminal es un CTP truncado.

30 En otras realizaciones, el término factor de coagulación preparado por ingeniería comprende la secuencia de aminoácidos de un factor de coagulación maduro. En otras realizaciones, el término factor de coagulación preparado por ingeniería comprende la secuencia de aminoácidos de un factor de coagulación incluyendo su secuencia señal o péptido señal.

En otra realización, "secuencia señal" y "péptido señal" se usan indistintamente en la presente memoria. En otra realización, "secuencia" cuando hace referencia a una molécula de polinucleótido puede referirse a una parte codificadora.

35 En otra realización, un factor de coagulación preparado por ingeniería de la invención que comprende al menos un CTP como se describe en la presente memoria tiene una actividad biológica in-vivo aumentada comparado con el mismo factor de coagulación sin al menos un CTP.

40 En la presente memoria se describe que al menos una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del factor de coagulación proporciona una protección aumentada frente a la degradación de un factor de coagulación. En algunas realizaciones, al menos una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del factor de coagulación proporciona una protección aumentada frente al aclaramiento. En algunas realizaciones, al menos una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del factor de coagulación proporciona un tiempo de aclaramiento prolongado. En algunas realizaciones, al menos una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del factor de coagulación aumenta su C_{max} . En algunas realizaciones, al menos una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del factor de coagulación proporciona una protección aumentada frente a aumenta su T_{max} . En algunas realizaciones, al menos una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del factor de coagulación prolonga su $T_{1/2}$.

45 En otra realización, un factor de coagulación conjugado de esta invención se usa de la misma manera que un factor de coagulación conjugado no modificado. En otra realización, un factor de coagulación conjugado de esta invención tiene una vida media circulante y tiempo de residencia en plasma incrementados, aclaramiento disminuido, y actividad clínica *in vivo* incrementada. En otra realización, debido a las propiedades mejoradas del factor de coagulación conjugado como se describe en la presente memoria, este conjugado es para administrarse menos frecuentemente que la forma no modificada del mismo factor de coagulación.

50 En otra realización, la frecuencia de administración disminuida resultará en un cumplimiento mejorado del paciente que da lugar a resultados mejorados del tratamiento, así como calidad de vida mejorada del paciente. En otra realización, comparado con conjugados convencionales de factores de coagulación, se ha encontrado que los

55

conjugados que tienen el peso molecular y la estructura de conector de los conjugados de esta invención tienen una potencia mejorada, estabilidad mejorada, niveles elevados de AUC, y vida media circulante aumentada.

5 En otra realización, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende el factor de coagulación conjugado como se describe en la presente memoria. En otra realización, en la presente memoria se proporciona una composición farmacéutica que comprende el factor de coagulación conjugado como se describe en la presente memoria. En otra realización, se determina una cantidad terapéuticamente efectiva de un factor de coagulación conjugado según factores como el tipo exacto de afección que se está tratando, la afección del paciente que se está tratando, así como los demás ingredientes en la composición. En otra realización, una cantidad terapéuticamente efectiva de un factor de coagulación conjugado es entre 50-500 UI por kg de peso corporal administrado una vez al día a una vez a la semana. En otra realización, una cantidad terapéuticamente efectiva de un factor de coagulación conjugado es 150-250 UI por kg de peso corporal, administrado una vez al día. En otra realización, una composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación conjugado se formula con un contenido efectivo para administración por varios medios a un paciente humano.

15 En otra realización, un factor de coagulación conjugado de la invención como se describe en la presente memoria es útil en el tratamiento de sujetos que padecen hemofilia. En otra realización, un factor de coagulación conjugado como se describe en la presente memoria es útil en la terapia profiláctica de hemofilia reduciendo así el riesgo de hemorragia y complicaciones asociadas. En otra realización, un factor de coagulación conjugado como se describe en la presente memoria es útil en el tratamiento de sujetos que padecen hemofilia mientras reduce el riesgo de desarrollar anticuerpos inhibidores frente a factores de coagulación administrados exógenamente. En otra realización, un factor de coagulación conjugado como se describe en la presente memoria es útil en el tratamiento de sujetos que padecen hemofilia reduciendo así la homeostasis.

25 Tal y como se describe en la presente memoria, un factor de coagulación conjugado de la invención como se describe en la presente memoria es útil en el tratamiento de sujetos que experimentan una hemorragia o hematoma excesivo o que tienen un tiempo de protrombina (PT) o tiempo de tromboplastina parcial (PTT) prolongado. Tal y como se describe en la presente memoria, un factor de coagulación conjugado como se describe en la presente memoria es útil en el tratamiento de sujetos que tienen una afección adquirida que está causando hemorragia, tal como deficiencia de vitamina K o enfermedad hepática; en el tratamiento de sujetos que tienen deficiencias en factores de coagulación que son adquiridas (debido a otras enfermedades) o heredadas, leves o graves, permanentes o temporales; en el tratamiento de sujetos que padecen hemofilia A; en el tratamiento de sujetos que padecen hemofilia B; en el tratamiento de sujetos que tienen deficiencias adquiridas debido a enfermedades crónicas, tales como enfermedad hepática o cáncer; a una afección aguda tal como coagulación intravascular diseminada (DIC), que agotan los factores de coagulación a una velocidad rápida; o a una deficiencia en vitamina K o tratamiento con un antagonista de la vitamina K como warfarina (la producción de los factores II, VII, IX, y X requiere vitamina K); y en el tratamiento de sujetos que padecen una enfermedad que causa desequilibrios de coagulación tal como pero no limitado a: una enfermedad hepática, uremia, un cáncer, un trastorno de la médula ósea, una exposición a veneno de serpiente, una deficiencia de vitamina K, una terapia anticoagulante, una ingestión accidental del anticoagulante warfarina, transfusiones de sangre múltiples (las unidades almacenadas de sangre pierden algunos de sus factores de coagulación).

35 En otra realización, un sujeto tal y como se usa en la presente memoria es un sujeto humano. En otra realización, un sujeto es una mascota. En otra realización, un sujeto es un mamífero. En otra realización, un sujeto es un animal de granja. En otra realización, un sujeto es un mono, un caballo, una vaca, un ratón o una rata.

45 En otra realización, un [(CTP)_{n>1}-factor de coagulación] como se describe en la presente memoria comprende un factor de coagulación de longitud completa o un fragmento activo de éste conectado mediante un enlace peptídico en su extremo carboxi al menos a una unidad de CTP sin CTP en su extremo amino. En otra realización, un [(CTP)_{n>1}-factor de coagulación] como se describe en la presente memoria comprende un factor de coagulación o un fragmento activo de éste conectado mediante un enlace peptídico al menos a una unidad de CTP que está conectado a una unidad de CTP adicional mediante un enlace peptídico sin CTP en su extremo amino. En otra realización, una molécula de ácido nucleico codifica un factor de coagulación preparado por ingeniería que comprende al menos un CTP unido a su extremo C y sin CTP en su extremo amino.

50 En otra realización, el CTP está unido al factor de coagulación mediante un conector. En otra realización, el conector que conecta la secuencia de CTP con el factor de coagulación es un enlace covalente. En otra realización, el conector que conecta la secuencia de CTP con el factor de coagulación es un enlace peptídico. En otra realización, el conector que conecta la secuencia de CTP con el factor de coagulación es un enlace peptídico sustituido. En otra realización, la secuencia de CTP comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

55 En otra realización, la SEQ ID NO: 1 comprende la secuencia de aminoácidos (AA) siguiente: DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTPIL (SEQ ID NO: 1). En otra realización, la SEQ ID NO: 2 comprende la secuencia de aminoácidos (AA) siguiente: SSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ (SEQ ID NO: 2).

- 5 En otra realización, el péptido carboxi terminal (CTP) de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 112 a la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana, como se muestra en SEQ ID NO: 1. En otra realización, la secuencia de CTP de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 118 a la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana, como se muestra en SEQ ID NO: 2. En otra realización, la secuencia de CTP también comienza desde cualquier posición entre las posiciones 112-118 y termina en la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana. En algunas realizaciones, el péptido de la secuencia de CTP tiene una longitud de 28, 29, 30, 31, 32, 33 ó 34 aminoácidos y comienza en la posición 112, 113, 114, 115, 116, 117 ó 118 de la secuencia de aminoácidos de CTP.
- 10 En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que se diferencia del CTP nativo por 1-5 sustituciones conservativas de aminoácidos como se describe en Pat. U.S. No. 5.712.122. En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que se diferencia del CTP nativo por 1 sustitución conservativa de aminoácidos. En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que se diferencia del CTP nativo por 2 ó 3 ó 4 ó 5 sustituciones conservativas de aminoácidos. En otra realización, la secuencia de aminoácidos del péptido CTP de la presente invención es al menos 70% homóloga o al menos 80% homóloga o al menos 90% homóloga o al menos 95% homóloga a la secuencia de aminoácidos del CTP nativo o un péptido de éste.
- 15 En otra realización, la secuencia de ADN del péptido CTP de la presente invención es al menos 70% homóloga a la secuencia de ADN del CTP humano nativo o un péptido de éste. En otra realización, la secuencia de ADN del péptido CTP de la presente invención es al menos 80% homóloga o al menos 90% homóloga o al menos 95% homóloga a la secuencia de ADN del CTP nativo o un péptido de éste.
- 20 En una realización, al menos una de las secuencias de aminoácidos de CTP de la gonadotropina coriónica está truncada. En otra realización, 2 de las secuencias de aminoácidos de CTP de la gonadotropina coriónica están truncadas. En otra realización, 2 o más de las secuencias de aminoácidos de CTP de la gonadotropina coriónica están truncadas. En otra realización, todas las secuencias de aminoácidos de CTP de la gonadotropina coriónica están truncadas. En esta invención, el CTP truncado comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 3 comprende la secuencia de aminoácidos (AA) siguiente: SSSSKAPPPSLP.
- 25 En esta invención, el CTP truncado comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 4 comprende la secuencia de aminoácidos (AA) siguiente: SSSSKAPPPSLPSPRLPGSDTPLPQ.
- 30 En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 11 aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 12 aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 13 aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En otra realización, el CTP truncado comprende los primeros 14 aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
- 35 En una realización, al menos una de las secuencias de CTP de la gonadotropina coriónica está glicosilada. En otra realización, 2 de las secuencias de aminoácidos de CTP de la gonadotropina coriónica están glicosiladas. En otra realización, 2 o más de las secuencias de aminoácidos de CTP de la gonadotropina coriónica están glicosiladas. En otra realización, todas las secuencias de aminoácidos de CTP de la gonadotropina coriónica están glicosiladas. En una realización, la secuencia de CTP de la presente invención comprende al menos un sitio de glicosilación. En otras realizaciones, la secuencia de CTP de la presente invención comprende 2 ó 3 ó 4 sitios de glicosilación.
- 40 En algunas realizaciones, la modificación de las secuencias de CTP es ventajosa ya que permite el uso de dosis menores. En algunas realizaciones, la modificación de las secuencias de CTP es ventajosa ya que permite el uso de menos dosis. En algunas realizaciones, la modificación de las secuencias de CTP es ventajosa ya que permite un efecto de acción prolongada seguro.
- 45 En algunas realizaciones, "polipéptido", "factor de coagulación preparado por ingeniería", o "proteína" tal y como se usa en la presente memoria engloba polipéptidos nativos (bien productos de degradación, polipéptidos sintetizados sintéticamente o polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, polipéptidos sintetizados sintéticamente), así como peptoides y semipeptoides que son análogos de polipéptidos, que tienen, en algunas realizaciones, modificaciones que convierten a los polipéptidos que comprenden un factor de coagulación en incluso más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar en las células.
- 50 En algunas realizaciones, las modificaciones incluyen, pero están limitadas a, modificación del extremo C, modificación del enlace polipeptídico, incluyendo, pero no limitado a, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones de la parte central, y modificación de residuos. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos son muy conocidos en la técnica y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). Los detalles adicionales a este respecto se proporcionan más adelante en la presente memoria.
- 55 En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos (-CO-NH-) en el polipéptido están sustituidos. En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos por enlaces N-metilados (-N(CH₃)-CO-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos por enlaces éster (-C(R)H-C-O-C(R)-N-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos por enlaces cetometileno (-CO-CH₂-). En algunas

- realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos por enlaces α -aza (-NH-N(R)-CO-), en el que R es cualquier alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba (-CH₂-NH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos por enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos por enlaces tioamida (-CS-NH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos por enlaces dobles olefínicos (-CH=CH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos por enlaces retro amida (-NH-CO-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos por derivados polipeptídicos (-N(R)-CH₂-CO-), en el que R es la cadena lateral "normal", presentada de forma natural en el átomo de carbono. En algunas realizaciones, estas modificaciones ocurren en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena polipeptídica e incluso en varios (2-3 enlaces) al mismo tiempo.
- 5 En algunas realizaciones, los aminoácidos aromáticos naturales del polipéptido tales como Trp, Tyr y Phe, están sustituidos por ácido no natural sintético tal como fenilglicina, TIC, naftilelanina (Nol), derivados con el anillo metilado de Phe, derivados halogenados de Phe o o-metil-Tyr. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención incluyen uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros distintos de aminoácidos (por ejemplo, ácido graso, carbohidratos complejos etc).
- 10 En una realización, "aminoácido" o "secuencia de aminoácidos" se entiende que incluye los 20 aminoácidos naturales; aquellos aminoácidos modificados frecuentemente después de la traducción *in vivo*, incluyendo, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos no habituales incluyendo, pero no limitado a, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. En una realización, "aminoácido" incluye tanto D- como L-aminoácido.
- 15 En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención se utilizan como terapéuticos lo que requiere que los polipéptidos que comprenden un factor de coagulación estén en una forma soluble. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención incluyen uno o más aminoácidos polares no naturales o naturales, incluyendo pero no limitado, a serina y treonina que son capaces de incrementar la solubilidad del polipéptido debido a su cadena lateral que contiene hidroxilo.
- 20 En algunas realizaciones, el factor de coagulación preparado por ingeniería de la presente invención se utiliza en una forma lineal, aunque un experto en la técnica apreciará que en los casos en los que la ciclación no interfiere de forma importante con las características de los factores de coagulación preparados por ingeniería, también pueden utilizarse las formas cíclicas de los factores de coagulación preparados por ingeniería.
- 25 En algunas realizaciones, los factores de coagulación preparados por ingeniería de la presente invención se sintetizan bioquímicamente tal como usando técnicas de fase sólida estándar. En algunas realizaciones, estos métodos bioquímicos incluyen síntesis en fase sólida exclusiva, síntesis en fase sólida parcial, condensación de fragmentos, o síntesis en disolución clásica.
- 30 En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteína recombinante para generar los factores de coagulación preparados por ingeniería de la presente invención. En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteína recombinante para la generación de polipéptidos relativamente largos (por ejemplo, mayores de 18-25 aminoácidos). En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteína recombinante para la generación de grandes cantidades de los factores de coagulación preparados por ingeniería de la presente invención. En algunas realizaciones, las técnicas recombinantes se describen por Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 y Brogli et al., (1984) *Science* 224:838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 y Weissbach y Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, p 421-463.
- 35 En otra realización, la invención proporciona una molécula de polinucleótido que comprende una parte codificadora que codifica un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa, o que codifica un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y tres CTP de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX, en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (es decir, la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS).
- 40 En otra realización, la invención proporciona un vector de expresión que comprende una molécula de polinucleótido como se describe en la presente memoria. En otra realización, la invención proporciona una célula que comprende el vector de expresión como se describe en la presente memoria. En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende el vector de expresión como se describe en la presente memoria. En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende la célula como se describe en la presente memoria. En otra realización, la célula es una célula eucariota. En otra realización, la célula es una célula procariota.
- 45 En otra realización, los factores de coagulación preparados por ingeniería de la presente invención se sintetizan usando una molécula de polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. En algunas realizaciones, la molécula de polinucleótido que codifica los factores de coagulación preparados por ingeniería de la
- 50
- 55

presente invención se liga en un vector de expresión, que comprende un control transcripcional de una secuencia reguladora en cis (por ejemplo, secuencia promotora). En algunas realizaciones, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión constitutiva de los factores de coagulación preparados por ingeniería de la presente invención. En algunas realizaciones, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión específica de tejido de los factores de coagulación preparados por ingeniería de la presente invención. En algunas realizaciones, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión inducible de los factores de coagulación preparados por ingeniería de la presente invención.

En algunas realizaciones, los promotores específicos de tejido adecuados para uso con la presente invención incluyen secuencias que son funcionales en una población de células específica; los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, promotores tales como albúmina que es específico del hígado [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], promotores específicos linfoides [Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]; en particular promotores de receptores de células T [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji et al. (1983) Cell 33729-740], promotores específicos de neuronas tales como el promotor del neurofilamento [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477], promotores específicos del páncreas [Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916] o promotores específicos de glándulas mamarias tales como el promotor del suero de leche (Pat. U.S. No. 4.873.316 y Publicación de Solicitud Europea No. 264.166). Los promotores inducibles adecuados para uso con la presente invención incluyen, por ejemplo, el promotor inducible con tetraciclina (Srouf, M.A., et al., 2003. Thromb. Haemost. 90: 398-405).

En una realización, la expresión "una molécula de polinucleótido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico mono o bicatenaria que se aísla y proporciona en la forma de una secuencia de ARN, una secuencia de polinucleótido complementaria (ADNc), una secuencia de polinucleótido genómica y/o secuencias de polinucleótidos compuestas (por ejemplo, una combinación de las anteriores).

