

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 319**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/36** (2006.01)

**A61K 38/24** (2006.01)

**C07K 14/475** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

**C07K 14/755** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2013 PCT/IL2013/050107**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13121416**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2013 E 13749077 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2822576**

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

30 Prioridad:

**14.02.2012 US 201213372540**

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

**25.04.2018**

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:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

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

ES 2 665 319 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

## 5 Campo de la invención

Se describen polipéptidos que comprenden al menos un péptido del carboxilo terminal (CTP) de la gonadotropina coriónica unido al carboxilo terminal de un factor de coagulación, y polinucleótidos que codifican los mismos. Se describen, además, composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos y polinucleótidos de la invención, métodos para producir las mismas, y los usos médicos de estas.

Antecedentes de la invención

El desarrollo de la terapia de reemplazo con factores de coagulación ha transformado las vidas de muchos individuos con hemofilia. La hemofilia es un grupo de trastornos genéticos hereditarios que deteriora la capacidad del cuerpo para controlar la formación de coágulos o coagulación de la sangre. Los pacientes con hemofilia no producen cantidades adecuadas de proteínas del Factor VIII o el Factor IX, que son necesarias para una eficaz coagulación de la sangre. En los pacientes hemofílicos graves incluso una lesión pequeña puede dar como resultado una pérdida de sangre que se prolonga durante días o semanas, y puede no ocurrir la curación completa, lo que conduce a un posible daño permanente y debilitante de las articulaciones y otros órganos, y a la muerte prematura.

Un tipo de hemofilia, la hemofilia B, es un trastorno hemorrágico unido al cromosoma X provocado por una mutación en el gen del Factor IX (FIX), que resulta en una deficiencia de la actividad procoagulante del FIX. Los pacientes con hemofilia B tienen hemorragias espontáneas en el tejido blando y hemartrosis recurrentes que frecuentemente conducen a una artropatía paralizante. El tratamiento actual para estos pacientes incluye una administración intravenosa del FIX recombinante. Sin embargo los aspectos de costo y aclaramiento relativamente rápido del FIX de la circulación hacen que el desarrollo de un FIX de acción prolongada sea una tarea desafiante.

La disponibilidad comercial del FVIII y el FIX ha conducido a un mejor control de los episodios de hemorragias con peligro para la vida. Muchos pacientes reciben terapia profiláctica, que reduce el riesgo de hemorragia y sus complicaciones asociadas. Sin embargo, una proporción significativa de pacientes (10-30 %) desarrollan anticuerpos inhibitorios contra FVIII y FIX administrados de manera exógena. La administración del FVIIa, que es un producto de derivación, puede inducir homeostasis y proporcionar un tratamiento eficaz para los pacientes con Ac inhibitorios.

El FVIIa recombinante (NovoSeven®) está disponible comercialmente y se aprobó en 1996 para el tratamiento de episodios de hemorragia en los pacientes de hemofilia con inhibidores. Sin embargo, el rFVIIa se aclara rápidamente con un tiempo de vida media terminal de 2,5 horas. Como resultado, los pacientes generalmente requieren infusiones múltiples y frecuentes (2-3 dosis administradas en intervalos de 2-3 horas) para lograr la homeostasis adecuada después de un sangrado ligero a moderado. En consecuencia, existe mucho interés en el desarrollo de una forma de acción prolongada del FVIIa que prolongaría la duración de la actividad hemostática después de una dosis única y permitiría una dosificación mucho menos frecuente. Un FVIIa de acción prolongada aumentaría, además, la factibilidad de una terapia profiláctica a largo plazo.

Actualmente se desarrollan diversas tecnologías para prolongar el tiempo de vida media del FVIIa. Sin embargo, el reto es lograr una prolongación del tiempo de vida media de esta proteína a la vez que se conserve su actividad biológica y asegurar que las modificaciones no induzcan una inmunogenicidad significativa.

Fares y otros, (1992) PNAS 89: 4304-4308, describen la fusión de 1 o 2 copias del péptido C-terminal (CTP) de la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica (CG $\beta$ ) a la subunidad  $\beta$  de la folitropina. Fares y otros señalaron que el enfoque descrito allí "requiere que el sitio activo no esté en el extremo carboxilo de la molécula". Fares y otros no mencionan a los factores de coagulación modificados con CTP.

Fares y otros, (2010) Endocrinology 151(9):4410-4412, describen la fusión del péptido del carboxilo terminal (CTP) de la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica humana (hCG) a una hormona de crecimiento en patrones estructurales que incluyen unir unidades de CTP al extremo N-terminal de la hormona de crecimiento. Fares y otros no mencionan a los factores de coagulación modificados con CTP.

Fares y otros, (2011) International J. Cell Bio. 9(11): 2021-2027, describen la fusión de CTP a la eritropoyetina en patrones estructurales que incluyen unir péptidos del carboxilo terminal (CTP) de unidades de la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica humana a la secuencia codificante de la eritropoyetina (EPO). Por ejemplo, Fares y otros describen una EPO modificada con CTP que tiene un CTP unido al extremo N-terminal de la EPO y dos CTP unidos al extremo C-terminal de la EPO. Fares y otros no mencionan a los factores de coagulación modificados con CTP.

El documento WO 93/06844 describe la "extensión en tándem con el péptido del carboxilo terminal (CTP) de la gonadotropina coriónica humana". Por ejemplo, el documento WO 93/06844 describe el aumento de la estabilidad

biológica de la hormona foliculoestimulante (FSH) que contiene la extensión de dos unidades de CTP C-terminal de su subunidad  $\beta$ . El documento WO 93/06844 no menciona a los factores de coagulación modificados con CTP.

5 Konterman (2011) Current Opinion in Biotechnology 22(6):868-876, proporciona una revisión de los métodos para prolongar el tiempo de vida media en suero de los agentes terapéuticos proteicos. Konterman enumera métodos que incluyen PEGilación, N-glicosilación, fusión de la albúmina a una proteína diana, y fusión de la porción Fc de un anticuerpo a una proteína diana. Konterman no describe la unión de péptidos del carboxilo terminal (CTP) a una proteína o péptido de interés.

10 La solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2010/0317585 se refiere a un género de factores de coagulación modificados que se modifican por la presencia de uno a cinco CTP de gonadotropina unidos al extremo C-terminal.