En una realización, "secuencia de polinucleótido complementaria" se refiere a una secuencia, que resulta de transcripción inversa de ARN mensajero usando una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. En una realización, la secuencia puede amplificarse posteriormente *in-vivo* o *in-vitro* usando una ADN polimerasa.

En una realización, "secuencia de polinucleótido genómica" se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y así representa una parte contigua de un cromosoma.

En una realización, "secuencia de polinucleótido compuesta" se refiere a una secuencia, que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. En una realización, una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exonales requeridas para codificar el polipéptido de la presente invención, así como algunas secuencias intrónicas que interpuestas entre ellas. En una realización, las secuencias intrónicas pueden ser de cualquier fuente, incluyendo de otros genes, y típicamente incluirán secuencias señal de corte y empalme conservadas. En una realización, las secuencias intrónicas incluyen elementos reguladores de la expresión que actúan en cis.

En una realización, después de la expresión y secreción, los péptidos señal se escinden de los factores de coagulación preparados por ingeniería precursores resultando en los factores de coagulación preparados por ingeniería maduros.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la presente invención se preparan usando técnicas de PCR, o cualquier otro método o procedimiento conocido para un experto en la técnica. En algunas realizaciones, el procedimiento implica la ligación de dos secuencias de ADN diferentes (Véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

En una realización, los polinucleótidos de la presente invención que codifican los factores de coagulación preparados por ingeniería se insertan en vectores de expresión (es decir, una construcción de ácido nucleico) para permitir la expresión del polipéptido recombinante. En una realización, el vector de expresión de la presente invención incluye secuencias adicionales que convierten a este vector en adecuado para replicación e integración en procariontes. En una realización, el vector de expresión de la presente invención incluye secuencias adicionales que convierten a este vector en adecuado para replicación e integración en eucariotas. En una realización, el vector de expresión de la presente invención incluye un vector lanzadera que convierte a este vector en adecuado para replicación e integración tanto en procariontes como eucariotas. En algunas realizaciones, los vectores de clonación comprenden secuencias de inicio de la transcripción y traducción (por ejemplo, promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación).

En una realización, puede usarse una variedad de células procariontes o eucariotas como sistemas de expresión en huésped para expresar los factores de coagulación de la presente invención. En algunas realizaciones, éstos incluyen, pero no están limitados a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con un vector de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN de cósmido que contiene la secuencia codificadora del polipéptido; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen la secuencia codificadora del polipéptido; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de

expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformada con vectores de expresión plasmídicos recombinantes, tales como un plásmido Ti, que contiene la secuencia codificadora del polipéptido.

5 En algunas realizaciones, se usan sistemas de expresión no bacterianos (por ejemplo, sistemas de expresión de mamíferos tales como células CHO) para expresar los factores de coagulación de la presente invención. En una realización, el vector de expresión usado para expresar polinucleótidos de la presente invención en células de mamífero es el vector pCI-DHFR que comprende un promotor CMV y un gen de resistencia a neomicina. La construcción del vector pCI-dhfr se describe, según una realización, en el Ejemplo 1.

10 En algunas realizaciones, en sistemas bacterianos, puede seleccionarse ventajosamente una serie de vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el polipéptido expresado. En una realización, se desean grandes cantidades de polipéptido. En una realización, se desean vectores que dirigen la expresión de altos niveles del producto proteico, posiblemente como una fusión con una secuencia señal hidrofóbica, que dirige el producto expresado en el periplasma de las bacterias o el medio de cultivo en el que el producto proteico se purifica fácilmente. En una realización, se prepara por ingeniería una determinada proteína de fusión con un sitio de escisión específico para ayudar en la recuperación el polipéptido. En una realización, los vectores adaptables a dicha manipulación incluyen, pero no están limitados a, la serie pET de vectores de expresión de *E. coli* [Studier et al., Methods in Enzymol. 185:60-89 (1990)].

20 En una realización, se usan sistemas de expresión en levaduras. En una realización, puede usarse una variedad de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles en levaduras como se describe en Solicitud de Pat. U.S. No: 5.932.447. En otra realización, se usan vectores que estimulan la integración de secuencias de ADN extrañas en el cromosoma de levaduras.

25 En una realización, el vector de expresión de la presente invención puede incluir además secuencias de polinucleótido adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de varias proteínas a partir de un único ARNm tal como un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) y secuencias para la integración genómica del promotor-polipéptido quimérico.

30 En algunas realizaciones, los vectores de expresión de mamíferos incluyen, pero no están limitados a, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que están disponibles en Invitrogen, pCI que está disponible en Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles en Strategene, pTRES que está disponible en Clontech, y sus derivados.

35 En algunas realizaciones, los vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas tales como retrovirus se usan por la presente invención. Los vectores de SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. En algunas realizaciones, los vectores derivados del virus de papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus de Epstein Bar incluyen pHEBO, y p205. Otros vectores ejemplares incluyen pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, y cualquier otro vector que permite la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV-40, promotor tardío de SV-40, promotor de metalotioneína, promotor del virus de tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina, u otros promotores que se muestran efectivos para la expresión en células eucariotas.

40 En algunas realizaciones, los vectores virales recombinantes son útiles para la expresión *in-vivo* de los factores de coagulación de la presente invención ya que ofrecen ventajas tales como infección lateral y especificidad de direccionamiento. En una realización, la infección lateral es inherente en el ciclo vital de, por ejemplo, retrovirus y es el proceso mediante el cual una única célula infectada produce muchos viriones de progeñe que se liberan e infectan células vecinas. En una realización, el resultado es que una gran área se infecta rápidamente, la mayor parte de la cual no estaba infectada inicialmente por las partículas virales originales. En una realización, se producen
45 vectores virales que son incapaces de diseminarse lateralmente. En una realización, esta característica puede ser útil si el propósito deseado es introducir un gen especificado sólo en un número localizado de células diana.

50 En una realización, pueden usarse varios métodos para introducir el vector de expresión de la presente invención en células. Dichos métodos se describen generalmente en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, véase Pat. U.S. Nos. 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positiva-negativa.

55 En algunas realizaciones, la introducción de ácido nucleico por infección viral ofrece varias ventajas sobre otros métodos tales como lipofección y electroporación, ya que puede obtenerse una mayor eficiencia en la transfección debido a la naturaleza infecciosa de los virus.

- Se apreciará que los factores de coagulación preparados por ingeniería de la presente invención también pueden expresarse a partir de una construcción de ácido nucleico que se ha administrado a un individuo empleando cualquier modo adecuado de administración, descrito anteriormente en la presente memoria (es decir, terapia génica in-vivo). En una realización, la construcción de ácido nucleico se introduce en una célula adecuada mediante un vehículo/método de administración de genes apropiado (transfección, transducción, recombinación homóloga, etc.) y un sistema de expresión según se necesite y después las células modificadas se expanden en cultivo y se devuelven al individuo (es decir, terapia génica ex-vivo).
- En una realización, se usan vectores de expresión de plantas. En una realización, la expresión de una secuencia codificadora del polipéptido está dirigida por varios promotores. En algunas realizaciones, se usan los promotores virales tales como los promotores 35S ARN y 19S ARN de CaMV [Brisson et al., *Nature* 310:511-514 (1984)], o el promotor de la proteína de cubierta de TMV [Takamatsu et al., *EMBO J.* 6:307-311 (1987)]. En otra realización, se usan promotores de plantas tales como, por ejemplo, la subunidad pequeña de RUBISCO [Coruzzi et al., *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984); y Brogli et al., *Science* 224:838-843 (1984)] o promotores de choque térmico, por ejemplo, hsp17.5-E o hsp17.3-B de soja [Gurley et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 (1986)]. En una realización, se introducen construcciones en células de planta usando el plásmido Ti, plásmido Ri, vectores virales de plantas, transformación directa con ADN, microinyección, electroporación y otras técnicas muy conocidas para el experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Weissbach y Weissbach [*Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, p 421-463 (1988)]. También pueden usarse otros sistemas de expresión tales como sistemas de células huésped de insecto y mamífero, que son muy conocidos en la técnica.
- Se apreciará que además de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificadora insertada (que codifica el polipéptido), la construcción de expresión de la presente invención también puede incluir secuencias preparadas por ingeniería para optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o actividad del polipéptido expresado.
- Pueden usarse varios métodos, en algunas realizaciones, para introducir el vector de expresión de la presente invención en el sistema de célula huésped. En algunas realizaciones, dichos métodos se describen generalmente en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, véase Pat. U.S. Nos. 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positiva-negativa.
- En algunas realizaciones, las células transformadas se cultivan bajo condiciones efectivas, que permiten la expresión de altas cantidades de factores de coagulación preparados por ingeniería recombinantes. En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo efectivas incluyen, pero no están limitadas a, medios efectivos, biorreactor, condiciones de temperatura, pH y oxígeno que permiten la producción de proteína. En una realización, un medio efectivo se refiere a cualquier medio en el que una célula se cultiva para producir el polipéptido recombinante de la presente invención. En algunas realizaciones, un medio incluye típicamente una disolución acuosa que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas. En algunas realizaciones, las células de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces agitadores, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas petri. En algunas realizaciones, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto en la técnica.
- En algunas realizaciones, dependiendo del sistema de vector y huésped usado para la producción, los factores de coagulación preparados por ingeniería resultantes de la presente invención permanecen bien en la célula recombinante, se secretan en el medio de fermentación, se secretan en un espacio entre dos membranas celulares, tales como el espacio periplásmico en *E. coli*; o se retienen en la superficie externa de una membrana celular o viral.
- En una realización, después de un tiempo predeterminado en cultivo, se efectúa la recuperación del factor de coagulación recombinante preparado por ingeniería.
- En una realización, la expresión "recuperación del factor de coagulación recombinante preparado por ingeniería" usada en la presente memoria se refiere a la recogida del medio de fermentación completo que contiene el polipéptido y no implica necesariamente etapas adicionales de separación o purificación.
- En una realización, los factores de coagulación preparados por ingeniería de la presente invención se purifican usando una variedad de técnicas de purificación de proteínas estándar, tales como, pero no limitado a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de concanavalina A, cromatografía de solubilización diferencial.

- En una realización, para facilitar la recuperación, la secuencia codificadora expresada puede prepararse por ingeniería para codificar el factor de coagulación preparado por ingeniería de la presente invención y fusionarse con un resto escindible. En una realización, puede diseñarse una proteína de fusión de manera que el polipéptido pueda aislarse fácilmente por cromatografía de afinidad; por ejemplo, por inmovilización en una columna específica para el resto escindible. En una realización, se prepara por ingeniería un sitio de escisión entre el factor de coagulación preparado por ingeniería y el resto escindible y el polipéptido puede liberarse de la columna cromatográfica por tratamiento con una enzima o agente apropiado que escinde específicamente la proteína de fusión en ese sitio [por ejemplo, véase, Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); y Gardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)].
- 5 En una realización, el factor de coagulación preparado por ingeniería de la presente invención se recupera en forma "sustancialmente pura".
- En una realización, la expresión "sustancialmente pura" se refiere a una pureza que permite el uso efectivo de la proteína en las aplicaciones descritas en la presente memoria.
- 15 En una realización, el factor de coagulación preparado por ingeniería de la presente invención también puede sintetizarse usando sistemas de expresión *in-vitro*. En una realización, los métodos de síntesis *in-vitro* son muy conocidos en la técnica y los componentes del sistema están disponibles comercialmente.
- En algunas realizaciones, los factores de coagulación recombinantes preparados por ingeniería se sintetizan y purifican; su eficacia terapéutica puede ensayarse bien *in-vivo* o *in vitro*. En una realización, las actividades de unión de los factores de coagulación recombinantes preparados por ingeniería de la presente invención pueden averiguarse usando varios ensayos como conoce un experto en la técnica.
- 20 En otra realización, el factor de coagulación preparado por ingeniería de la presente invención puede proporcionarse al individuo *per se*. En una realización, el factor de coagulación preparado por ingeniería de la presente invención puede proporcionarse al individuo como parte de una composición farmacéutica en la que se mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 En otra realización, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.
- En otra realización, "ingrediente activo" se refiere a la secuencia de polipéptido de interés, que es responsable del efecto biológico.
- 30 En una realización, la presente invención proporciona preparaciones combinadas. En una realización, "una preparación combinada" define especialmente un "kit de partes" en el sentido de que los compañeros de la combinación como se han definido anteriormente pueden dosificarse independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades distinguidas de los compañeros de la combinación, es decir, simultáneamente, concurrentemente, separadamente o secuencialmente. En algunas realizaciones, las partes del kit de partes pueden entonces, por ejemplo, administrarse de forma simultánea o escalonada cronológicamente, que es en diferentes puntos temporales y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes. La relación de las cantidades totales de los compañeros de combinación, en algunas realizaciones, puede administrarse en la preparación combinada. En una realización, la preparación combinada puede variarse, por ejemplo, con el fin de hacer frente a las necesidades de una subpoblación de pacientes a tratar o las necesidades del paciente individual cuyas necesidades diferentes pueden deberse a una enfermedad particular, gravedad de una enfermedad, edad, sexo o peso corporal como puede hacerse fácilmente por un experto en la técnica.
- 35 En otra realización, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que pueden usarse indistintamente se refieren a un vehículo o un diluyente que no causa una irritación significativa a un organismo y que no suprime la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. Un adyuvante está incluido en estas expresiones. En una realización, uno de los ingredientes incluidos en el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, polietilén glicol (PEG), un polímero biocompatible con un rango amplio de solubilidad tanto en medios orgánicos como acuosos (Mutter et al. (1979)).
- 40 En otra realización, "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. En una realización, los excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilén glicoles.
- 45 Las técnicas para la formulación y administración de fármacos se encuentran en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.
- 50 En otra realización, las rutas de administración adecuadas, por ejemplo, incluyen administración oral, rectal, transmucosal, transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e
- 55

intramedulares así como inyecciones intratecales, intraventricular directa, intravenosas, intraperitoneales, intranasales, o intraoculares.

En otra realización, la preparación es para administrarse de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la preparación directamente en una región específica del cuerpo de un paciente.

- 5 Varias realizaciones de intervalos de dosificación se contemplan por esta invención. La dosificación del factor de coagulación preparado por ingeniería de la presente invención, en una realización, está en el intervalo de 0,005-100 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,005-5 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,01-50 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,1-20 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,1-10 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,01-5 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,001-0,01 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,001-0,1 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,1-5 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,5-50 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,2-15 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,8-65 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 1-50 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 5-10 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 8-15 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 10-20 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 20-40 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 60-120 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 12-40 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 40-60 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 50-100 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 1-60 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 15-25 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 5-10 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 55-65 mg/día.

- En otra realización, un polipéptido que comprende un factor de coagulación y al menos una unidad de CTP de la invención se formula en una forma de dosificación intranasal. En otra realización, un polipéptido que comprende un factor de coagulación y al menos una unidad de CTP de la invención se formula en una forma de dosificación inyectable. En otra realización, un polipéptido que comprende un factor de coagulación y al menos una unidad de CTP de la invención es para administrarse a un sujeto en una dosis que varía de 0,0001 mg a 0,6 mg, o en una dosis que varía de 0,001 mg a 0,005 mg, o en una dosis que varía de 0,005 mg a 0,01 mg, o en una dosis que varía de 0,01 mg a 0,3 mg, o en una dosis que varía de 0,2 mg a 0,6 mg.

- 30 En otra realización, un polipéptido que comprende un factor de coagulación y al menos una unidad de CTP de la invención es para administrarse a un sujeto en una dosis que varía de 1-100 microgramos, o en una dosis que varía de 10-80 microgramos, o en una dosis que varía de 20-60 microgramos, o en una dosis que varía de 10-50 microgramos, o en una dosis que varía de 40-80 microgramos, o en una dosis que varía de 10-30 microgramos, o en una dosis que varía de 30-60 microgramos.

- 35 En otra realización, un polipéptido que comprende un factor de coagulación y al menos una unidad de CTP de la invención es para administrarse a un sujeto en una dosis que varía de 0,2 mg a 2 mg, o en una dosis que varía de 2 mg a 6 mg, o en una dosis que varía de 4 mg a 10 mg, o en una dosis que varía de 5 mg y 15 mg.

- 40 En otra realización, un polipéptido que comprende un factor de coagulación y al menos una unidad de CTP de la invención es para inyectarse en el músculo (inyección intramuscular). En otra realización, un polipéptido que comprende un factor de coagulación y al menos una unidad de CTP de la invención es para inyectarse debajo de la piel (inyección subcutánea).

Como se describe en la presente memoria, el uso de las composiciones de la invención incrementa el cumplimiento en el uso de la terapia con factores de coagulación.

- 45 También como se describe en la presente memoria, el uso de las composiciones de la invención incrementa el cumplimiento de pacientes que padecen enfermedades crónicas que necesitan terapia con factores de coagulación. Como se describe en la presente memoria, la invención permite la reducción de la frecuencia de dosificación de un factor de coagulación mediante la modificación del factor de coagulación con CTP como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. En otra realización, el término cumplimiento comprende adherencia. En otra realización, el uso de las composiciones de la invención incrementa el cumplimiento de pacientes que necesitan una terapia con factores de coagulación mediante la reducción de la frecuencia de administración del factor de coagulación. En otra realización, la reducción de la frecuencia de administración del factor de coagulación se consigue debido a las modificaciones con CTP que hacen que el factor de coagulación modificado con CTP sea más estable. En otra realización, la reducción de la frecuencia de administración del factor de coagulación se consigue como resultado del incremento del T1/2 del factor de coagulación. En otra realización, la reducción de la frecuencia de administración del factor de coagulación se consigue como resultado del incremento del tiempo de aclaramiento del factor de coagulación. En otra realización, la reducción de la frecuencia de administración del factor de coagulación se consigue como resultado del incremento de la medida de AUC del factor de coagulación.

También se describe en la presente memoria un método para reducir una frecuencia de dosificación de un factor de coagulación, mediante la unión de CTP al extremo carboxi del factor de coagulación

5 En otra realización, un polipéptido que comprende un factor de coagulación y al menos una unidad de CTP de la invención es para administrarse a un sujeto una vez al día, o una vez cada dos días, o una vez cada tres días, o una vez cada cuatro días, o una vez cada cinco días, o una vez cada seis días, o una vez a la semana, o una vez cada 7-14 días, o una vez cada 10-20 días, o una vez cada 5-15 días, o una vez cada 15-30 días.

10 En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 50-500 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 50-150 mg/día, o en un intervalo de 100-200 mg/día, o en un intervalo de 150-250 mg/día, o en un intervalo de 200-300 mg/día, o en un intervalo de 250-400 mg/día, o en un intervalo de 300-500 mg/día, o en un intervalo de 350-500 mg/día.

15 En una realización, la dosificación es 20 mg/día. En otras realizaciones, la dosificación es 30 mg/día, 40 mg/día, ó 50 mg/día. En otras realizaciones, la dosificación es 0,01 mg/día, ó 0,1 mg/día, ó 1 mg/día. En otra realización, la dosificación es 0,530 mg/día. En otra realización, la dosificación es 0,05 mg/día. En otra realización, la dosificación es 50 mg/día. En otra realización, la dosificación es 10 mg/día. En otra realización, la dosificación es 20-70 mg/día. En otra realización, la dosificación es 5 mg/día.

En otra realización, la dosificación es 1-90 mg/día. En otra realización, la dosificación es 1-90 mg/2 días, ó 1-90 mg/3 días, ó 1-90 mg/4 días, ó 1-90 mg/5 días, ó 1-90 mg/6 días, ó 1-90 mg/semana. En otra realización, la dosificación es 1-90 mg/9 días, ó 1-90 mg/11 días, ó 1-90 mg/14 días.

20 En otra realización, la dosificación del factor de coagulación es 10-50 mg/día, ó r 10-50 mg/2 días, ó 10-50 mg/3 días, ó 10-50 mg/4 días, ó 10-50 microgramos mg/5 días, ó 10-50 mg/6 días, ó 10-50 mg/semana. En otra realización, la dosificación es 10-50 mg/9 días, ó 10-50 mg/11 días, o es 10-50 mg/14 días.

25 La administración oral, en una realización, comprende una forma de dosificación unitaria que comprende comprimidos, cápsulas, pastillas, comprimidos masticables, suspensiones, emulsiones y semejantes. Dichas formas de dosificación unitaria comprenden una cantidad segura y efectiva del factor de coagulación de la invención deseado, cada una de los cuales es, en una realización, de aproximadamente 0,7 ó 3,5 mg a aproximadamente 280 mg/70 kg, o en otra realización, aproximadamente 0,5 ó 10 mg a aproximadamente 210 mg/70 kg. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de formas de dosificación unitaria para la administración peroral son muy conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los comprimidos comprenden típicamente los adyuvantes farmacéuticamente compatibles convencionales como diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, manitol, lactosa y celulosa; aglutinantes tales como almidón, gelatina y sacarosa; disgregantes tales como almidón, ácido algínico y croscarmelosa; lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. En una realización, pueden usarse deslizantes tales como dióxido de silicio para mejorar las características de flujo de la mezcla en polvo. En una realización, pueden añadirse agentes colorantes, tales como los tintes FD&C, para el aspecto. Los edulcorantes y agentes saporíferos, tales como aspartamo, sacarina, mentol, menta y aromas de fruta, son adyuvantes útiles para comprimidos masticables. Las cápsulas comprenden típicamente uno o más diluyentes sólidos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, la selección de componentes vehiculares depende de consideraciones secundarias como sabor, coste y estabilidad de almacenaje, que no son críticas para los propósitos de esta invención, y puede hacerse fácilmente por un experto en la técnica.

40 En una realización, la forma de dosificación oral comprende un perfil de liberación predefinido. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, pastillas o comprimidos masticables de liberación prolongada. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, pastillas o comprimidos masticables de liberación lenta. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, pastillas o comprimidos masticables de liberación inmediata. En una realización, la forma de dosificación oral se formula según el perfil de liberación deseado del ingrediente farmacéutico activo como conoce un experto en la técnica.

50 Las composiciones perorales, en algunas realizaciones, comprenden disoluciones, emulsiones, suspensiones líquidas, y semejantes. En algunas realizaciones, los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de dichas composiciones son muy conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las composiciones orales líquidas comprenden de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,933% del compuesto o compuestos deseados, o en otra realización, de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 10%.

55 En algunas realizaciones, las composiciones para uso en la invención comprenden disoluciones o emulsiones, que en algunas realizaciones son disoluciones o emulsiones acuosas que comprenden una cantidad segura y efectiva de los compuestos de la presente invención y opcionalmente, otros compuestos, previstos para administración intranasal tópica. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10,0% p/v de un compuesto objeto, más preferiblemente de aproximadamente 00,1% a aproximadamente 2,0, que se usa para la administración sistémica de los compuestos por la ruta intranasal.

- 5 En otra realización, las composiciones farmacéuticas son para administrarse por inyección intravenosa, intra-arterial o intramuscular de una preparación líquida. En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas incluyen disoluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y semejantes. En una realización, las composiciones farmacéuticas se administran de forma intravenosa, y se formulan así en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra realización, las composiciones farmacéuticas son para administrarse de forma intra-arterial, y se formulan así en una forma adecuada para la administración intra-arterial. En otra realización, las composiciones farmacéuticas son para administrarse de forma intramuscular, y se formulan así en una forma adecuada para la administración intramuscular.
- 10 Además, en otra realización, las composiciones farmacéuticas son para administrarse de forma tópica a las superficies corporales, y se formulan así en una forma adecuada para la administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, pomadas, cremas, lociones, gotas y semejantes. Para la administración tópica, los compuestos de la presente invención se combinan con un agente o agentes terapéuticos apropiados adicionales, se preparan y aplican como disoluciones, suspensiones, o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un vehículo farmacéutico.
- 15 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se fabrican por procesos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapado o liofilización.
- 20 En una realización, las composiciones farmacéuticas para uso según la presente invención se formulan de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprendan excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. En una realización, la formulación depende de la ruta de administración elegida.
- 25 En una realización, los inyectables de la invención se formulan en disoluciones acuosas. En una realización, los inyectables de la invención se formulan en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer, o tampón salino fisiológico. En algunas realizaciones, para la administración transmucosal, en la formulación se usan agentes penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes son en general conocidos en la técnica.
- 30 En una realización, las preparaciones descritas en la presente memoria se formulan para administración parenteral, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. En algunas realizaciones, las formulaciones para inyección se presentan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en contenedores multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. En algunas realizaciones, las composiciones son suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.
- 35 Las composiciones también comprenden, en algunas realizaciones, conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal y semejantes; agentes quelantes, tal como edetato sódico y otros; tampones tales como fosfato, citrato y acetato; agentes de tonicidad tal como cloruro sódico, cloruro de potasio, glicerina, manitol y otros; antioxidantes tales como ácido ascórbico, acetilcistina, metabisulfato sódico y otros; agentes aromáticos; ajustadores de viscosidad, tales como polímeros, que incluyen celulosa y derivados de ésta; y polivinil alcohol y ácidos y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas según se necesite. Las composiciones también comprenden, en algunas realizaciones, anestésicos locales u otros activos. Las composiciones pueden usarse como pulverizaciones, nebulizaciones, gotas y semejantes.
- 40 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, se preparan suspensiones de los ingredientes activos, en algunas realizaciones, como suspensiones de inyección basadas en aceite o agua apropiadas. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen, en algunas realizaciones, aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas contienen, en algunas realizaciones, sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol o dextrano. En otra realización, la suspensión también contiene estabilizantes o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.
- 45 En otra realización, el compuesto activo puede ser administrado en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); López-Berestein, *ibid.*, págs. 317-327; véase generalmente *ibid.*).
- 50 En otra realización, la composición farmacéutica administrada en un sistema de liberación controlada se formula para infusión intravenosa, bomba osmótica implantable, parche transdérmico, liposomas, u otros modos de administración. En una realización, se usa una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otra realización pueden usarse materiales poliméricos. En aún otra realización, un sistema de liberación controlada
- 55

puede colocarse en la proximidad de la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriéndose de este modo sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, págs. 115-138 (1984). Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

- 5 En algunas realizaciones, el ingrediente activo está en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, disolución basada en agua estéril, sin pirógenos, antes del uso. Las composiciones se formulan, en algunas realizaciones, para administración por atomización e inhalación. En otra realización, las composiciones están contenidas en un contenedor con medios de atomización unidos.

- 10 En una realización, la preparación de la presente invención se formula en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

- 15 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para conseguir el propósito pretendido. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad de ingredientes activos efectiva para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

- 20 Algunos ejemplos de sustancias que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables o componentes de los mismos son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa sódica, etil celulosa y metil celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; lubricantes sólidos, tales como ácido esteárico y estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de theobroma; polioles tales como propilen glicol, glicerina, sorbitol, manitol y polietilen glicol; ácido algínico; emulsionantes, tal como los emulsionantes de marca Tween™; agentes humectantes, como lauril sulfato sódico; agentes colorantes; agentes saporíferos; agentes de formación de comprimidos, estabilizadores; antioxidantes; conservantes; agua sin pirógenos; disolución salina isotónica; y disoluciones de tampón fosfato. La elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar junto con el compuesto se determina básicamente por la forma en que el compuesto se va a administrar. Si el compuesto objeto se va a inyectar, en una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es disolución salina fisiológica, estéril, con un agente de suspensión compatible con la sangre, cuyo pH se ha ajustado a aproximadamente 7,4.

- 35 Además, las composiciones pueden comprender adicionalmente aglutinantes (por ejemplo, goma arábica, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etil celulosa, goma guar, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, povidona), agentes disgregantes (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma guar, glicolato de almidón sódico), tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato) de varios pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción a superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), inhibidores de proteasa, tensioactivos (por ejemplo, lauril sulfato sódico), mejoradores de permeación, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilen glicerol), anti-oxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico, hidroxianisol butilado), estabilizadores (por ejemplo, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa), agentes aumentadores de la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etil celulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo, aspartamo, ácido cítrico), conservantes (por ejemplo, Timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilen glicol, lauril sulfato sódico), auxiliares de flujo (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificadores (por ejemplo, ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (por ejemplo, carbómero, hidroxipropil celulosa, lauril sulfato sódico), recubrimientos de polímero (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y formación de películas (por ejemplo, etil celulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

- 50 Los componentes típicos de vehículos para jarabes, elixires, emulsiones y suspensiones incluyen etanol, glicerol, propilen glicol, polietilen glicol, sacarosa líquida, sorbitol y agua. Para una suspensión, los agentes de suspensión típicos incluyen metil celulosa, carboximetil celulosa sódica, celulosa (por ejemplo, Avicel™, RC-591), tragacanto y alginato sódico; los agentes humectantes típicos incluyen lecitina y óxido de polietileno y sorbitán (por ejemplo, polisorbato 80). Los conservantes típicos incluyen metil parabeno y benzoato sódico. En otra realización, las composiciones líquidas perorales también contienen uno o más componentes tales como edulcorantes, agentes saporíferos y colorantes descritos anteriormente.

- 55 Las composiciones también incluyen la incorporación del material activo en o sobre preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocito o esferoplastos). Dichas composiciones influirán en el estado físico, solubilidad, estabilidad, velocidad de liberación *in-vivo*, y velocidad de aclaramiento *in-vivo*.

También están comprendidas por la invención composiciones particuladas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado a anticuerpos dirigidos frente a receptores específicos de un tejido, ligandos o antígenos o acoplados a ligandos de receptores específicos de un tejido.

5 En algunas realizaciones, compuestos modificados por la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilen glicol, copolímeros de polietilen glicol y polipropilén glicol, carboximetil celulosa, dextrano, polivinil alcohol, polivinilpirrolidona o poliprolina. En otra realización, los compuestos modificados presentan vidas medias sustancialmente más largas en sangre después de la inyección intravenosa de lo que lo hacen los compuestos no modificados correspondientes. En una realización, dichas modificaciones también incrementan la solubilidad del compuesto en disolución acuosa, eliminan la agregación, aumentan la estabilidad física y química del compuesto, y reducen en gran medida la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. En otra realización, la actividad biológica *in-vivo* deseada se consigue por la administración de dichos abductos de compuesto-polímero menos frecuentemente o en menores dosis que con el compuesto no modificado.

10 En algunas realizaciones, la preparación de una cantidad o dosis efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in-vitro*. En una realización, una dosis puede formularse en modelos animales y dicha información puede usarse para determinar más exactamente las dosis útiles en los seres humanos.

15 En una realización, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente memoria pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o en animales experimentales. En una realización, los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro* y en cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en los seres humanos. En una realización, las dosificaciones varían dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. En una realización, la formulación, ruta de administración y dosificación exactas pueden elegirse por el médico del individuo a la vista de la afección del paciente. [Véase, por ejemplo, Finigl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 p.1].

20 En una realización, dependiendo de la gravedad y grado de respuesta de la afección que se va a tratar, la dosificación puede ser de una sola o una pluralidad de administraciones, durando el curso del tratamiento desde varios días a varias semanas o hasta que se logre la cura o se consiga la disminución del estado patológico.

25 En una realización, la cantidad de una composición que se va a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección, la manera de administración, el criterio del médico prescriptor, etc.

30 En una realización, también se preparan composiciones que incluyan la preparación de la presente invención formulada en un vehículo farmacéutico compatible, se ponen en un contenedor apropiado y se etiquetan para el tratamiento de una afección indicada.

35 En otra realización, un factor de coagulación como se describe en la presente memoria es para administrarse mediante administración sistémica. En otra realización, un factor de coagulación como se describe en la presente memoria es para administrarse por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea. En otra realización, un factor de coagulación como se describe en la presente memoria es una preparación liofilizada (es decir, se seca por congelación) en combinación con excipientes y estabilizantes orgánicos complejos tales como agentes tensioactivos no iónicos (es decir, tensioactivos), varios azúcares, polioles orgánicos y/o albúmina de suero humano. En otra realización, una composición farmacéutica comprende un factor de coagulación liofilizado como se describe en agua estéril para inyección. En otra realización, una composición farmacéutica comprende un factor de coagulación liofilizado como se describe en PBS estéril para inyección. En otra realización, una composición farmacéutica comprende un factor de coagulación liofilizado como se describe en NaCl al 0,9% estéril para inyección.

40 En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria y vehículos complejos tales como albúmina de suero humano, polioles, azúcares, y agentes estabilizantes tensioactivos aniónicos. Véase, por ejemplo, WO 89/10756 (Hara et al.- que contiene polioliol y p-hidroxibenzoato). En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria y ácido lactobiónico y un tampón acetato/glicina. En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria y aminoácidos, tales como arginina o glutamato que incrementan la solubilidad de composiciones de interferón en agua. En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación liofilizado como se describe en la presente memoria y glicina o albúmina de suero humano (HSA), un tampón (por ejemplo, acetato) y un agente isotónico (por ejemplo, NaCl). En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación liofilizado como se describe en la presente memoria y tampón fosfato, glicina y HSA.

45 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria se estabiliza cuando se pone en disoluciones tamponadoras que tienen un pH entre aproximadamente 4 y 7,2. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria se estabiliza con un aminoácido como un agente estabilizador y, en algunos casos, una sal (si el aminoácido no contiene una cadena lateral cargada).

En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria es una composición líquida que comprende un agente estabilizador a entre aproximadamente 0,3% y 5% en peso que es un aminoácido.

5 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria proporciona exactitud en la dosificación y seguridad del producto. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria proporciona una formulación líquida estable, biológicamente activa, para uso en aplicaciones inyectables. En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación no liofilizado como se describe en la presente memoria.

10 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria proporciona una formulación líquida que permite el almacenamiento durante un largo periodo de tiempo en un estado líquido que facilita el almacenamiento y transporte antes de la administración.

15 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra realización, la composición farmacéutica inyectable que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra realización, la producción de micropartículas lipídicas por solidificación por pulverización fue descrita por Speiser (Speiser et al., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54) seguida de nanogránulos lipídicos para administración peroral (Speiser EP 0167825 (1990)). En otra realización, los lípidos que se usan, son bien tolerados por el cuerpo (por ejemplo, glicéridos compuestos por ácidos grasos que están presentes en las emulsiones para nutrición parenteral).

20 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria está en la forma de liposomas (J. E. Diederichs et al., Pharm./nd. 56 (1994) 267- 275).