#### Resumen de la invención

15 La invención proporciona un factor de coagulación modificado con el péptido del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP), que consiste en un factor de coagulación y tres CTP unidos al carboxilo terminal de dicho factor de coagulación, en donde dicho factor de coagulación modificado con CTP es:

un polipéptido del factor IX (FIX) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31 o de los aminoácidos 47-545 de la sec. con núm. de ident.: 31;

20 un polipéptido del factor VII (FVII) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 25 o de los aminoácidos 39-528 de la sec. con núm. de ident.: 25; o

un factor VIIa activado (FVIIa) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 39-528 de la sec. con núm. de ident.: 25.

25 En una modalidad, al menos un CTP está glicosilado.

En otra modalidad, el factor de coagulación modificado con CTP es un polipéptido del FIX modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31 o de los aminoácidos 47-545 de la sec. con núm. de ident.: 31.

30 En otra modalidad, el factor de coagulación modificado con CTP es un polipéptido del FVII modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 25 o de los aminoácidos 39-528 de la sec. con núm. de ident.: 25, o en donde el factor de coagulación modificado con CTP es un FVIIa modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 39-528 de la sec. con núm. de ident.: 25.

35 En otra modalidad, la invención proporciona un polinucleótido que codifica al factor de coagulación modificado con CTP. En otra modalidad, la secuencia de ácido nucleico de dicho polinucleótido es como se expone en la sec. con núm. de ident.: 30. En otra modalidad, la secuencia de ácido nucleico de dicho polinucleótido es como se expone en la sec. con núm. de ident.: 24.

40 En una modalidad, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el factor de coagulación modificado con CTP, o el polinucleótido, y un portador farmacéuticamente aceptable.

45 En otra modalidad, la invención proporciona el factor de coagulación modificado con CTP o la composición farmacéutica, para usar como un medicamento.

50 En otra modalidad, la invención proporciona el factor de coagulación modificado con CTP o la composición farmacéutica, para usar en la prevención o el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre o de la formación de coágulos en un sujeto. En una modalidad, el trastorno de coagulación de la sangre o de formación de coágulos es la hemofilia.

55 En otra modalidad, la invención proporciona el factor de coagulación modificado con CTP o la composición farmacéutica, para usar en la prevención o el tratamiento de un trastorno de coagulación de la sangre o de formación de coágulos en un sujeto mediante administración subcutánea.

En otra modalidad de la invención, el sujeto es un niño.

60 En una modalidad, la invención proporciona un método para prolongar el tiempo de vida media biológica de un factor de coagulación, el método comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FIX, o comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FVII o FVIIa, para producir así un factor de coagulación modificado con CTP en donde el factor de coagulación tiene un tiempo de vida media biológica prolongado.

65 En otra modalidad, la invención proporciona un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) de un factor de coagulación, el método comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica

(CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FIX, o comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FVII o FVIIa, para producir así un factor de coagulación modificado con CTP en donde el factor de coagulación tiene una área bajo la curva (AUC) mejorada.

5 En otra modalidad, la invención proporciona un método para reducir la frecuencia de dosificación de un factor de coagulación, el método comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FIX, o comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FVII o FVIIa, para producir  
10 así un factor de coagulación modificado con CTP en donde el factor de coagulación tiene una reducción de la frecuencia de dosificación.

15 En otra modalidad, la invención proporciona un método para reducir la velocidad de aclaramiento de un factor de coagulación, el método comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FIX, o comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FVII o FVIIa en donde el factor de coagulación tiene una reducción de la velocidad de aclaramiento.

20 En otra modalidad, la invención proporciona un método para producir el factor de coagulación modificado con CTP que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FIX, o comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FVII o del FVIIa, para producir así el factor de coagulación modificado con CTP.

25 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, ejemplos y figuras. Debe comprenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos aunque indican modalidades preferidas de la invención se proporcionan a manera de ilustración solamente, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

30 Breve descripción de las figuras

35 Figura 1A. Presenta un gráfico de barras que muestra las células de cosechas limitadas, diluidas, transfectadas y seleccionadas con variantes de FIX-CTP y FIX-CTP-CTP en presencia de vitamina K3 a 5 µg/ml. El nivel de FIX se cuantificó mediante el uso del estuche de ELISA para el FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. núm. FIX-AG RUO), y la concentración de proteínas calculada (µg/ml) es el promedio de dos ejecuciones independientes. La Figura 1B muestra fotomicrografías de un gel de SDS-PAGE del reconocimiento con Ac para FIX; la fotomicrografía A representa el reconocimiento de un anticuerpo anti-FIX en una transferencia Western; la fotomicrografía B representa el reconocimiento de un anticuerpo anti-y carboxilación en una 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 cosechas de FIX-CTP. El carril 3 en A-B se cargó con una muestra que contenía una cosecha de FIX-(CTP)<sub>2</sub>.

45 Figura 2. Presenta un gráfico que muestra la actividad cromogénica comparativa de cosechas de FIX-CTP y FIX-(CTP)<sub>2</sub> (medida mediante la concentración EC<sub>50</sub>.) en comparación con rhFIX (American Diagnostics).

Figura 3. Presenta un gráfico que muestra el perfil PK de rhFIX, de la cosecha de FIX-CTP-CTP y de la cosecha de FIX-CTP.

50 Figura 4. Presenta un gráfico de barras que muestra el nivel del antígeno FIX en las cosechas de FIX-CTP y las cosechas de FIX-CTP-CTP y la proteína purificada FIX-CTP-CTP según se determinó mediante el uso del estuche de ELISA para el FIX humano (Affinity Biologicals; cat. núm. FIX-AG RUO). La concentración de proteínas calculada (µg/ml) es el promedio de dos ejecuciones independientes.

55 Figura 5. Muestra fotomicrografías de geles de SDS-PAGE del reconocimiento con Ac para FIX. La fotomicrografía A representa una tinción con azul de Coomassie; la fotomicrografía B representa el reconocimiento de un anticuerpo anti-FIX en una transferencia Western; la fotomicrografía C representa el reconocimiento de un anticuerpo anti-y carboxilación en una transferencia Western. El carril 1 en A-C se cargó con una muestra que contenía FIX-(CTP)<sub>2</sub>. El carril 2 en A-C se cargó con una muestra que contenía FIX-(CTP)<sub>2</sub> no unido. El carril 3 en A-C se cargó con una muestra que contenía un a elución concentrada de FIX-(CTP)<sub>2</sub>.

60 Figura 6. Presenta un gráfico que muestra la actividad cromogénica de FIX-(CTP)<sub>2</sub> (concentración de la muestra/D.O.) en comparación con el plasma mezclado normal humano y rhFIX (American Diagnostics).

65 Figura 7. Presenta un gráfico que muestra el perfil PK de FIX-CTP-CTP purificado, rhFIX, cosecha de FIX-CTP-CTP, y cosecha de FIX-CTP.