25 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria comprende micropartículas poliméricas. En otra realización, la composición farmacéutica inyectable que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria comprende micropartículas poliméricas. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria comprende nanopartículas. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria comprende liposomas. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria comprende emulsión lipídica. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria comprende microesferas. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria comprende nanopartículas lipídicas. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria comprende nanopartículas lipídicas que comprenden lípidos anfifílicos. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente memoria comprende nanopartículas lipídicas que comprenden un fármaco, una matriz de lípidos y un tensioactivo. En otra realización, la matriz de lípidos tiene un contenido en monoglicérido que es al menos 50% p/p.

30 En una realización, las composiciones de la presente invención se presentan en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que contiene una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. En una realización, el envase comprende, por ejemplo, lámina de metal o plástico, tal como un envase en blíster. En una realización, el envase o dispositivo dispensador está acompañado de instrucciones para administración. En una realización, el envase o dispensador está acompañado de un aviso asociado con el contenedor en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, aviso que refleje la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Dicho aviso, en una realización, es una etiqueta aprobada por la U.S. Food and Drug Administration para fármacos de prescripción o de un prospecto de producto aprobado.

35 En una realización, se apreciará que el factor de coagulación de la presente invención puede proporcionarse al individuo con agentes activos adicionales para conseguir un efecto terapéutico mejorado comparado con el tratamiento con cada agente por sí mismo. En otra realización, se toman las medidas (por ejemplo, dosificación y selección del agente complementario) para efectos secundarios adversos que están asociados con terapias de combinación.

Los ejemplos siguientes son sólo para ilustración.

Ejemplos

55 En general, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas están profusamente explicadas en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III, Ausubel, R. M., ed.

(1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías tales como las expuestas en las Pat. U.S. Nos. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III, Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E. ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles están ampliamente descritos en la literatura de patentes y científica, véase, por ejemplo, las Pat. U.S. Nos. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). A lo largo del presente documento se proporcionan otras referencias generales.

20 Ejemplo 1

Generación y utilización del Factor de Coagulación IX

El factor IX (FIX) es una glicoproteína de 415 aminoácidos (55KDa); pertenece a un grupo de glicoproteínas dependientes de la vitamina K asociadas con el sistema de coagulación. FIX tiene una organización de dominios similar al factor FVII, factor X, proteína C y protrombina que se sintetizan como precursores con propéptido N-terminal seguido de una secuencia de aminoácidos madura.

FIX se secreta como una molécula de cadena única que experimenta modificaciones complejas posteriores a la transcripción muchas de las cuales son críticas para sus propiedades bioquímicas y farmacocinéticas. Entre todas las modificaciones posteriores a la transcripción, 12 residuos de ácido glutámico cerca del extremo amino de FIX que se carboxilan en gamma por la carboxilasa gamma dependiente de la vitamina K son los más cruciales. La carboxilación se requiere para la interacción de FIX con las superficies de fosfolípidos y para la actividad óptima de FIX. El propéptido amino terminal sirve como un sitio de reconocimiento para la carboxilasa gamma y así después de la carboxilación en gamma se elimina por escisión por la serina proteasa del aparato de Golgi conocida como enzima de escisión de aminoácidos básicos emparejados (PACE/Furina). Cuatro modificaciones posteriores a la transcripción adicionales ocurren en el aparato de Golgi, sulfatación de tirosina 155, fosforilación de serina 158, O-glicosilación en Ser 63 y en 61 y finalmente N-glicosilación en Asn 157 y 16.

FIX circula en el plasma (concentración promedio de 5µg/ml) como un zimógeno inactivo de cadena única. Después de la escisión proteolítica en dos enlaces peptídicos: Arg 145 y Arg 180 bien por uno o dos activadores fisiológicos complejo FVIIa- TF o FIXa, el péptido de activación se elimina convirtiendo FIX en una enzima completamente activa que consiste en una cadena ligera y pesada mantenidas juntas por un único enlace disulfuro. La cadena ligera N-terminal contiene el ácido carboxiglutámico gamma (Gla) no catalítico y dos dominios semejantes al factor de crecimiento epidérmico mientras la cadena pesada C-terminal contiene el dominio catalítico semejante a tripsina de la molécula. FIXa solo se caracteriza por una pobre actividad catalítica. Sin embargo, cuando forma un complejo con FVIII, su actividad proteolítica se incrementa 4-5 órdenes de magnitud frente a su sustrato natural FX.

La hemofilia B es un trastorno hemorrágico ligado a X causado por una mutación en el gen del Factor IX (FIX), que resulta en una deficiencia de la actividad procoagulante de FIX. Los pacientes con hemofilia B tienen hemorragias espontáneas de tejido blando y hemartrosis recurrentes que frecuentemente dan lugar a artropatía incapacitante. El tratamiento actual para estos pacientes incluye una administración intravenosa de FIX recombinante. Sin embargo, los problemas de coste y aclaramiento relativamente rápido de FIX de la circulación hacen que el desarrollo de FIX de acción prolongada sea una tarea desafiante.

La tecnología de CTP se utilizó para el desarrollo de un FIX de acción prolongada. Específicamente, la prolongación de la vida media de la molécula rFIX recombinante se realizó por fusión de al menos un CTP humano a FIX. El FIX-CTP recombinante se expresó en células de mamífero y se caracterizó in-vitro e in vivo. Se demostró que la actividad in-vitro de rFIX-CTP era comparable a rFIX. Los estudios de farmacocinética y eficacia en ratas demostraron propiedades mejoradas del rFIX-CTP. Los resultados de este estudio demuestran que es factible desarrollar una molécula de rFIX con vida media prolongada que tiene propiedades hemostáticas similares a la enzima de tipo salvaje.

Clonación y expresión de la molécula FIX recombinante: se sembraron en placas células Dg44 en placas de cultivo tisular de 100mm y se crecieron hasta el 50-60% de confluencia. Se usó un total de 2 µg (microgramos) de ADNc de FIX para la transfección de una placa de 100mm usando el reactivo FuGene (Roche) en medio sin

5 proteínas (Invitrogene CD Dg44). El medio se eliminó 48 horas después de la transfección y se reemplazó por un medio sin proteínas (Invitrogene CD Dg44) sin nucleósidos y en presencia de 800 µg/ml de G418 (Neomicina). Después de 14 días, la población de células transfectadas se transfirió a matraces de cultivo tisular T25 y la selección continuó durante 10-14 días adicionales hasta que las células empezaron a crecer como clones estables. Se seleccionaron los clones con alta expresión. Aproximadamente 2×10^7 células se usaron para inocular 300ml de medio de crecimiento en una botella rotatoria de 1.700cm² (Corning, Corning NY) suplementado con 5ng/ml de vitamina K3 (bisulfato sódico de menadiona; Sigma). El medio de producción (recolecta) se recogió después de una disminución rápida en la viabilidad de las células hasta aproximadamente 70%. El medio de producción se aclaró en primer lugar y después de concentró aproximadamente 20 veces y se dializó con PBS usando un casete de filtración de flujo (10KDa MWCO; Millipore Corp.)

Determinación del nivel de antígeno FIX: los niveles de antígeno de las recolectas de FIX-CTP se determinaron usando el kit de ELISA de FIX humano AssayMax (AssayPro- EF1009-1), la concentración de proteína calculada es el promedio de tres diluciones diferentes en dos operaciones independientes (Fig 3A).

Tabla 1: concentración de proteína calculada

	FIX-CTP	FIX-CTP-CTP
Nivel de Ag FIX (µg/ml)	41,9	19,2
SD	8,76	3,67
%CV	20,92	19,15

15 **SDS-PAGE - inmuno transferencia de FIX:** las recolectas de FIX-CTP o rhFIX purificado (American Diagnostics), 100ng de proteína, se cargaron en un gel 12% Tris -Glicina usando marcador de proteína de color dual Precision plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realizó por inmunotransferencia western usando Ab policlonal anti FIX humano y anticuerpo monoclonal anti carboxilación gamma humano (American Diagnostics). Como se ha reportado previamente, rhFIX migró a 55KDa, mientras que FIX fusionado con dos CTP migró a 75KDa. Se mostró que ambas variantes de proteínas FIX-CTP estaban carboxiladas en gamma (Fig 3B).

20 **Determinación de la actividad cromogénica de FIX:** una evaluación comparativa de la potencia in vitro de recolectas de FIX-CTP frente a la proteína rhFIX (American Diagnostics) se realizó usando un kit de ensayo de actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). En el presente de trombina, fosfolípidos, calcio, las cantidades excesivas de FXIa activan FIX muestreado en FIXa. FIXa forma un complejo enzimático con trombina, FVIII:C activado (suministrado en una cantidad en exceso) fosfolípidos y calcio y activa el factor X, presente en el sistema de ensayo, en FXa. La actividad se correlaciona directamente con la cantidad de FIX, que es el factor limitante. El FXa generado se mide entonces por su actividad específica sobre el sustrato cromogénico de FXa (pNA). La cantidad de pNA generada es directamente proporcional a la actividad de FIXa. Se diluyeron rhFIX y las recolectas de FIX-CTP de forma seriada y se evaluó la potencia comparando una curva de respuesta a la dosis de las recolectas de FIX con una preparación de referencia que consiste en rhFIX o plasma humano. La CE50 promedio de FIX fue 21ng/ml mientras la CE50 calculada de la recolecta de FIX-(CTP)₂ fue 382ng/ml, la CE50 calculada de la recolecta de FIX-CTP fue 1.644ng/ml. Se observó una disminución de aproximadamente 15 veces en la actividad enzimática de la recolecta de FIX-(CTP)₂ (Fig 4).

35 **Actividad de coagulación de FIX (aPTT):** el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) es una medida de la integridad de las rutas intrínsecas y comunes de la cascada de coagulación. El aPTT es el tiempo, en segundos, para que el plasma se coagule después de la adición de un activador de la ruta intrínseca, fosfolípido y calcio. El reactivo aPTT se denomina una tromboplastina parcial porque el factor tisular no se incluye con el fosfolípido como sí el reactivo protime (PT). El activador inicia el sistema, después, las etapas restantes de la ruta intrínseca tienen lugar en presencia de fosfolípido. El intervalo de aPTT de referencia varía de laboratorio a laboratorio, pero habitualmente está en el intervalo de 27 - 34 segundos.

45 Lo principal del ensayo fue cuantificar la capacidad de las recolectas de FIX-CTP para restaurar la actividad de coagulación de plasma humano deplecionado de FIX por la adición de rhFIX. Se mezclaron 300µl de plasma humano deficiente en FIX con 100µl de rhFIX o recolectas de FIX-CTP y se diluyó de forma seriada. Después de 60 segundos de incubación a 37C, se añadieron tromboplastina, CaCl₂, y fosfolípidos a la mezcla, se determinó el tiempo de coagulación en segundos (realizado por American Medical Laboratories). La potencia se evaluó comparando una curva de respuesta a la dosis de las recolectas de FIX con una preparación de referencia que consiste en rhFIX o plasma humano, una unidad de actividad FIX es la concentración de FIX necesaria que iguala la actividad de un ml de plasma humano normal; los resultados presentados de aPTT indican que FIX-(CTP)₂ presenta una reducción de 5,7 veces en su actividad de coagulación específica comparado con rhFIX. Además, los resultados

50

de aPTT junto con el ensayo de actividad cromogénica in vitro sugieren que la recolecta de FIX-(CTP)₂ tiene una actividad enzimática mejorada frente a la recolecta de FIX-CTP (Fig 5). Se obtendrá una actividad mejorada de proteínas FIX-CTP después de la optimización del sistema de expresión (es decir, co-transfección con Furina y optimización de la concentración de Vit K3 en el medio).

5 Tabla 2: actividad de coagulación de FIX

rhFIX(AD) (µg/ml)	PTT(Seg)	FIX-CTP (µg/ml)	PTT(Seg)	FIX-CTP-CTP (µg/ml)	PTT(Seg)
5	31,3	9	45,2	4	47,5
1,25	35,7	2,25	53,3	1	55,9
0,3125	43	0,5625	64,1	0,25	67
0,078125	52,1	0,140625	76,3	0,0625	77,4

Estudio farmacocinético: se administraron rhFIX (American Diagnostic), y recolectas de FIX-CTP en una única inyección intravenosa a ratas Sprague Dawley (seis ratas por sustancia) con una dosis de 75µg/kg de peso corporal.

Tabla 3: plan de estudio de operación de PK

Grupos. Tratados	Artículo de Ensayo	No. de animales/grupo	Dosis Ruta	Sexo	Nivel de Dosis (µg/kg)	Nivel de Dosis (µg por animal)	Vol. Inyectado (µl)	Con. (µg/ml)	*Puntos de Tiempo (horas post-dosis)
1	rFIX	6	IV	M	75	15	500	30	0 (Pre-dosis) 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48, 72.
2	rFIX-CTP	6	IV	M	75	15	500	30	0 (Pre-dosis) 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48, 72.
3	rFIX-CTP-CTP	6	IV	M	75	15	1.000	15	0 (Pre-dosis) 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48, 72.

10

Se tomaron muestras de sangre retro-orbitalmente de 3 ratas alternativamente a las 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48, y 72 horas después de la dosificación. El plasma se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20C hasta el análisis. La concentración de FIX se cuantificó por un ensayo ELISA específico de FIX (AssayPro), el perfil farmacocinético se calculó para cada proteína y es la media de 3 animales a cada punto de tiempo (Fig 6), las vidas medias terminales se calcularon usando software PK solutions 2.0. La tabla 4 resume las concentraciones observadas de FIX a los diferentes tiempos de muestreo. El perfil de PK y el resumen de las vidas medias terminales se resumen en la tabla 5.

15

Tabla 4: resumen del perfil de PK

Tiempo (Hr)	FIX- AD (ng/ml)	FIX-CTP (ng/ml)	FIX-CTP-CTP (ng/ml)
0,083	1.506,7	1.477,5	1.914,8
0,5	1.949,8	1.150,1	1.830,1
1,5	2.189,4	1.009,0	1.264,3

Tiempo (Hr)	FIX- AD (ng/ml)	FIX-CTP (ng/ml)	FIX-CTP-CTP (ng/ml)
4	733,90	709,33	1.000,00
8	319,80	167,20	1.234,67
24	BLQ	54,625	230
48	BLQ	BLQ	120,9

5 Las recolectas de FIX-CTP presentan unos valores mejorados de $T_{1/2\beta}$ comparado con rhFIX (incremento de 2 y 5 veces, respectivamente). Como en la dosificación de FIX, la colección de las concentraciones en suero de los animales a 24hr estuvieron por debajo del límite de cuantificación (BLQ), no se calcularon parámetros adicionales de PK.

Tabla 5: resumen de los parámetros PK

Producto	Vida media terminal- (hr)	Relación (MOD-301X/rhFIX)
rhFIX (American Diagnostics)	2,62	-
MOD-3011 (FIX-CTP)	5,55	2,11
MOD-3011 (FIX-CTP-CTP)	12,9	4,92

10 En este estudio se describió una nueva estrategia para prolongar la vida media de FIX mientras se retiene la potencia terapéutica. La adición de un péptido CTP a una proteína activa tiene un potencial dañino ya que puede interferir con la actividad de la proteína, por lo tanto, la generación de un FIX-CTP recombinante activo mediante la adición de una secuencia CTP al extremo C del FIX es inesperada.

Caracterización de un FIX-CTP-CTP purificado por inmunoafinidad (MOD-3012)

Purificación de MOD3012

15 MOD3012 es un FIX modificado con 2 unidades de CTP en tándem en su carboxi-terminal. MOD3012 se purificó usando anticuerpo monoclonal unido a matriz frente a residuos γ y carboxiglutamilo (Glu) presentes en la región N-terminal de FIX (American Diagnostics Cat# 3570MX). El Ab monoclonal se unió a Sefarosa CL-4B. Se dializó recolecta de MOD3012 en una concentración de 88 μ g/ml frente a 20mM Tris, 150mM NaCl y 10mM EDTA a pH =7,4. La velocidad de carga fue 0,5ml/min, la elución se realizó usando 20mM Tris-HCl, 350mM NaCl y 50mM CaCl y la fracción no unida se recicló cinco veces. Finalmente, la fracción de elución se dializó con PBS, se combinó y se concentró.

Determinación del nivel de antígeno FIX

20 Los niveles de proteína de FIX-CTP y FIX-(CTP)₂; MOD-3011 y MOD-3012, respectivamente, recolectas y MOD3012 purificado se determinaron usando el kit de ELISA de FIX humano (Affinity Biologicals; cat# FIX-AG RUO), la concentración de proteína calculada (μ g/ml) es el promedio de dos operaciones independientes (Fig 7).

25 Tabla 1: concentración de proteína calculada

	FIX-CTP	FIX-CTP-CTP	MOD3012 (purificado)
Nivel de Ag FIX (μ g/ml)	125,78	88,53	172,9
SD	17,28	21,31	2,63
%CV	13,74	24,08	1,52

Adicionalmente, MOD-3012 se cuantificó por ensayo Bradford. La concentración calculada fue 202µg/ml, que es similar a la concentración obtenida por ELISA de FIX humano.

Transferencias SDS-PAGE

5 La recolecta de MOD3012, fracción no unida y proteína purificada, se cargaron en un gel 12% Tris - Glicina usando marcador de proteína de color dual Precision plus (Bio-Rad). El análisis de SDS-PAGE Coomassie se realizó tiñendo el gel con reactivo azul de Commasie (800ng de proteína), la inmunotransferencia western se realizó con (100ng de proteína) anticuerpo policlonal (Ab) anti FIX humano y Ab monoclonal anti carboxilación gamma humana (American Diagnostics Cat #499, 3570). El procedimiento de purificación por inmutofinidad enriqueció significativamente la parte de MOD3012 mientras reducía las impurezas (Fig. 8).

10 Secuenciación N-terminal:

La proteína MOD-3012 purificada se separó por SDS-PAGE en 12% Tris -Glicina y posteriormente se electro-transferió a una membrana PVDF. La banda de interés se cortó y se puso en un filtro de fibra de vidrio tratado con Biobreno purificado. El análisis de la secuencia N-terminal se llevó a cabo por degradación de Edmann usando un secuenciador de proteínas de pulso líquido equipado con un sistema de micro-gradiente 140 C HPLC. La secuenciación N-terminal reveló que el MOD3012 es una mezcla de proteínas con pro péptido escindido de forma no completa y completa. Se mostró que la escisión inadecuada del pro péptido reduce la actividad de coagulación de FIX. Mediante la co-transfección con furina puede obtenerse un proceso de escisión del pro péptido mejorado.

Determinación de la actividad cromogénica de FIX

20 Se realizó una evaluación comparativa de la potencia in-vitro de la proteína MOD-3012 purificada frente a rhFIX (American Diagnostics) y combinación de plasma humano normal usando un kit de ensayo de actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). En presencia de trombina, fosfolípidos y calcio; cantidades excesivas de FXIa activaron FIX en FIXa. FIXa formó un complejo enzimático con trombina, (suministrado en una cantidad en exceso) fosfolípidos y calcio y activa el factor X, presente en el sistema de ensayo, en FXa. La actividad se correlacionó directamente con la cantidad de FIX, que es el factor limitante. El FXa generado se midió entonces por su actividad específica sobre el sustrato cromogénico de FXa (pNA). La cantidad de pNA generado fue directamente proporcional a la actividad de FIXa. Se diluyeron rhFIX, plasma humano y MOD-3012 de forma seriada y se evaluó la potencia comparando una curva de respuesta a la dosis (Fig. 9). La CE₅₀ promedio de rhFIX fue 68.74ng/ml mientras la CE₅₀ calculada de MOD-3012 fue 505ng/ml. Se observó una disminución de aproximadamente 7 veces en la actividad enzimática de MOD-3012 frente a FIX recombinante y una disminución de 16,5 veces frente a plasma humano normal combinado. Esta actividad reducida podría explicarse por la escisión inadecuada del pro-péptido N-terminal, que se identificó por análisis N-terminal.

Actividad de coagulación de FIX (aPTT)

35 El tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) es una medida de la integridad de las rutas intrínsecas y comunes de la cascada de coagulación. El aPTT es el tiempo (medido en segundos) que tarda el plasma en coagularse después de la adición de un activador de la ruta intrínseca, fosfolípido y calcio.

40 El ensayo cuantificó la capacidad de la proteína MOD-3012 para restaurar la actividad de coagulación de plasma humano deplecionado de FIX por la adición de rhFIX. Se mezclaron 300µl de plasma humano deficiente en FIX con 100µl de rhFIX, MOD- 3012 (FIX-CTP-CTP (los CTP están en tándem en el extremo C)), o plasma humano normal combinado que se diluyó adicionalmente. Después de 60 segundos de incubación a 37°C. se añadieron factor tisular (TF), CaCl₂, y fosfolípidos a la mezcla. Se determinó el tiempo de coagulación en segundos. Se evaluó la potencia comparando una curva de respuesta a la dosis del MOD3012 con una preparación de referencia que consiste en rhFIX o plasma humano. Una unidad de FIX se definió como la cantidad de FIX que iguala la actividad de 1ml de plasma humano normal.

45 Los resultados presentados de aPTT (Fig. 10) indican que la actividad de coagulación de MOD3012 es sólo 1,4 menor que el plasma humano normal combinado y similar al rhFIX. Los resultados de aPTT junto con el ensayo de actividad cromogénica in-vitro sugieren que la purificación de MOD-3012 no dañó su actividad.

Actividad farmacocinética de MOD3012

50 MOD3012 purificado, rhFIX (American Diagnostic) y recolectas que contienen MOD3012 y MOD3011 (FIX-CTP) se administraron en una única inyección intravenosa a ratas Sprague Dawley (ocho ratas por sustancia) en una dosis de 100µg/kg de peso corporal.

Tabla 2: resumen del estudio de PK

Grupos. Tratados	Artículo de Ensayo	No. de animales/grupo/punto de tiempo	Nivel de Dosis (µg/kg)	Nivel de Dosis (µg por animal)	Vol. Inyectado (µl)	Con. (µg/ml)	Puntos de Tiempo (horas post-dosis)
A	rFIX	8	100	20	500	40	0 (Pre-dosis) 0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
B	rFIX-CTP (recolecta)	8	100	20	500	40	0 (Pre-dosis) 0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
C	rFIX-CTP-CTP (recolecta)	6	100	20	500	40	0 (Pre-dosis) 0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
D	rFIX-CTP-CTP (purificado)	4	100	20	500	40	0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 4, 8, 72.

Se tomaron muestras de sangre retro-orbitalmente de 4 ratas alternativamente a las 0,083, 0,5, 2, 4, 7 10, 24, 48, y 72 horas después de la dosificación. Se preparó plasma citrado (0,32%) inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20°C hasta el análisis. La concentración de FIX se cuantificó usando un kit de ELISA de FIX humano (Affinity Biologicals). El perfil farmacocinético se calculó para cada proteína como la media de 4 animales a cada punto de tiempo (Fig. 11). La vida media terminal se calculó usando software PK solutions 2.0. La tabla 3 resume las concentraciones observadas de FIX a diferentes puntos de tiempo de muestreo. El resumen de los parámetros de PK también se presenta en la tabla 4.

10 Tabla 3: resumen del perfil de PK

Tiempo (hr)	FIX-CTP recolecta ng/ml	FIX-(CTP) ₂ recolecta ng/ml	rhFIX ng/ml	MOD-3012 purificado ng/ml
0,085	1.038,97	1.123,62	325,05	886,48
0,5	939,12	956,80	274,58	670,92
1	791,97	843,85	222,90	674,17
2	304,98	673,31	186,00	503,91
4	315,37	525,50	109,69	357,36
7	171,45	384,36	67,62	257,02
10	50,34	250,73	40,20	158,66
24	10,07	78,50	BLQ	52,13
48	BLQ	23,40	BLQ	18,07

Tabla 4: resumen de los parámetros PK

	T1/2 (hr)	AUC ng-hr/ml	MRT (hr)	Vd ml/Kg	CL MI/hr/Kg
FIX-CTP recolecta	4,17	3.622	4,5	155,1	27,6
FIX-(CTP)₂ recolecta	10,44	9.105,7	12	165,4	10,9
rhFIX	3,72	1.416,8	5,1	373,8	70,183
MOD-3012 purificado	11,14	6.314,2	12,3	254,5	15,83

5 La recolecta de MOD-3012 demostró un perfil mejorado de PK comparado con recolecta de MOD3011. Además, MOD-3012 purificado presenta un incremento de 3 veces en el valor de T1/2_β y un incremento de 4,5 veces en AUC comparado con rhFIX.

La cantidad reducida de FIX secretado fusionado a dos moléculas de CTP en tándem frente a la fusión de un único CTP parece deberse a la adición de un CTP extra y no a la detección reducida por ELISA. Esta suposición se basa en el hecho de que la concentración calculada de MOD-3012 purificado por Bradford fue similar a la concentración calculada obtenida por ELISA.

10 La actividad de coagulación de MOD3012 fue similar a plasma humano combinado; sin embargo, su actividad cromogénica in-vitro fue significativamente menor cuando se compara con rhFIX o plasma humano combinado. El ensayo de actividad cromogénica se reportó como un ensayo muy sensible comparado con el ensayo de coagulación. La razón para la actividad reducida de MOD3012 puede variar. Afinidad reducida para FXIa por la adición de CTP o modificaciones posteriores a la transcripción reducidas (por ejemplo, 12-10 residuos de GLA y escisión del pro-péptido). El análisis N-terminal reveló que la escisión proteolítica del pro-péptido de MOD-3012 no se completó totalmente antes de la secreción. Como esta modificación posterior a la transcripción es crucial para la actividad enzimática normal de la proteína, la co-transfección con plásmido Furina-PACE es favorable y puede mejorar la actividad de MOD3012.

15 Finalmente, el estudio de PK comparativo de MOD-3012 en ratas demostró que la fusión de dos CTP en tándem al extremo C de FIX, generó un FIX con vida media prolongada. La comparación de las propiedades de PK de MOD-3012 con FIX-FC o FIX-FP (proteínas recombinantes competitivas; tabla 5 a continuación) indica que MOD3012 tiene un T1/2 mejorado comparado con FIX-FP pero T1/2 reducido comparado con FIX-FC.

Tabla 5: propiedades de PK de FIX duraderos

Producto	Empresa	T1/2 (Relación)	AUC	CL
FIX-FP	CSL-Behring	2	No Indicado	No Indicado
MOD-3012	Prolor	3	4,5	4,7

Relación= duradero / rhFIX o BeneFIX

25 Modelo de ratón con FIX deplecionado

Con el fin de evaluar el modelo de actividad in-vivo, se obtuvieron ratones con FIX inactivado y se estableció una colonia de cría. Se inyectaron 10µg bien de hFIX recombinante comercial (Benefix) o rFIX-(CTP)₂ (MOD-3012) en la vena de la cola de un ratón con FIX inactivado anestesiado (22-28g). La cantidad de proteína inyectada es igual a la concentración requerida de FIX en plasma normal (5µg/ml). Se toman muestras de sangre de la cola cortada en tubos capilares heparinizados a puntos de tiempo específicos. Las muestras de plasma se evalúan para niveles de FIX por ELISA y se mide la eficacia por el ensayo de coagulación aPTT.

30 **Incremento de la eficacia de escisión del propéptido de FIX:** se fusionó ADNc del péptido CTP con el extremo 3' de ADNc de FIX humano. Las construcciones que expresan rFIX y Furina correspondientes se co-transfectaron en células Dg44; un ADNc de rFIX humano también se co-transfectó con el plásmido de Furina como un control. La secreción de alto nivel de FIX da lugar a la secreción de una mezcla de pro-factor y un factor FIX maduro, debido a la cantidad limitada de la proteasa Furina en la célula. La co-transfección de un vector que expresa Furina con un

vector que expresa pro-factor incrementa la recuperación y resulta en la secreción de FIX completamente procesado en el medio.

Después de la co-transfección de FIX-(CTP)₂ y Furina, se generan clones estables y se recoge recolecta para la evaluación de la escisión del pro péptido. Se cargan 100ng de proteína en un gel 12% Tris -Glicina usando marcador de proteína de color dual Precision plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realiza por inmunotransferencia western usando Ab policlonal anti FIX humano (American Diagnostics) y un anticuerpo policlonal anti pro péptido. Como se ha reportado previamente, rhFIX migró a 55KDa, mientras que FIX fusionado con dos CTP migró a 75KDa. Se muestra que ambas variantes de proteínas FIX experimentan una escisión del pro-péptido apropiada completa.

Para determinar si la escisión apropiada del pro-péptido mejora la actividad enzimática de FIX-(CTP)₂, se realiza una evaluación comparativa de actividad cromogénica y de coagulación de recolecta de FIX-(CTP)₂ co transfectado con Furina. Se observó una mejora significativa en la actividad específica de FIX-(CTP)₂ que es similar a rhFIX.

En conclusión, los resultados descritos en la presente memoria sugieren que MOD-3012 puede usarse eficientemente para tratar a pacientes con hemofilia B. Las construcciones de FIX fusionado con CTP se benefician de un comportamiento farmacológico in-vivo mejorado que supera el inconveniente en determinadas medidas in-vitro. Este tratamiento propuesto es ventajoso sobre tratamientos previos ya que se reduce la tasa de las infusiones y la cantidad de las dosis requeridas.

Es importante indicar que cuando se usó una estrategia de molécula fusionada con albúmina para mejorar la vida media de FIX, el FIX recombinante resultó inactivo. El uso de la nueva estrategia presente, da lugar al diseño y purificación de una proteína fusionada FIX nueva recombinante que presenta una actividad duradera mejorada. Como las meras modificaciones de tamaño no mejoraron la farmacocinética de FIX inyectado. El descubrimiento de que CTP fusionado a FIX facilita los parámetros farmacocinéticos fue inesperado. La presencia de residuos péptido-ácido siálico altamente glicosilados estabilizó la proteína y la protegió de interacciones con receptores vasculares sin suprimir determinantes clave de la función de FIX.

FIX-CTP tiene una eficacia terapéutica similar a rFIX en pacientes con hemofilia B y requirió una dosificación menos frecuente. También puede parecer que una única inyección de FIX-CTP es suficiente para controlar los episodios hemorrágicos y reducir el número de inyecciones que son necesarias durante la intervención quirúrgica en pacientes con hemofilia B.

Ejemplo 2

Generación y utilización del Factor de Coagulación FVII

El factor de coagulación VIIa recombinante (NovoSeven) (FVIIa) estaba disponible comercialmente y se aprobó en 1996 para el tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia con inhibidores. Sin embargo, rFVIIa tenía una desventaja importante - rFVIIa se aclaraba rápidamente con una vida media terminal de 2,5 horas. Como resultado, los pacientes requerían generalmente múltiples infusiones frecuentes (2-3 dosis proporcionadas en un intervalo de 2-3 horas) para conseguir una homeostasis adecuada después de una hemorragia leve a moderada.

Aquí, la generación de una molécula FVIIa-CTP recombinante con una vida media prolongada basada en la fusión de FVII con un CTP humano, como se describe. El FVIIa-CTP recombinante se expresó en células de mamífero y se caracterizó *in-vitro* e *in vivo*. Se demostró que la actividad de rFVII-CTP era comparable con rFVII, los estudios farmacocinéticos y de eficacia en ratas demostraron propiedades mejoradas del rFVII-CTP. Los resultados de este estudio demostraron que es factible desarrollar una molécula de rFVIIa con vida media prolongada con propiedades hemostáticas muy similares a la enzima de tipo salvaje.

Clonación y expresión de la molécula FVII recombinante: se construyeron varios clones de Factor VII en nuestro vector de expresión eucariota (pCI-dhfr) (Fig. 1). Se pidió el clon de ADNc FL verificado de MGC humano (IRCM) que contiene la secuencia del factor de coagulación VII del Homo sapiens en "Open Biosystems" (OB-MHS4426). Se sintetizaron los cebadores siguientes por Sigma-Genosys en la secuencia siguiente: Cebador 67: 5'CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCC3' (contiene el extremo 5' del ADN del Factor VII y el sitio de restricción de XhoI) (SEQ ID NO: 5); Cebador 68^R: 5' TCTAGAATAGGTATTTTTCCACATG3' (contiene el sitio de restricción de XbaI) (SEQ ID NO: 6) y Cebador 69: 5' TCTAGAAAAAGAAATGCCAGC3' (contiene el sitio de restricción de XbaI) (SEQ ID NO: 7); y Cebador 70^R: 5'GCGGCCGCATCCTCAGGGAAATGGGGCTCGCA3' (contiene el extremo 3' del ADN del Factor VII y el sitio de restricción de NotI) (SEQ ID NO: 8).

La clonación se realizó en dos conjuntos de reacción de PCR. La primera reacción se llevó a cabo con el cebador 67 y cebador 68^R y el plásmido de ADNc con la secuencia del Factor VII (OB-MHS4426) se usó como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 534 pb, se aisló y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se aisló el fragmento XhoI -XbaI que contenía el extremo amino de la secuencia del factor VII. La segunda reacción se llevó a cabo con el cebador 69 y cebador 70^R y de nuevo el plásmido de ADNc con la secuencia del Factor VII (OB-MHS4426) se usó como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 813 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se aisló el

fragmento XbaI-NotI que contenía el extremo carboxi de la secuencia del factor VII. Los dos fragmentos se insertaron en nuestro vector de expresión eucariota pCI-dhfr (triple ligación) para rendir el clon 501-0-p136-1.

5 El plásmido 501-p136-1 (Factor VII en el vector pCI-dhfr) se digirió con las enzimas de restricción XhoI y KpnI. Se aisló un fragmento de ~1186 pb. Se digirió un clon del Factor VII parcial (1180 pb-1322 pb) seguido de la secuencia de CTP, secuencia de terminación y secuencia NotI que se sintetizó por GeneArt (0721543) con las enzimas de restricción KpnI y NotI. Se aisló un fragmento de ~253 pb. Los dos fragmentos se insertaron en nuestro vector de expresión eucariota pCI-dhfr (triple ligación) para rendir el clon 501-1-p137-2. Se digirió pCI-dhfr-701-2-p24-2 con las enzimas de restricción XhoI y Apal y el fragmento grande (vector) se aisló.