- 5      Figura 8. Muestra transferencias Western con anticuerpos anti-CTP y anti-gamma carboxilación del FIX fusionado a tres, cuatro o cinco CTP. Las cosechas de FIX-CTP<sub>3</sub>, FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub> se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante inmunotransferencia Western con el uso del Ac policlonal anti-CTP (Adar Biotech Production) o Ac anti-Gla (American Diagnostica).
- 10     Figura 9. Muestra una detección con azul de Coomassie de FIX-CTP<sub>3</sub>, FIX-CTP<sub>4</sub>, y FIX-CTP<sub>5</sub>. Después de un proceso de purificación con la utilización de una columna de jacalina (purificación por inmunofinidad de las proteínas glicosiladas), FIX-CTP<sub>3</sub>, FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub> se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El gel de SDS-PAGE se tiñó mediante el colorante azul de Coomassie para la detección de las muestras.
- 15     Figura 10. Muestra la actividad cromogénica del FIX. Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de FIX-CTP<sub>3</sub>, FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub> completamente purificados (columna HA) frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica, que está disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). Todas las muestras se diluyeron en serie y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia que consistió en plasma normal humano.
- 20     Figura 11. Muestra el perfil farmacocinético (PK) comparativo de FIX-CTP<sub>3</sub>, FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub>. La concentración del FIX en las muestras de plasma se cuantificó mediante el uso de estuches de Elisa para FIX humano (Affinity Biologicals). Se calculó el perfil farmacocinético y es la media de 3 animales en cada punto de tiempo. Los tiempos de vida media terminal se calcularon mediante el uso del programa informático PK Solutions 2.0.
- 25     Figura 12. Muestra el análisis de FIX-CTP<sub>3</sub> por SDS-PAGE - Coomassie SDS-PAGE. La proteína enriquecida  $\gamma$ -carboxilada FIX-CTP<sub>3</sub>, rFIX y rFIXa (FIX activado) se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis del SDS-PAGE y Coomassie se realizó mediante la tinción del gel con el reactivo azul de Commasie (800 ng de proteína) (figura 12A). Se realizó una inmunotransferencia Western mediante el uso de 100 ng de proteína con Ac policlonal anti-FIX humano (figura 12B), anticuerpo monoclonal anti-gamma carboxilación humana (American Diagnostics Cat #499, 3570) (figura 12C), Ac policlonal anti-propéptido de FIX (figura 12D), y Ac policlonal anti-CTP (figura 12E).
- 30     Figura 13: Muestra la actividad cromogénica de FIX-CTP<sub>3</sub>. Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de la cosecha de FIX-CTP<sub>3</sub> y de la proteína enriquecida  $\gamma$ -carboxilada FIX-CTP<sub>3</sub>, frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica, disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). La cosecha de FIX-CTP<sub>3</sub> y la proteína se diluyeron en serie, y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia que consistió en plasma normal humano.
- 35     Figura 14: Muestra el tiempo de coagulación de manera comparativa. Se realizó un ensayo de aPTT (tiempo de trombina parcial activada) *in vitro* que comparó la actividad de coagulación del FIX-CTP<sub>3</sub> con BeneFIX. Las proteínas se diluyeron en serie y se adicionaron al plasma agotado de FIX humano, y se evaluó el tiempo de coagulación.
- 40     Figura 15. Muestra el perfil PK comparativo de FIX-CTP<sub>3</sub>. La concentración del FIX se cuantificó mediante el uso de estuches de ELISA para FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO). El perfil farmacocinético se calculó para cada proteína y es la media de 3 animales en cada punto de tiempo.
- 45     Figura 16. Muestra los parámetros del perfil de actividad. En paralelo al muestreo de PK, los animales deficientes del FIX administrados con BeneFIX® o FIX-CTP<sub>3</sub>, las muestras plasmáticas citratadas, se evaluaron en cuanto a su actividad de coagulación mediante el ensayo de aPTT, que se tradujo a % de actividad. El % de actividad en cada punto de muestreo se calculó como el tiempo de coagulación actual/tiempo de coagulación del plasma mezclado de ratones normales \* 100.
- 50     Figura 17. Muestra los parámetros de un primer reto de sangrado. Los ratones deficientes de FIX se administraron con una única inyección intravenosa de 100 UI/Kg de BeneFIX® o rFIX-CTP<sub>3</sub>. La vena de la cola se comprimió ligeramente 48 horas después de la dosificación y se evaluaron el tiempo de sangrado por la vena de la cola (TVBT) y la intensidad del sangrado (DO de hemoglobina). Un segundo reto de sangrado se realizó 15 minutos después de alcanzar la homeostasis, y se midieron los mismos parámetros.
- 55     Figura 18. Muestra los parámetros de un segundo reto de sangrado. Una vez que el primer sangrado descrito en la leyenda de la figura 19 se detuvo espontánea o manualmente, un segundo reto de sangrado se realizó 15 minutos después del primero, y se volvieron a medir el tiempo y la intensidad del sangrado.
- 60     Figura 19. Muestra un diagrama que ilustra la construcción de rFVII-CTP (A), la construcción de rFVII-CTP-CTP (B), la construcción de rFIX-CTP (C), y la construcción de rFIX-CTP-CTP (D).
- 65

Figura 20A. Presenta un gráfico de barras que muestra cosechas de células limitadas diluidas transfectadas con clones y seleccionadas con variantes de FVII-CTP en presencia de vitamina K3 a 5 µg/ml. El nivel de FVII se cuantificó mediante el uso de ELISA para FVII (AssayPro).

5 Figura 20B. Presenta un gráfico de barras que muestra cosechas de células limitadas, diluidas, transfectadas y seleccionadas con variantes de FVII-CTP en presencia de 5 µg de vitamina K3. La actividad de FVII se cuantificó mediante el uso de un ensayo de actividad cromogénica de FVII (AssayPro).

10 Figura 20C. Presenta un gráfico de barras que muestra cosechas de células limitadas diluidas transfectadas y seleccionadas con variantes de FVII-CTP en presencia de 5 µg de vitamina K3. La actividad específica del FVII se calculó para cada versión mediante la división del valor de la actividad por la concentración de FVII de la cosecha.

Figura 20D. Presenta un gráfico que muestra el perfil PK de FVII, las cosechas de FVII-CTP-CTP y FVII-CTP.

15 Figura 21. Muestra transferencias Western del FVII fusionado a tres, cuatro y cinco CTP, detectado mediante el uso de anticuerpos anti-FVII, anti-CTP y anti-gamma carboxilación. Las cosechas de FVII-CTP<sub>3</sub>, FVII-CTP<sub>4</sub>, y FVII-CTP<sub>5</sub> se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % (*expedon*) mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante inmunotransferencia Western con el uso de Ac anti-FVII, Ac policlonal anti-CTP (Adar Biotech Production) o Ac anti-Gla (American Diagnostica).

20 Figura 22. Muestra la actividad de FVII - actividad cromogénica. Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de FVII-CTP<sub>3</sub>, FVII-CTP<sub>4</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> purificados en HA (fracción altamente gamma carboxilada) frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica, disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). Todas las muestras se diluyeron en serie y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia que consistió en plasma normal humano.

25 Figura 23. Muestra un primer perfil farmacocinético (PK) comparativo-FVII 3, 4 y 5 CTP. FVII-CTP<sub>3</sub>, FVII-CTP<sub>4</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> (grupos A, B y C, respectivamente) se administraron en una única inyección intravenosa a las ratas Sprague Dawley (seis ratas por tratamiento) en una dosis de 250 µg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 3 ratas alternativamente a las 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72 y 96 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. FVII-CTP<sub>5</sub> demostró un perfil superior en comparación con las otras dos versiones.

30 Figura 24. Muestra un segundo perfil PK comparativo-FVII 3, 4 y 5 CTP. FVII-CTP<sub>3</sub>, FVII-CTP<sub>4</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> después de la selección del FVII y el proceso de purificación en HA (grupos A, B y C, respectivamente) se administraron en una única inyección intravenosa a las ratas Sprague Dawley (tres ratas por sustancia) en una dosis de 29,45 µg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital a las 0,083, 0,5, 2, 8, 24, 48 y 72 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Figura 25. Muestra un diagrama esquemático del proceso de purificación de FVII-CTP<sub>3</sub>. El lote 31 se produjo para el estudio de PK/PD. El lote 38 se produjo para el estudio de supervivencia.

35 Figura 26. Muestra un SDS -PAGE y transferencia Western de FVII Final y FVIIa. Se cargaron 10 µg (lote 31) o 5 µg (lote 38) en cada carril de SDS-PAGE teñido con Coomassie. Se cargó 1 µg de proteína en cada carril de la transferencia Western. 1. Polipéptido FVII-CTP<sub>3</sub>; 2. Cadena pesada, que incluye 3x CTP; 3. Cadena ligera. Los tres anticuerpos detectaron FVII. La cadena pesada de FVIIa se detectó mediante α-CTP, y la cadena ligera se detecta tanto con α-FVII como con α-Gla.

40 Figura 27. Muestra que la actividad cromogénica de FVII-CTP<sub>3</sub> aumenta como resultado de la purificación en una columna de hidroxapatita (HA) cerámica. Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de la cosecha de FVII-CTP<sub>3</sub>, de las fracciones durante el proceso, y del FVII-CTP<sub>3</sub> purificado frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica, disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). La cosecha de FVII-CTP<sub>3</sub> y la proteína se diluyeron en serie y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia de plasma normal humano.

45 Figura 28. Muestra el perfil PK de FVIIa-CTP<sub>3</sub> frente a NovoSeven® en ratones deficientes de FVIII. FVIIa-CTP<sub>3</sub> se produjo después de la selección de FVII, el proceso de purificación en HA y la activación. FVIIa-CTP<sub>3</sub> o NovoSeven® se administró en una única inyección intravenosa a los ratones hemofílicos FVIII<sup>-/-</sup>. Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital a las 0,083, 0,5, 2, 8, 24, 48 y 72 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis, y se estableció un perfil PK basado en la actividad de coagulación del FVIIa mediante el uso de un estuche comercial STACLOT.

Figura 29. Muestra que se produjo FVIIa-CTP<sub>3</sub> después de la selección de FVII, el proceso de purificación en HA y la activación. FVIIa-CTP<sub>3</sub> o NovoSeven® se administró en una única inyección intravenosa a los ratones hemofílicos FVIII-/- . Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital a las 0,083, 0,5, 2, 8, 24, 48 y 72 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. Los parámetros de generación de trombina se evaluaron durante el experimento de PK, y se evaluaron parámetros como la cantidad máxima hasta el pico, la cantidad de trombina hasta un punto de tiempo y la velocidad de generación de trombina.

Figura 30. Muestra las curvas de supervivencia de los ratones hemofílicos después del corte de la vena de la cola (TVT). El TVT se realizó (A) a los 15 min, (B) 24 horas o (C) 48 horas después de la administración. La supervivencia de los ratones se observó durante 24 horas después del TVT y se registró en cada hora durante las primeras 12 horas, y después de 24 horas. La Figura 33D resume la supervivencia de los ratones según se registró 24 horas después del TVT. Los datos del grupo control (vehículo) es la suma de los 3 experimentos con 5 ratones/experimento.

Figura 31. Muestra las inmunotransferencias de FVII - 3- CTP y FVII- 5 CTP. A) con transferencia para GLA. B) con transferencia para FVIIa. C) con transferencia para CTP.

Figura 32. Muestra un perfil PK comparativo-FVII 3 y 5 CTP- a partir de la purificación en columna Select y HA (FVIIS frente a FVII HA).

Figura 33. Muestra un perfil PK comparativo-FVII 3 y 5 CTP-El segundo estudio (IV frente a SC).

Figura 34. Muestra las curvas de supervivencia de los ratones hemofílicos después del corte de la vena de la cola (TVT). El TVT se realizó 12 horas después de la administración SC. La supervivencia de los ratones se observó durante 24 horas después del TVT y se registró en cada hora durante las primeras 12 horas, y después de 24 horas.

Figura 35. Muestra el perfil PK de MOD-5014 frente a NovoSeven® después de la administración IV o SC. A) muestra la administración IV; B) muestra la administración SC.

Figura 36. Muestra el perfil PK de MOD-5014 (Clon 61 #75, #81) frente a NovoSeven® después de una sola administración SC.

#### Descripción detallada de la invención

En una modalidad, la presente invención proporciona factores de coagulación de acción prolongada y métodos para producir y usar los mismos. Los factores de coagulación de acción prolongada comprenden tres péptidos del carboxilo terminal (CTP, referidos además como unidades CTP) de la gonadotropina coriónica humana (hCG). En otra modalidad, el CTP actúa como un protector contra la degradación de un factor de coagulación. En otra modalidad, el CTP aumenta la C<sub>máx</sub> de un factor de coagulación. En otra modalidad, el CTP aumenta el T<sub>máx</sub> de un factor de coagulación. En otra modalidad, el CTP aumenta el tiempo de vida media en circulación de un factor de coagulación. Se describe que los CTP mejoran la potencia de los factores de coagulación.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para prolongar el tiempo de vida media biológica de un factor de coagulación, que comprende la etapa de unir tres CTP al carboxilo terminal del factor de coagulación, para prolongar así el tiempo de vida media biológica del factor de coagulación. En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para prolongar el tiempo de vida media en circulación de un factor de coagulación. En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para aumentar el tiempo de vida media de un factor de coagulación. En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para prolongar el tiempo de vida media de un factor de coagulación.