10 Se digirió pCI-dhfr-501-2-p137-2 (Factor VII-ctp x1) con las enzimas de restricción XhoI y Apal y se aisló un inserto de ~ 1200 pb. El vector y el inserto se ligaron para rendir 501-2-p139-2. Las células Dg44 se sembraron en placas en placas de cultivo tisular de 100mm y se crecieron hasta una confluencia del 50-60%. Se usó un total de 2ug de ADN para la transfección de una placa de 100mm usando el reactivo FuGene (Roche) en medio sin proteínas (Invitrogen CD Dg44). El medio se eliminó 48 horas después de la transfección y se reemplazó con un medio sin proteínas (Invitrogen CD Dg44) sin nucleósidos. Después de 14 días, la población de células transfectadas se transfirió a matraces de cultivo tisular T25 y la selección se continuó durante 10-14 días hasta que las células empezaron a crecer bien como un clon estable. Se seleccionaron clones con alta expresión y aproximadamente 2×10^7 células se usaron para inocular 300ml de medio de crecimiento en una botella rotatoria de 1.700cm^2 (Corning, Corning NY) suplementado con 5ng/ml de vitamina K3 (bisulfato sódico de menadiona; Sigma). El medio de producción (recolecta) se recogió después de una disminución rápida en la viabilidad de las células hasta alrededor de 70%. El medio de producción se aclaró en primer lugar usando y después de concentró aproximadamente 20 veces y se dializó con PBS usando un casete de filtración de flujo (10KDaMWCO; Millipore Corp, Billerica, MA)

Determinación del nivel de antígeno FVII

25 El ADNc que codifica el péptido CTP se fusionó con el extremo 3' del ADNc que codifica FVII humano. La construcción de rFVII correspondiente se transfectó en células Dg44. Como un control, se utilizó un ADNc de rFVII humano. El medio de producción (recolecta) se recogió, se concentró y el FVII recombinante secretado se evaluó adicionalmente. Se determinaron los niveles de antígeno rFVII, rFVII-CTP y rFVII-CTP-CTP por un kit de ELISA de FVII humano AssayMax (AssayPro) (Fig. 2A). No hubo una diferencia significativa en el nivel de secreción de rFVII-CTP y rFVII-(CTP)₂ comparado con rFVII nativo.

Transferencias SDS-PAGE

30 El análisis por SDS-PAGE se hizo cargando 50ng de proteína rFVII bien recolecta, purificada o activada. Las muestras se cargaron en un gel 12% Tris -Glicina usando marcador de proteína de color dual Precision plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se hizo realizando una inmunotransferencia western usando un Ab monoclonal anti FVII humano (R&D systems) o anticuerpo policlonal anti-CTP generado en conejo.

35 El nivel de antígeno rFVII se correlacionó con el nivel de proteína detectada en un SDS-PAGE inmunoensayado con Ab anti FVII. rFVII-CTP migró como una única banda mientras el peso molecular correspondiente del FVII control fue aproximadamente 52KDa, ambas proteínas reaccionaron con anticuerpos específicos de FVII en inmunotransferencias. El rFVII-CTP también reaccionó con anticuerpos específicos de CTP. rFVII se secretó en su forma de zimógeno sin traza de proteína activada.

Actividad cromogénica de FVII:

40 Se determinó la actividad de los recolectas rFVII, rFVII-CTP y rFVII-(CTP)₂ usando un kit de ensayo cromogénico disponible comercialmente (kit de ensayo de actividad cromogénica de FVII humano AssaySense (AssayPro). Para la caracterización funcional del rFVII-CTP y su capacidad para activarse adicionalmente (FVIIa), se pusieron rFVII-CTP concentrados (recolectas) en un kit de ensayo cromogénico disponible comercialmente que mide la capacidad de TF/FVIIa de activar el factor X a factor Xa que en presencia de sustrato específico de FXa libera una señal cuantificada (AssayPro). La adición del péptido CTP al extremo C de la proteína rFVII no alteró su actividad serina proteasa (Fig. 2B, C).

Actividad de coagulación de FVII:

50 El tiempo de protrombina (PT) mide la ruta extrínseca de la coagulación. El PT es el tiempo (medido en segundos) que tarda el plasma en coagularse después de la adición de un activador de la ruta extrínseca, fosfolípido y calcio. Se usa para determinar la tendencia a la coagulación de la sangre, específicamente en la medida de la dosificación de warfarina, daño hepático, y estado de vitamina K. El intervalo de referencia para el tiempo de protrombina es habitualmente alrededor de 12-15 segundos. Específicamente, el ensayo cuantificó la capacidad de recolecta de FVII-CTP y FVII-(CTP)₂ de restaurar la actividad de coagulación de plasma humano deplecionado de FVII por la adición de rFVII. Se mezclaron 300μl de plasma humano deficiente en FVII con 100μl de recolectas de FVII, FVII-CTP y FVII-(CTP)₂ a concentraciones específicas, o plasma humano normal combinado y se diluyeron adicionalmente. Después de 60 segundos de incubación a 37°C, se añadieron factor tisular (TF), CaCl₂, y fosfolípidos a la mezcla. Se determinó el tiempo de coagulación en segundos. Se evaluó la potencia comparando

una curva de respuesta a la dosis de recolectas de FVII-CTP y FVII-(CTP)₂ con una preparación de referencia que consiste en rhFVII o plasma humano combinado. Una unidad de FVII activo se definió como la cantidad de FVII que es igual a la actividad de un ml de plasma humano normal. La actividad de coagulación PT de rFVII y rFVII - CTP se midió en un coagulómetro (Instrumentation Laboratory).

5 Como se ha mostrado previamente, la adición del péptido CTP al extremo C de la proteína rFVII no dañó su actividad serina proteasa y dio lugar al inicio y activación de un factor X y factor IX nativos en plasma humano. Después de CTP adicionales en el extremo C, se observó una reducción de tres veces en la actividad serina proteasa (Fig 2D)

10 **Estudio de farmacocinética:** se administraron recolectas de rFVII, rFVII-CTP, y rFVII-(CTP)₂ intravenosamente a ratas Sprague Dawley (seis ratas por sustancia) con una dosis de 100µg/kg de peso corporal. Para todos los experimentos *in-vivo* la cantidad de la proteína respectiva se determinó sobre la base del kit de ELISA de FVII. Para cada sustancia de ensayo FVII la cantidad inyectada se calculó teniendo en cuenta las diferencias en el peso molecular de rFVII frente a rFVII-CTP que da lugar a una diferente concentración molar.

15 Se tomaron muestras de sangre retro-orbitalmente usando un esquema de muestreo alterado para minimizar la interferencia de los niveles del procedimiento de muestreo que se van a cuantificar: de 3 ratas a 30 min y 90, 2, 6, y 48 horas, y de las tres ratas restantes a 15, 60 min y 1,5, 4, 24 hrs alternativamente. El plasma se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20°C hasta el análisis. La concentración de FVII se cuantificó por un ensayo ELISA específico de FVII. Se calcularon la vida media y el área bajo la curva (AUC) usando la regla trapezoidal lineal. La comparación de estos parámetros de aclaramiento reveló que la vida media *in-vivo* y AUC de rFVII-(CTP)₂ son significativamente mayores que los de rFVII (Tabla 8).

Tabla 6: parámetros del estudio PK

Grupo	Ruta	Dosis	T _{1/2}	AUC _{0-t}	CL/F	MRT
		µg/kg	min	ng/min/mL	mL/min/kg	min
FVII	IV	60	4,07	3.314,7	6,195	6,2
FVII-CTP	IV	60	β=51,06	31.353,9	0,287	73,7
FVII-CTP-CTP	IV	60	β=13,66	7.626,8	1,18	15,4

Caracterización de FVIIa-CTP recombinante:

25 Durante la activación, FVII se escinde en R152 resultando en un dominio de cadena pesada y uno ligera que se mantienen juntos por un único puente disulfuro. rFVIIa-(CTP)₂ se purifica y activa por un proceso de purificación con columnas de intercambio iónico. Con el fin de evaluar completamente rFVIIa-(CTP)₂, la proteína se carga en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras a FVIIa comercial (Novoseven®). Los dominios de cadena pesada y ligera se separan y migran como bandas separadas de pesos moleculares 55 y 25 KDa. Ambas proteínas reaccionan con anticuerpos específicos de FVII pero la cadena pesada del rFVIIa-CTP reacciona específicamente con anticuerpos anti-CTP específicos indicando que esta banda representa la cadena pesada de FVII fusionada con CTP. La cadena ligera reacciona específicamente con Ab anti carboxilasa gamma. La concentración de la proteína FVIIa se determina por un kit ELISA específico de FVIIa.

Secuenciación N-terminal de FVIIa:

35 Se separa rFVII -CTP-CTP en proteínas purificadas activadas o zimógenas por SDS-PAGE (en 12% Tris -Glicina) y posteriormente se electrotransfiere a una membrana PVDF. Las bandas de interés se cortan y se ponen en un filtro de fibra de vidrio tratado con Biobreno purificado. El análisis de la secuencia N-terminal se lleva a cabo por degradación de Edmann usando un secuenciador de proteínas de pulso líquido equipado con un sistema de microgradiente 140 C HPLC. La identidad de la proteína recombinante y la escisión apropiada del pro péptido se verifica adicionalmente por secuenciación N-terminal.

40 **Actividad de coagulación de FVIIa:**

45 Con el fin de evaluar la actividad de coagulación de FVII-(CTP)₂, se realiza un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). Se sustituye la muestra de plasma deficiente en FVIII con rFVIIa (NovoSeven) o rFVIIa-(CTP)₂, se mezclan 300µl de plasma humano deficiente en FVII con 100µl de FVIIa o rFVIIa-(CTP)₂ a concentraciones específicas, o plasma humano normal combinado que se diluye adicionalmente. Después de 60 segundos de incubación a 37°C. se añaden factor tisular (TF), CaCl₂, y fosfolípidos a la mezcla. Se determina el

tiempo de coagulación en segundos. Se evalúa la potencia comparando una curva de respuesta a la dosis de rFVIIa-(CTP)₂ con una preparación de referencia que consiste en rhFVIIa o plasma humano normal combinado. Una unidad de FVIIa se define como la cantidad de FVIIa que es igual a la actividad de 1ml de plasma humano normal. La actividad de coagulación aPTT de rFVII y rFVIIa-(CTP)₂ se mide en un coagulómetro (Instrumentation Laboratory). La actividad de coagulación aPTT de rFVIIa y rFVIIa-(CTP)₂ es similar.

Estudios de farmacocinética en ratas:

Con el fin de caracterizar la influencia de la adición de CTP al rFVIIa en su potencial de longevidad, se realiza un estudio farmacocinético comparativo en ratas. Se inyectan NovoSeven (rFVIIa) y rFVIIa-(CTP)₂ en TBS IV a 6 ratas SD. Los niveles en curso de tiempo de FVIIa se detectan usando un kit de ELISA de FVIIa. La vida media y AUC se calculan para cada proteína. La comparación de estos parámetros de aclaramiento revela que las medidas in-vivo de vida media, recuperación, y AUC del rFVIIa-(CTP)₂ son superiores a las de NovoSeven.

Modelo de eficacia in-vivo de FVIIa-CTP:

Con el fin de evaluar la actividad in-vivo del rFVIIa-(CTP)₂, se tratan 6 ratas SD con fenprocumón con el fin de inhibir la carboxilación gamma dependiente de vitamina K del dominio Gla de los factores de coagulación. Debido a la vida media corta de FVIII, el FVIII nativo se depleciona más rápido que los otros factores de coagulación dependientes de vitamina K. Se muestra que después de 16 horas, la actividad de FVIII está casi completamente deplecionada. A este punto de tiempo, la adición externa de FVIIa corrigió-redujo el tiempo de coagulación en ratas. Con el fin de comparar NovoSeven y rFVIIa-(CTP)₂, se inyectaron dosis iguales de ambas proteínas en ratas 16 horas después del tratamiento con fenprocumón. El tiempo de coagulación de la sangre de las ratas se corrige al valor normal por ambas proteínas recombinantes. Así, ambas proteínas presentan un efecto comparable en este modelo.

En un experimento separado, se inyectan NovoSeven y rFVIIa-(CTP)₂ inmediatamente después del tratamiento con fenprocumón, pero los parámetros de coagulación se determinan después de 16 horas. NovoSeven no corrige el tiempo de coagulación en estas condiciones debido a una vida media corta. Por el contrario, el tiempo de coagulación de los animales tratados con rFVIIa-(CTP)₂ se corrige a valores cercanos a los valores de los controles sanos. Esto indica que rFVIIa-(CTP)₂ todavía está presente y retiene actividad biológica después de un periodo más largo. Estos datos confirman además la gran ventaja en el uso de rFVIIa modificado con CTP.

Modelo de ratones hemofílicos FVIII:

Con el fin de evaluar el modelo de actividad in-vivo, se obtienen ratones con FVII inactivado y se establece una colonia de cría. Se inyectan 10µg bien de hFVIIa recombinante comercial (Novoserver) o rFVIIa-(CTP)₂ en la vena de la cola de un ratón con FVIII inactivado anestesiado (22-28g). La cantidad de proteína inyectada es igual a la concentración requerida de FVIII en plasma normal (5µg/ml). Se toman muestras de sangre de la cola cortada en tubos capilares heparinizados a puntos de tiempo específicos. Las muestras de plasma se evalúan para niveles de FVIIa por ELISA y se mide la eficacia por un ensayo de coagulación aPTT.

En este estudio, se genera una construcción de fusión de FVII con CTP. Esta proteína recombinante es la base para un tratamiento que proporciona una vida media y retención prolongadas de potencia terapéutica favorable adecuada.

Estos resultados sugieren que rFVIIa-(CTP)₂ tiene una eficacia terapéutica similar a rFVIIa en pacientes con hemofilia. Además, esta tecnología requiere una dosificación menos frecuente. Parece que una única inyección de rFVIIa-(CTP)₂ es suficiente para controlar los episodios hemorrágicos y reducir el número de inyecciones que son necesarias durante la intervención quirúrgica. Esta proteína recombinante puede usarse como un tratamiento profiláctico a largo plazo.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que consiste en
un factor de coagulación y cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa, o
- 5 un factor de coagulación y tres CTP de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX,
en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (es decir, la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS).
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que la secuencia de al menos un CTP comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
3. El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que al menos un CTP comprende al menos un sitio de glicosilación.
4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos un CTP está unido a dicho factor de coagulación mediante un conector.
5. El polipéptido de la reivindicación 4, en el que dicho conector es un enlace peptídico.
- 15 6. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Un polinucleótido que comprende
una parte codificadora que codifica un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa, o
- 20 una parte codificadora que codifica un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y tres CTP de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX,
en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
8. El polinucleótido de la reivindicación 7, en el que al menos un CTP comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
- 25 9. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7 u 8.
10. Una célula que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.
11. Una composición que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.
12. Un método para prolongar la vida media biológica de un factor de coagulación, que comprende la etapa de
- 30 unir cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa, o
unir tres CTP de gonadotropina coriónica humana al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX,
- 35 en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4, mejorando de esta manera la vida media biológica de dicho factor de coagulación.
13. Un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) de un factor de coagulación, que comprende la etapa de
- unir cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa, o
- 40 unir tres CTP de gonadotropina coriónica humana al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX,
en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4, mejorando de esta manera la AUC de dicho factor de coagulación.
14. El método de la reivindicación 12 ó 13, en el que la secuencia de aminoácidos de al menos un CTP de gonadotropina coriónica se selecciona de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

15. Un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y cinco péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4, para uso en el tratamiento de la hemofilia, en el que dicho factor de coagulación es Factor VII o Factor VIIa.
- 5 16. Un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y tres péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica humana unidos al extremo carboxi de dicho factor de coagulación, en el que la secuencia de dichos CTP comprende los primeros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 4, para uso en el tratamiento de la hemofilia, en el que dicho factor de coagulación es Factor IX.
- 10 17.- El polipéptido para uso según la reivindicación 15 ó 16, en el que la secuencia de aminoácidos de al menos un CTP de gonadotropina coriónica se selecciona de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