El factor de coagulación VII (FVII) es una glicoproteína de 444 aminoácidos (50 KDa) secretada por los hepatocitos al torrente sanguíneo como una proenzima inactiva. Tras un daño tisular y exposición a la sangre circulante, el FVII forma un complejo con el factor tisular (TF) que es una verdadera proteína receptora del FVII y se expresa por diversas células localizadas en las capas más profundas de la pared del vaso. La formación de este complejo FVII-TF conduce a la activación del FVII. El FVII activado (FVIIa) inicia la vía de coagulación extrínseca mediante la activación del Factor IX y el Factor X.

FVII pertenece a un grupo de glicoproteínas dependientes de la vitamina K, asociadas con el sistema de coagulación. Además del FVII, este grupo consiste en el Factor IX, el Factor X, la Proteína C y la protrombina. Estas proteínas tienen similares organizaciones de los dominios y se sintetizan como precursores con un propéptido N-terminal seguido por una secuencia de aminoácidos madura. El propéptido contiene un sitio de entrada para la gammacarboxilasa que convierte ácidos glutámicos (Glu) en ácidos gamma carboxi glutámicos (Gla). Este dominio es seguido por dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF), una región de conexión (CR) y un dominio C-terminal de serina proteasa. Antes de la secreción, el propéptido del FVII se escinde para formar una glicoproteína del FVII, zimógeno monocaténario de 406 aminoácidos. Después de la secreción, la proteína puede

activarse como un heterodímero de dos cadenas unidas por enlaces disulfuro, FVIIa, mediante escisión en la CR. La concentración plasmática del FVII es 10 nM y aproximadamente el 1 % circula en la forma activa en los individuos saludables.

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

10 El FIX se secreta como una molécula monocatenaria que experimenta complejas modificaciones postranscripcionales, muchas de las cuales son críticas para sus propiedades bioquímicas y farmacocinéticas. Entre todas las modificaciones postranscripcionales, 12 residuos de ácido glutámico cerca del amino terminal del FIX que se gamma carboxilan mediante la gamma carboxilasa dependiente de la vitamina K son las más cruciales. La carboxilación es necesaria para la interacción del FIX con las superficies fosfolipídicas y para una actividad óptima  
15 del FIX. El propéptido amino terminal sirve como un sitio de reconocimiento para la gamma carboxilasa y por lo tanto, después de la gamma carboxilación, se escinde por la serina proteasa del aparato de Golgi conocida como enzima de escisión de aminoácidos básicos apareados (PACE/Furina). Otras cuatro modificaciones postranscripcionales podrían ocurrir en el aparato de Golgi: sulfación de la tirosina 155, fosforilación de la serina 158, O-glicosilación en Ser 63 y en 61 y finalmente, N-glicosilación en Asn 157 y 16, pero se demostró que no son  
20 necesarias para la actividad adecuada del FIX.

El FIX circula en el plasma (concentración promedio de 5 µg/ml) como un zimógeno inactivo monocatenario. Tras la escisión proteolítica en dos enlaces peptídicos: Arg 145 y Arg 180 mediante uno o dos activadores fisiológicos, el complejo FVIIa-TF o FIXa, el péptido de activación se elimina, lo que convierte al FIX en una enzima completamente  
25 activa que consiste en una cadena ligera y pesada que se mantienen unidas mediante un único enlace disulfuro. La cadena ligera N-terminal contiene el ácido gamma carboxiglutamato no catalítico (Gla) y dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico, mientras que la cadena pesada C-terminal contiene el dominio catalítico de la molécula, similar a la tripsina. El FIXa solo se caracteriza por poca actividad catalítica. Sin embargo cuando está en forma de complejos con FVIII, su actividad proteolítica aumenta en 4-5 órdenes de magnitud hacia su sustrato  
30 natural FX.

En otra modalidad, en la presente se proporciona un método para prolongar el tiempo de vida media biológica o mejorar el área bajo la curva (AUC) de un factor de coagulación, que comprende la etapa de unir tres CTP al carboxilo terminal del factor de coagulación, para prolongar así el tiempo de vida media biológica o mejorar el AUC  
35 del factor de coagulación. En otra modalidad, en la presente se proporciona un método para prolongar el tiempo de vida media biológica o un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) del FIX, que comprende la etapa de unir tres CTP al carboxilo terminal del FIX, para prolongar así el tiempo de vida media biológica o mejorar el AUC del FIX. En otra modalidad, en la presente se proporciona un método para prolongar el tiempo de vida media biológica o un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) del FVII o FVIIa, que comprende la etapa de unir tres CTP al carboxilo terminal del FVII o FVIIa, para prolongar así el tiempo de vida media biológica o mejorar el AUC del FVII o  
40 FVIIa.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para prolongar el tiempo de vida media biológica de un polipéptido del factor IX (FIX), que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX, para prolongar así el tiempo de vida  
45 media biológica de dicho polipéptido del FIX. En otra modalidad, la presente invención proporciona además un método para prolongar el tiempo de vida media biológica de un polipéptido del factor VIIa (FVIIa), que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa, para prolongar así el tiempo de vida media biológica de dicho polipéptido de FVIIa.  
50

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) de un polipéptido del factor IX (FIX), que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX, para mejorar así el AUC de dicho polipéptido del FIX. En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para mejorar el área bajo la  
55 curva (AUC) de un polipéptido del factor VIIa (FVIIa), que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa, para mejorar así el AUC de dicho polipéptido de FVIIa.

En otra modalidad, un factor de coagulación de la invención es una proteína. En otra modalidad, un factor de coagulación de la invención es un péptido. En otra modalidad, un factor de coagulación de la invención es un polipéptido. En otra modalidad, el factor de coagulación es una enzima. Se describe que el factor de coagulación es una serina proteasa. Se describe que el factor de coagulación es una glicoproteína. Se describe que el factor de coagulación es una transglutaminasa. Se describe que el factor de coagulación es un zimógeno inactivo.  
60

65 En una modalidad, el factor de coagulación es el Factor VIIa (FVIIa). En otra modalidad, el factor de coagulación es

el Factor VII (FVII). En otra modalidad, el factor de coagulación es el Factor IX (FIX). En otra modalidad, el factor de coagulación es el Factor IXa (FIXa).

En una modalidad de la invención, el factor de coagulación es una glicoproteína. Se describe que el factor de coagulación es una glicoproteína dependiente de la vitamina K.

5 En otra modalidad de la invención, el factor de coagulación es una proteína recombinante. En otra modalidad de la invención, el factor de coagulación es una glicoproteína recombinante. En otra modalidad, el factor de coagulación comprende un péptido señal.

10 En otra modalidad de la invención, el factor de coagulación comprende tres repeticiones de CTP unidas al extremo C-terminal y sin CTP unidos al extremo N-terminal.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido del factor IX (FIX) modificado con CTP que consiste en un polipéptido del FIX y tres péptidos del carboxilo terminal (CTP) de la gonadotropina, unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX modificado con CTP.

15 En otra modalidad, la presente invención proporciona además un polipéptido del factor VIIa (FVIIa) modificado con CTP que consiste en un polipéptido de FVIIa y tres péptidos del carboxilo terminal (CTP) de la gonadotropina, unidos al carboxilo terminal de dicho FVIIa.

20 En otra modalidad, el factor de coagulación se sintetiza como un precursor con un propéptido N-terminal. En otra modalidad, el factor de coagulación como se usa en la presente está en una forma proenzimática inactiva. En otra modalidad, el factor de coagulación se produce en hepatocitos. En otra modalidad, el factor de coagulación comprende un sitio de entrada para la gammacarboxilasa que convierte ácidos glutámicos (Glu) en ácidos gamma carboxi glutámicos (Gla). En otra modalidad, el factor de coagulación como se usa en la presente es un factor de coagulación disponible comercialmente.

25 En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor VII comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

30

```

ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgcctctgcttgggcttcagggctgctgctgcatcttcgtaaccaggag
gaagcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgcccaacgcgttctggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcc
aaggaggagcagtgctcctcagaggggccgggagatctcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttcttacagtgat
ggggaccagtgtgcctcaagtcacccaagaatggggctcctgaaggaccagctccagctctatactgcttctgctccctgccttc
gagggccggaaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgactgtgtgaaacgagaacggcgctgtgagcagctactgagtgacca
cacgggcaccaagcgtcctgctcgtggtgccacgaggggtactctctgctggcagacgggggtgctctgcaccccacagttgaaatcc
atgtggaaaaatacctattctagaaaaaagaatgccagcaaacccaaggccgaattgtggggggcaaggtgtgccccaaagggg
agtgtccatggcaggtcctgttgttggatggagctcagttgttggggggaccctgatcaacaccatctgggtggtctccggggcc
cactgtttcgacaaaatcaagaactggaggaaactgatcgcgggtgctgggcgagcacgacctcagcgagcacgacggggatgagca
gagccggcgggtggcgcaggtcatcatcccagcagctacgtcccgggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgctgcac
cagcccgtggtcctcactgaccatgtggtgcccctctgctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttcgtgccttctc
attgtcagcgggctggggccagctgctggaccgtggcggccacggccctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgacc
aggactgctgcagcagtcacggaaggtgggagactccccaaatcacggagtacatgttctgtccggctactcggatggcagca
aggactcctgcaagggggacagtgaggggccacatgccaccactaccggggcacgtggtacctgacgggcatcgtcagctgggg
ccagggctgcgaacctggggccactttgggtgtacaccagggctcccagtacatcagtggtgctgcaaaagctcatgctcaga
gccacgcccaggagctcctcctgcgagccccatttccctgaggatgctggcgcg (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 11).

```

En otra modalidad, la secuencia de aminoácidos del Factor VII comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKE  
EQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFE  
GRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEY  
PCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTI WVVS  
AAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRL  
HQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRL  
MTQDCLQSRKVGDSNITEYMFCAGYSDGSKDCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGI  
VSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (SEC. CON NÚM DE IDENT. 9).

En otra modalidad, la secuencia de aminoácidos del Factor VII comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

5 MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKE  
EQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFE  
GRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEY  
PCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTI WVVS  
AAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRL  
HQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRL  
MTQDCLQSRKVGDSNITEYMFCAGYSDGSKDCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGI  
VSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP\*GCGR (SEC. CON  
NÚM. DE IDENT.: 10).

10 Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor VII-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:





ctcggagacatggtctcccaggccctcaggctcctctgcttctgcttgggcttcagggtgctgctgagctcttcgtaaccaggag  
 gaagcccacggcgtcctgcaccggcggcggcgcgccaacgcgttctggaggagctcggccgggctccctggagagggagtc  
 aaggaggagcagtgctcctcgaaggaggcccgggagatctcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttctacagtat  
 ggggaccagtgctcaagtccatgccagaatggggctcctgcaaggaccagctccagctctatatctgcttctcctcctgcttc  
 gaggggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgactgtgtggaacgagaacggcggctgtgagcagctactgagtgacca  
 cacgggcaccaagcgtcctgtcgggtccacgagggtactctctgctgagacggggtgctctgcacaccacagttgaatacc  
 atgtgaaaaaatcattctagaaaaaagaatgccagcaaacccaaggcgaattgtgggggcaagggtgccccaaagggg  
 agtgtccatggcaggtcctgttggggaatggagctcagttgtgtgggggaccctgatcaacaccatctgggtgctcggcggc  
 cactgttcgacaaaaaagaactggaggaaactgacgcgggtgctgggcgagcacgacctcagcagcagcaggggatgagca  
 gagccggcgggtggcgcaggtcatcatccccagcagctacgtcccggcaccaccaaccagacatcgcgctgctccgctgcac  
 cagcccgtgctcctactgaccatgtggtgcccctctgctgcccgaacggagcttctctgagaggacgctgcccctcgtgcgcttctc  
 attggtcagcggctggggccagctgctggaccgtggcggccacggcctggagctcaggtcctcaacgtccccggctgatgacce  
 aggactgctgcagcagtcacggaaagggtggagactccccaaatatcaggagctacatgttctgtccggctactcggatggcagca  
 aggactcctgcaagggggacagtgaggggccacatgccaccactaccggggcacgtggtacctgaccggcatcgtgagctgggg  
 ccagggtgcccaccgtggggccattcggcgtgtaccagggtgctccagctacatcagtggtgctgcagaaactgatgagaagcg  
 agcccagaccggcgtgctgctgagagccccctccccagcagcagctccaaggccccctccccctagcctgcccagccctagcaga  
 ctgctggggcagtgacacccctatctgctcagctccagctccagcaaggccccccccctagcctgcttctccttctcggctgct  
 ggccccagcgatactccaattctgccccagctcctccagcagtaaggctccccctccatctctgcatccccagcagactgccaggcc  
 ctctgatacaccatcctccacagtgatgaggatccgcggcgttaattaa (SEC. CON NÚM. DE IDENT. : 24).