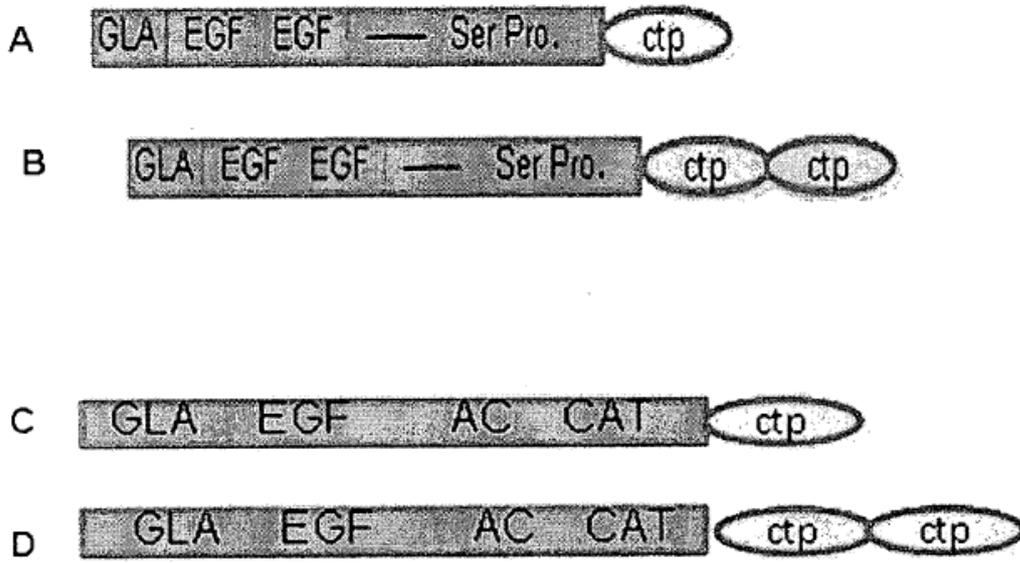


FIGURA 1

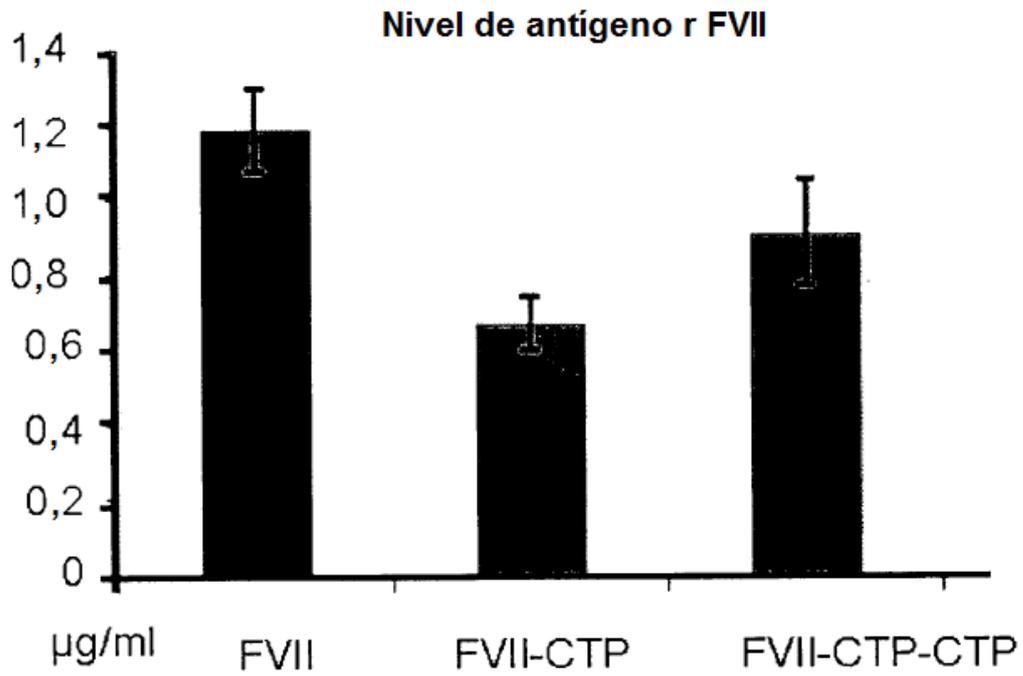


FIGURA 2A

Actividad cromogénica de r FVII

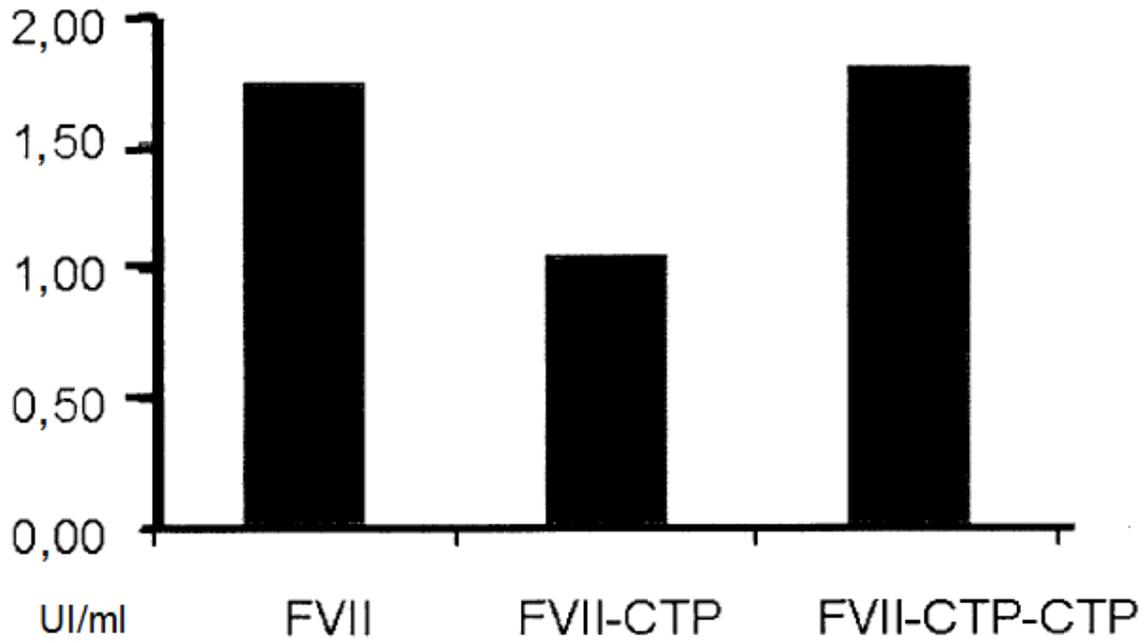


FIGURA 2B

Actividad específica de FVII

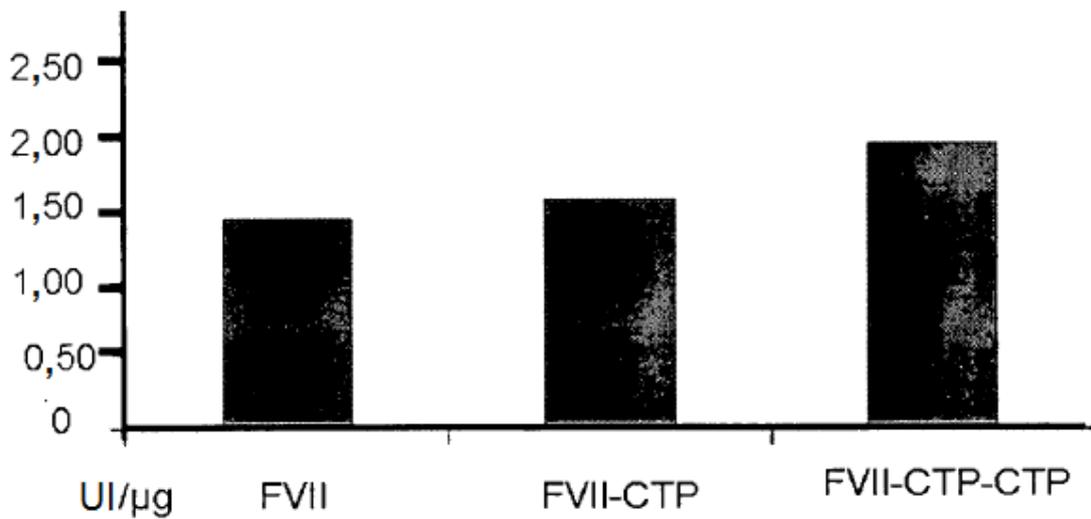


FIGURA 2C

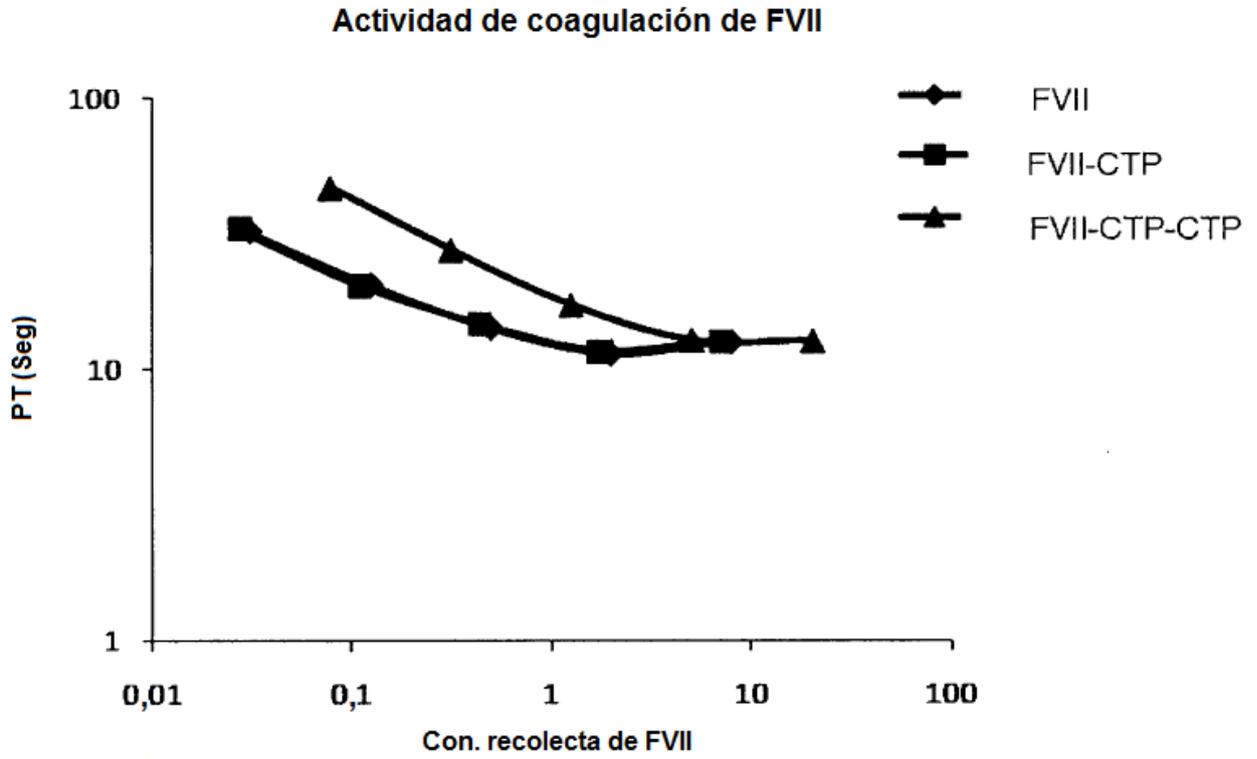


FIGURA 2D

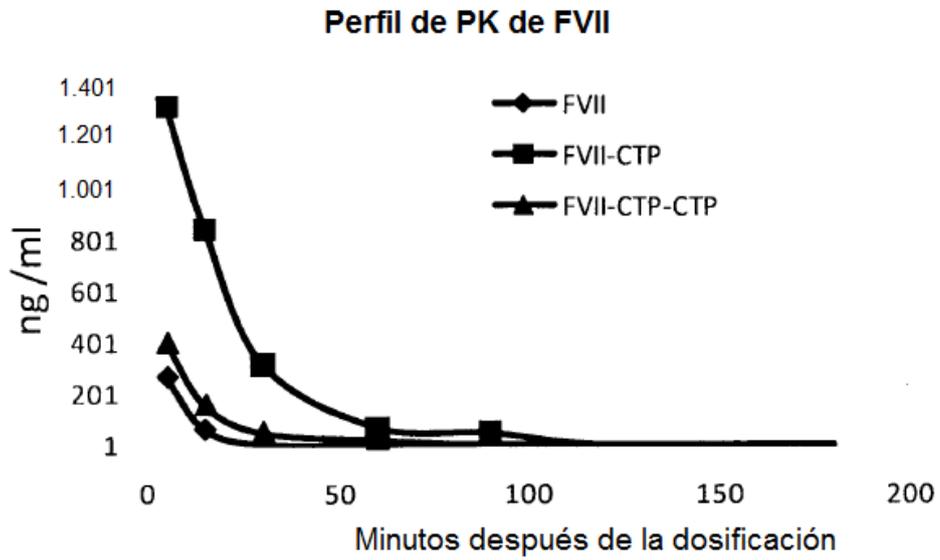


FIGURA 2E

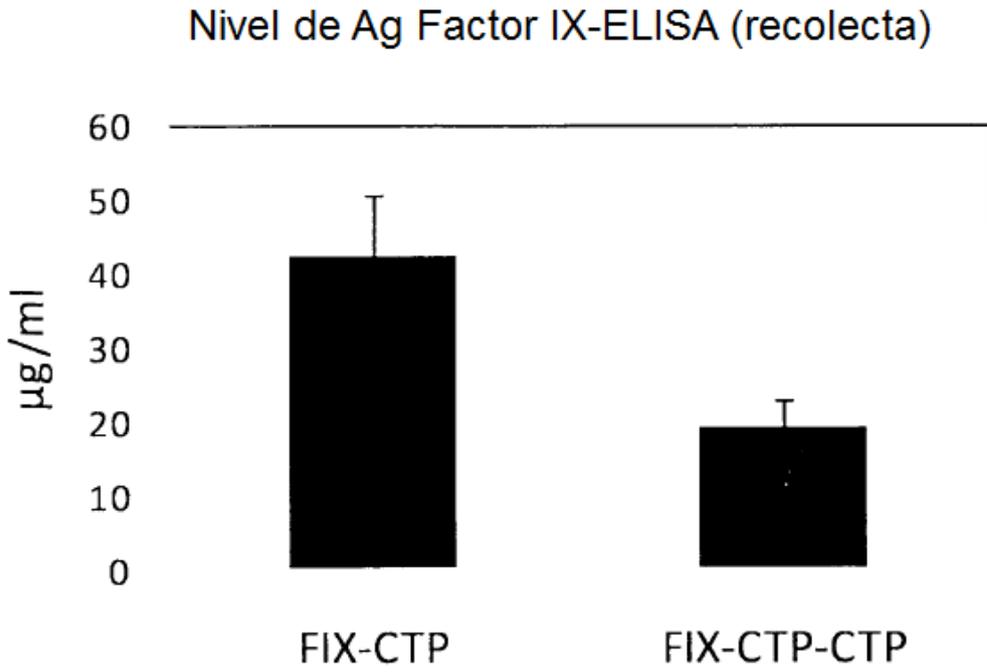


FIGURA 3A

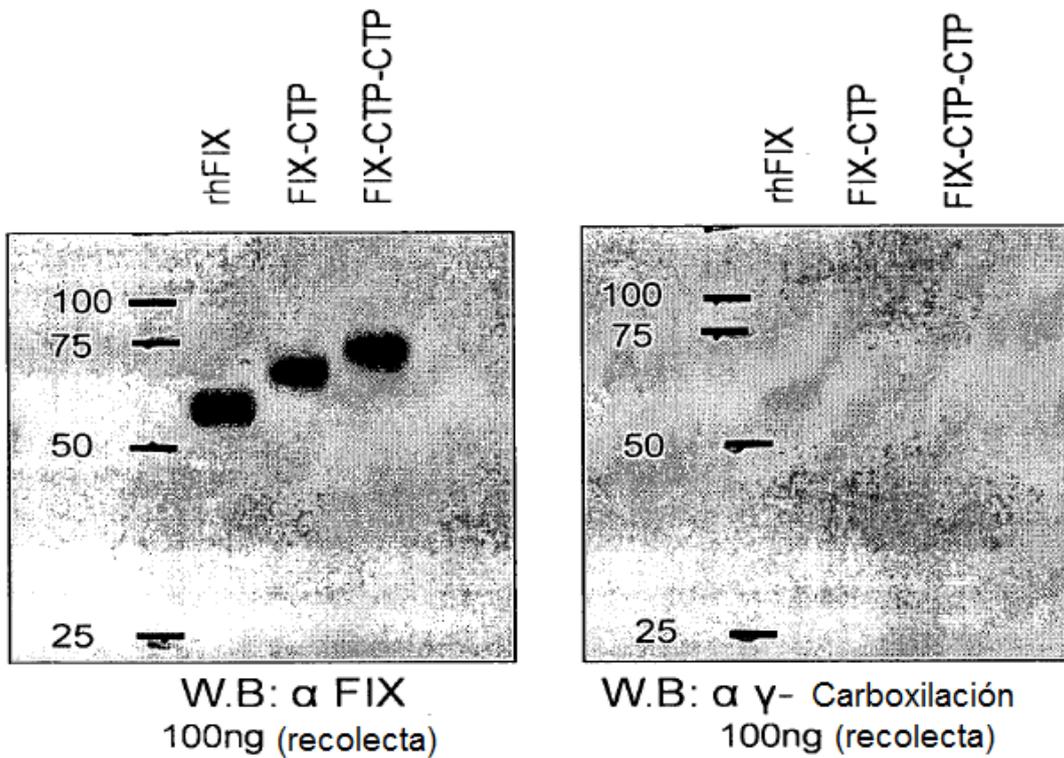


FIGURA 3B

Actividad cromogénica del factor IX (recolectas)

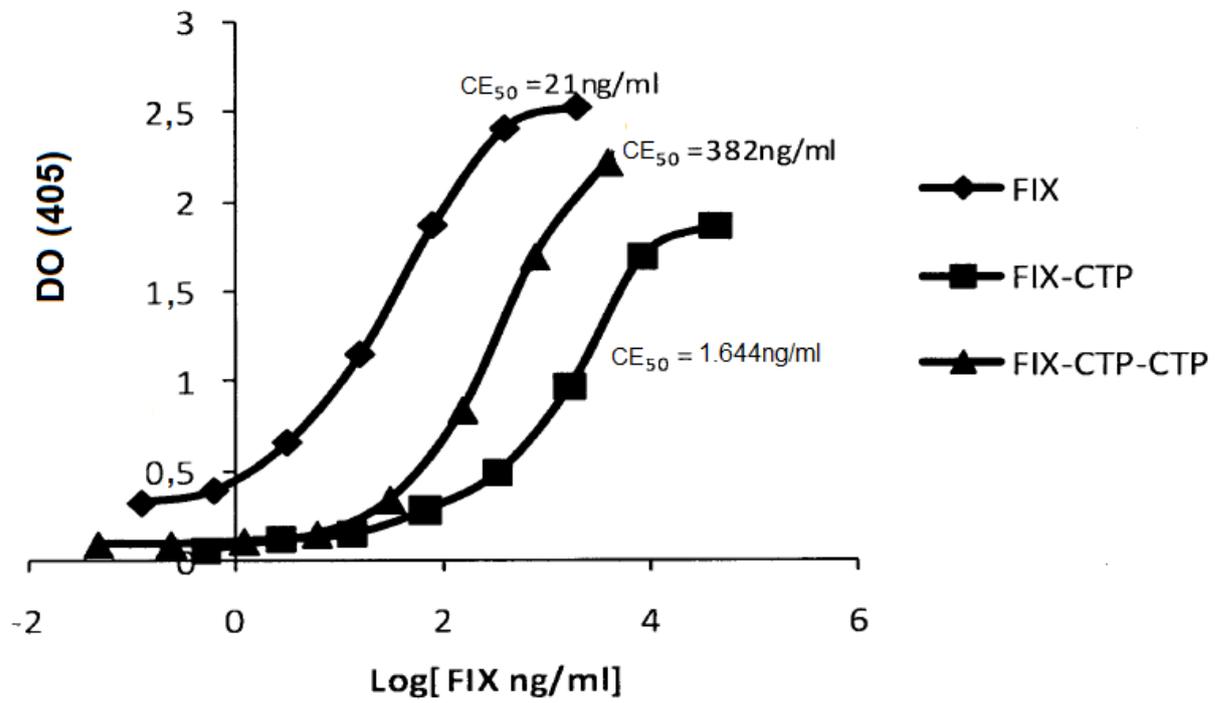
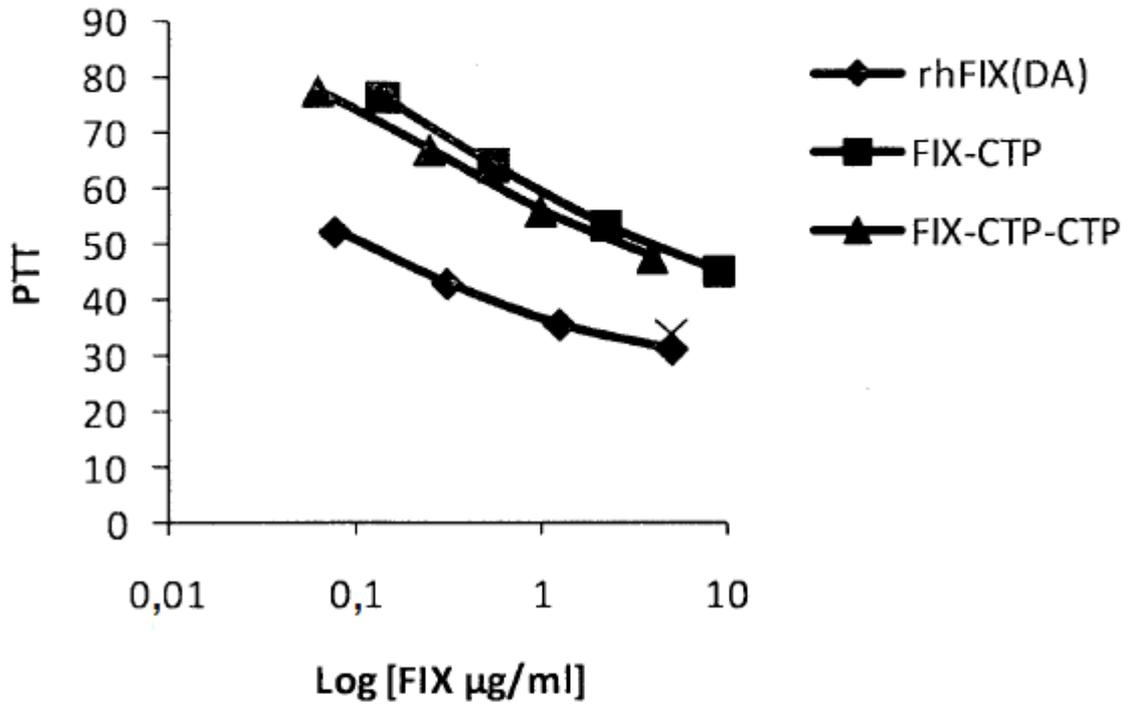


FIGURA 4

**Actividad de coagulación del Factor IX (aPTT)
(recolectas)**



Proteína	rh FIX	MOD-3011	MOD-3012
Actividad Específica (U/mg)	214,5	30,45	38

FIGURA 5

FIX recombinante-Perfil de PK

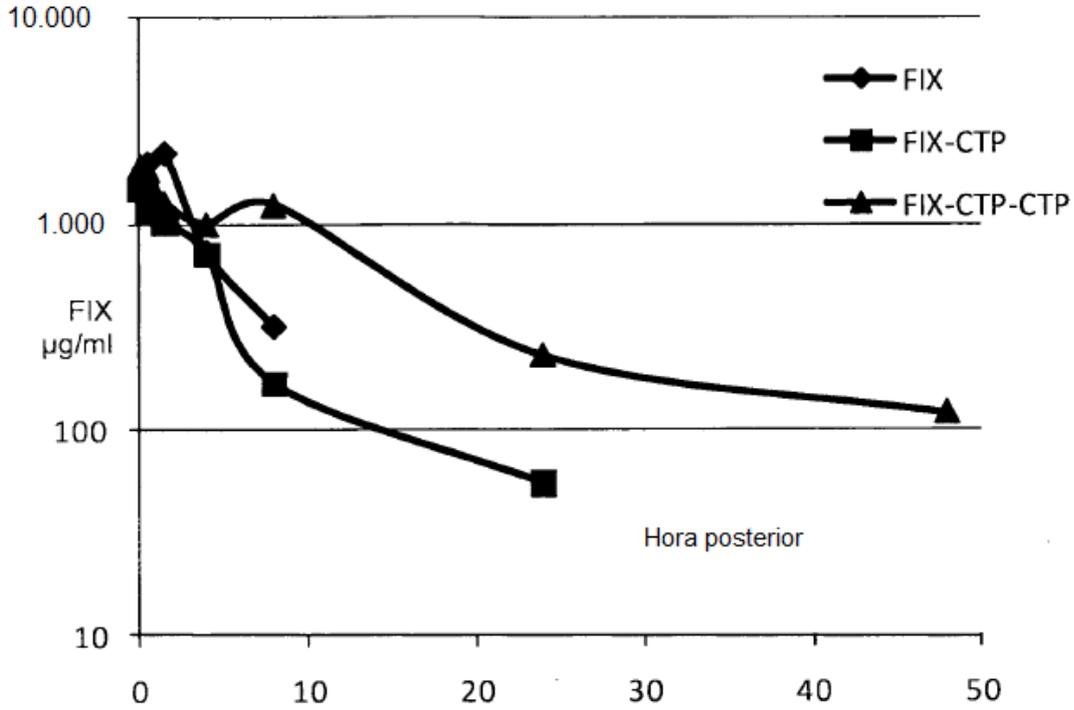


FIGURA 6

Nivel de antígeno FIX

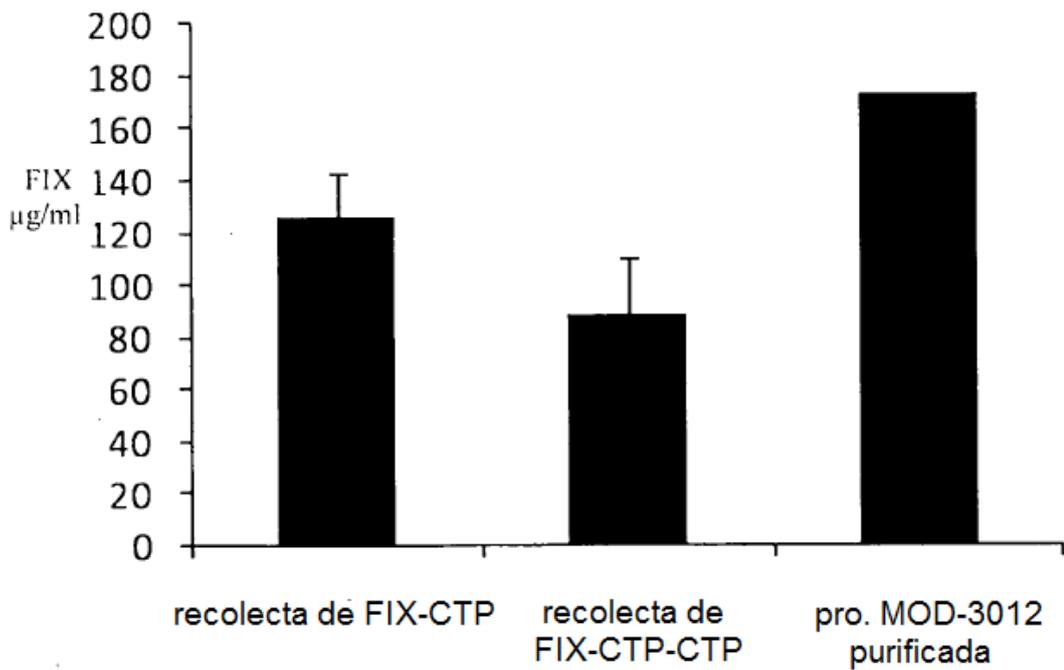


FIGURA 7

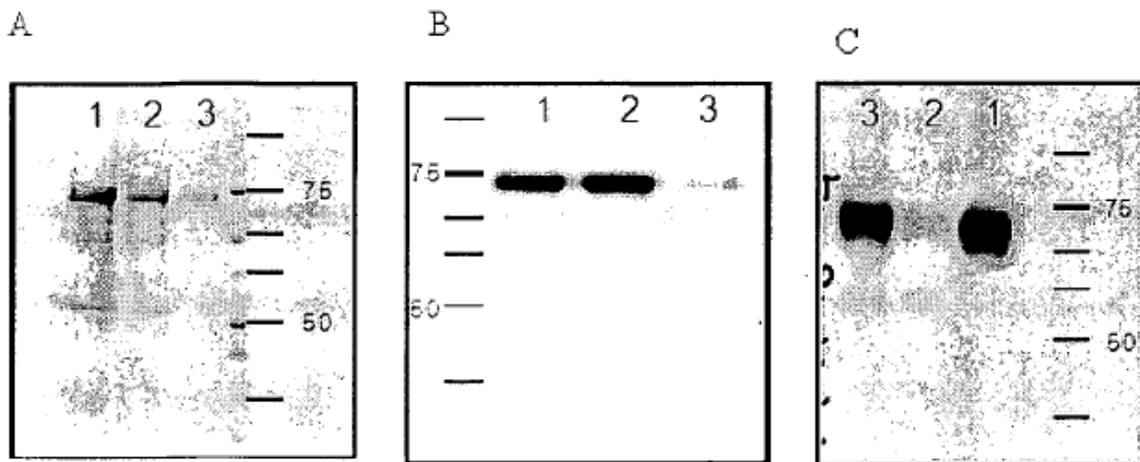


FIGURA 8

Actividad cromogénica del Factor IX

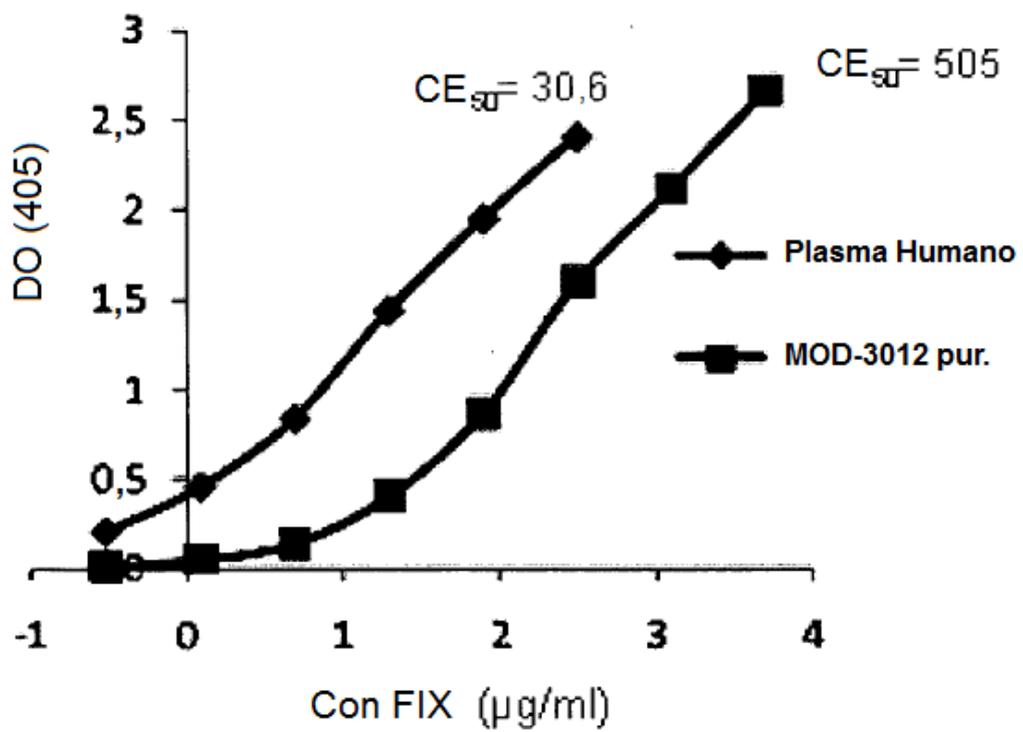


FIGURA 9

Actividad de coagulación comparativa de FIX

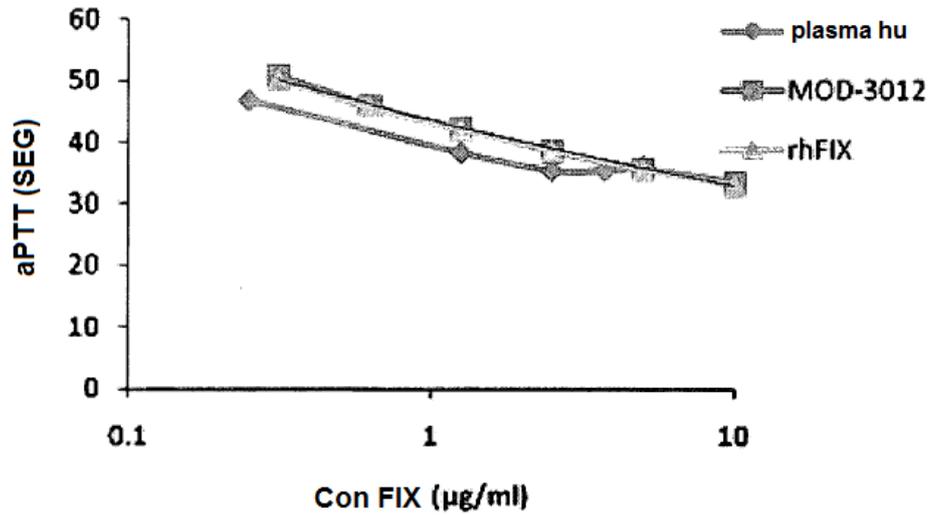


FIGURA 10

Perfil de PK comparativo de FIX

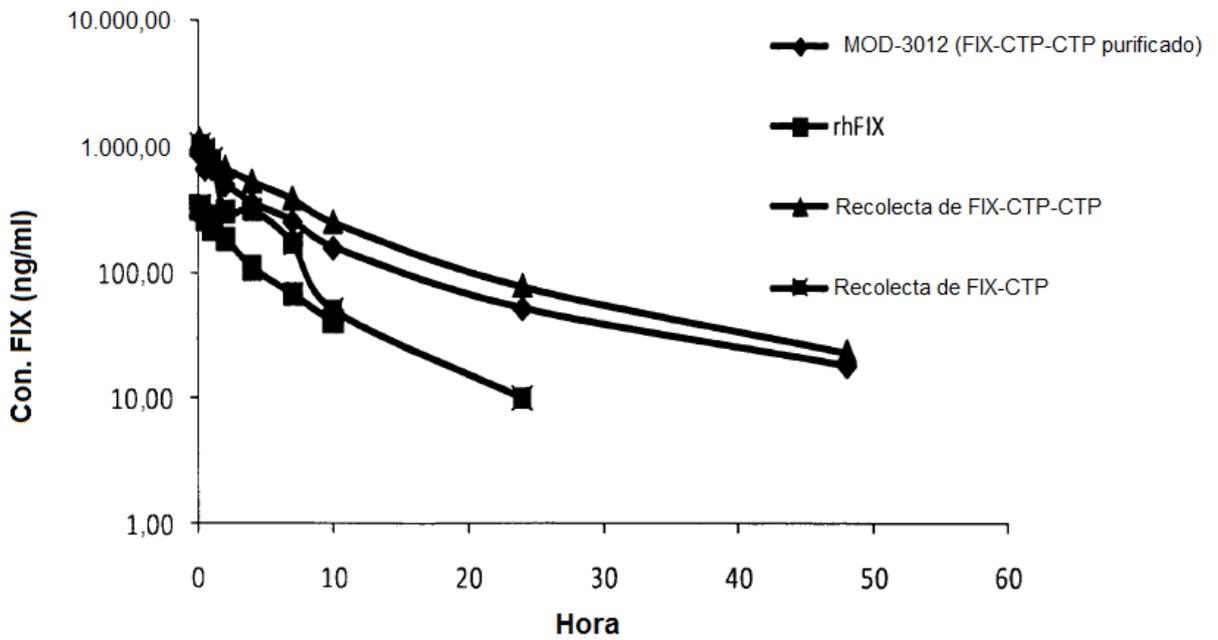


FIGURA 11