5 En otra modalidad, la secuencia de aminoácidos del Factor VII-CTP-CTP-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MVSQLRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKE  
 EQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFE  
 GRNCETHKDDQLICV NENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLLADGVSCPTPTVEY  
 PCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVS  
 AAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSR RVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRL  
 HQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPR L  
 MTQDCLQSRKVG DSPNITEYMF CAGYSDGSKD SCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGI  
 VSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPSLPS  
 PSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGP  
 SDTPILPQ\*\* (SEC. CON NÚM. DE IDENT. : 25).

10 Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor VII-(CTP)<sub>4</sub> (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

ctcaggacatggctcccagggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggtgcctggctgcagttctgtaaccaggag  
 gaagcccacggcgtcctgcaccggcggcggcgcgccaacgcgttctggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgc  
 aaggaggagcagtgctcctcgaaggaggcccgggagatctcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggattcttacagtat  
 ggggaccagtgtgcctcaagtccatgccagaatggggctcctgcaaggaccagctccagctctatatctgcttctgcctccctgccttc  
 gaggggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtaacgagAACGGCGTGTGAGCAGTACTGCAGTGACCA  
 cacgggcaccaagcgtcctgtcgggtccacgaggggtactctctgctggcagacggggtgctcgcacaccacagttgaatatcc  
 atgtggaaaaatacctattctagaaaaagaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtggggggcaagggtgccccaaagggg  
 agtgtccatggcaggctctgttgggtgaatggagctcagttgtggtggggaccctgatcaacaccatctgggtgctccgcggcc  
 cactgttcgacaaaatcaagaactggaggaaactgatcgcgggtgctgggcgagcacgacctcagcagcagcaggggatgagca  
 gagccggcgggtggcaggtcatcatcccagcagctacgtcccggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgctgcac  
 cagcccgtggtcctcactgaccatgtggtgccctctgcctgccgaacggacgttctctgagaggacgtgacctctgctgcttctc  
 attggtcagcggctggggccagctgctggaccgtggcggccacggccctggagctcatggtcctcaacgtccccggctgatgacc  
 aggactgctcagcagctcacggaagggtggagactccccaaatacacggagtacatgttctgtccggctactcggatggcagca  
 aggactcctgcaagggggacagtgaggggccacatgccaccactaccggggcacgtggtactgaccggcatcgtgagctgggg  
 ccagggtcgcaccctggtggccacttcggcgtgtaccagggtgtccagttacatcagtggtgctcagaaactgatgagaagcg  
 agcccagaccggcgtgctgctgagagccccctccccagcagcagctccaagggccccctccctagcctgcccagccctagcaga  
 ctgctggggccagtgacaccctatcctgcctcagctccagcaaggccccccccctagcctgcttctccttctcggctgct  
 ggccccagcgatactccaattctgccccagctcctccagcagtaaggctccccctccatctgcccacccccagcagactgccagggc  
 cttctgatacaccatcctcccacagtgatgaggatccgc (SEC. CON NÚM. DE IDENT. :26).

Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor VII-(CTP)<sub>4</sub> (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

5

LEDMVSQALRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERE  
 CKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFLP  
 AFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGY SLLADGVSCTPT  
 VEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIW  
 VVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIAL  
 LRLHQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWQQLDRGATALELMVLNV  
 PRLMTQDCLQSRKVG DSPNITEYMF CAGYSDGSKD SCKGDSGGPHATHYRGTWYL  
 TGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPS  
 LPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLP  
 GPSDTPILPQ\*\*G (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 27).

10 Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor VII-(CTP)<sub>5</sub> (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggtgcctggctgcagctctcgaacccaggag  
 gaagcccacggcgtcctgcaccggcggcggcggcgaacgcgttctggaggagctgcggcgggctccctggagagggagtg  
 aaggaggagcagtgctcctcaggaggcccgggagatctcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggattcttacagtgat  
 ggggaccagtgctcaagtcacagcaaatgggggctcctgcaaggaccagctccagctctatatctgcttctgcctccctgccttc  
 gaggggcgaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtaacgagaacggcggctgtgagcagctactgcagtgacca  
 cacgggcaccaagcgtcctgtcgggtccacgaggggtactctctgctggcagacggggtgctctgcacaccacagttgaatatcc  
 atgtgaaaaatacctattctagaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtggggggcaagggtgccccaaagggg  
 agtgtccatggcaggtcctgttgggtggaatggagctcagttgtggggggaccctgatcaacaccatctgggtggtctccggcggc  
 cactgtttcagaaaaaactgaggaactgaggaactgatcgggtgctggcggagcacgacctcagcagcagcaggggatgagca  
 gaggcggcgggtgctcaggtcatcatccccagcagctacgtcccggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgctgcac  
 cagcccgtggtcctcactgacctgtggtgcccctctgcctgcccgaacgggacgttctctgagaggacgctggccttctgctgcttctc  
 attggtcagcggctggggccagctgctggaccgtggcggccacggccctggagctcatgctctcaacgtgccccggctgatgacc  
 aggactgctgcagcagtcacggaagggtgggagactccccaaatatcagggagtacatgttctgtgcccggctactcggatggcagca  
 aggactcctgcaagggggacagtgaggggccacatgccaccactaccggggcacgtggtacctgaccggcatcgtgagctgggg  
 ccagggtcgcaccctggtggcactctggcgtgtacaccagggtgctccagtacatgagtggtgctgagaaactgatgagaagcg  
 agcccagaccggcgtgctgctgagagccccctccccagcagcagctccaaggcccctccccctagcctgcccagccctagcaga  
 ctgctggtggcctctgacacccctatcctgctcagctccagctccttaaggctccaccaccttccctgcttagccttcaagactgcca  
 ggccctagcgatacacaattctgcccagctcctccagcagcaaggctccccacctagcctgcttctccatcaaggctgctgccc  
 catccgatacccaattttgctcagagcagctctagcaaggcactccccagctgctccctccaagcagactccctgcccctca  
 gacactccaatcctcccagctcctagctctaaagctccacctcccagcctgcccagccctagtagactccccggaccttctgatacc  
 cccatcttggcccagtgatgagatccgc (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 28).

Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor VII-(CTP)<sub>5</sub> (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

5

LEDMVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERE  
 CKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLP  
 AFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLADGVSCTPT  
 VEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIW  
 VVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIAL  
 LRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNV  
 PRLMTQDCLQQRKVGDSPNITEYMFCAGYS DGSKDCKGDSGGPHATHYRGTWYL  
 TGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPS  
 LPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLP  
 GPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL  
 PQ\*\*GS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 29).

10 En otra modalidad, la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor IX comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

gcgatgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccattgccttttaggatatctactcagtgtgaat  
 gtacagttttcttgatcatgaaaacgccaaacaaattctgaatcggccaaagggtataattcaggtaattggaagagtttcaaggg  
 aacctgagagagaatgatggaagaaaagttagtttgaagaagcacgagaagttttgaaaactgaaagaacaactgaatttgg  
 aagcagtatgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgttaaatggcggcagttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtg  
 tcccttggattgaaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgaaaaatagtgctg  
 ataacaaggtggttctcctgactgaggatcgcacttcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatttccatgtgga  
 gagtttctgtttcacaacttctaagctcaccctgctgagactgttttctgatgtgactatgtaaattctactgaagctgaaaccatttgg  
 gataacatcactcaaagcaccatcatttaatactcactcagttgttggtggagaagatgccaaccaggcgaattcccttggcag  
 gttgtttgaatggtaaagtgtgacttctgtggaggctctatcgttaataaaaaatggattgtaactgctgccactgtgtgaaactgggt  
 taaaattacagttgtcgcagggtgaacataatattgaggagacagaacatacagcaaaagcgaatgtattcgaattattctcacca  
 caactacaatgcagctattaataagtacaaccatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacct  
 attgcatgctgacaaggaatacacgaacatcttctcaaatggatctggctatgtaagtggctggggaagagcttccacaaagggga  
 gatcagcttagttctccagtaccttagagttccactgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaaagttcaccatctataacaacatgtt  
 ctgtgctgctccatgaaggaggttagagattcatgcaaggagatagtgggggacccatgttactgaagtgggaaggaccagtttct  
 taactggaattattagctggggtgaagagtgcaatgaaaggcaaatatggaatataccaaggtatcccgggtatgcaactggattaa  
 ggaaaaaacaaagctcacttgaacgcggccgc (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 16).

En otra modalidad, la secuencia de aminoácidos del Factor IX comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQG  
 NLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSY  
 ECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCE  
 PAVPFCGRVSVSQTSLTRAETVFPDQVYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVG  
 GEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIE  
 ETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIF  
 LKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHE  
 GGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKT  
 KLT\* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 17).

5

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor IX-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

gcgatgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgccttttaggatatctactcagtgtgaa  
 tgtacagttttctgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcggccaaagaggataaattcaggtaaattggaagagttgttcaagg  
 gaaccttgagagagaatgtatggaagaaaagtgtagtttgaagaagcacgagaagttttgaaaacactgaaagaacaactgaatttg  
 gaagcagtatgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaattggcggcagttgcaaggatgacattaatcctatgaatgttgg  
 gtcccttggaattgaaaggaaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagtttgtaaaaatagtgt  
 gataacaagggtgttctctgactgaggatcactgagcagaaaaccagaagcctgtgaaccagcagtgccattccatgtgga  
 agagtttctgttcacaaacttctaaactcaccctgctgagactgttttctgatgtgactatgtaatttactgaagctgaaaccattt  
 ggataacatcactcaaagcaccatcatttaactgactcactgagttgttggtagaagatgccaaccagggtcaattcccttgga  
 ggtgtttgaaatgtaaagtgtgatcattctgtggagctctatcgtaaatgaaaatggattgtaactgctcccactgtgtgaaactggt  
 gttaaattacagttgtcgcaggtgaacataatattaggagacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaattattcctcac  
 cacaactacaatgcagctattaataagtacaacatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgtaaacagctacgttacac  
 ctattgcatgctgacaaggaatacacgaacatctcctcaaattggatctgctatgtaagtggctggggaagagcttccacaagg  
 gagatcagctttagttctcagtaccttagagttccactgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaaagttcaccatctataacaacatg  
 ttctgtgctggctccatgaaggaggtagagattcatgcaaggagatagtgggggacccatgttactgaagtggaaaggaccagttt  
 ctaactggaattattagctggggtgaagagtgcaatgaaaggcaaatatggaatatataccaaggtatcccgtatgcaactggatt  
 aaggaaaaaacaagctcactagctccagcagcaaggccctccccgagcctgccctcccccaagcaggtgctcctgggcccctccga  
 cacaccaatcctgccacagtgatgaaggctggtatccgcggccgc (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 18).

- 5 Se describe, además, que la secuencia de aminoácidos del Factor IX-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQG  
 NLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSY  
 ECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCE  
 PAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVG  
 GEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIE  
 ETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIF  
 LKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNMFCAGFHE  
 GGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRYVNWIKEKT  
 KLTSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ\*\* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 19).

- 10 Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor IX-CTP-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

gcgatgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgccttttaggatatctactcagtctgaa  
 tgtacagttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattcgaatcggccaaagaggataatcaggtaaattggaagagttgtcaagg  
 gaaccttgagagagaatgatggaagaaaagtgtagtttgaagaagcacgagaagttttgaaaactgaaagaacaactgaatttg  
 gaagcagtatgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaattggcggcagttgcaaggatgacattaatcctatgaatgttgg  
 gtccctttgattgaaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgagcagttttgaaaaatagtgct  
 gataacaaggtgttctctgactgaggatcgcactggcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatttccatgtgga  
 agagtttctgttcacaaacttcaagctcaccctgctgagactgttttctgatgtggactatgtaaattctactgaagctgaaaccattt  
 ggataacatcactcaaagcacccaatcatttaagtactcactcagttgttgggagaagatgccaaccaggtaattcccttgca  
 ggtgttttgaatgtaaaagtgtgactctgtggaggtctatcgttaatgaaaaatggattgtaactgctcccactgtgtgaaactggt  
 gttaaaattacagttgtcgcaggtgaacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaattatcctcac  
 cacaactacaatgcagctattaataagtacaacctgacattgccctctggaactggacgaaccttagtgtaaacagctacgttacac  
 ctattgcatgctacaaggaaatacacgaacatctcctcaaatggatctggctatgtaagtggctggggaagagcttccacaagg  
 agatcagctttagtctcagtaaccttagagttccactgttgaccgagccacatgtctcgaatcaaaagttaccatcataacaacatgt  
 tctgtgctggctccatgaaggaggtagagattcatgcaaggagatagtgggggacccatgttactgaagtgggaaggaccagtttc  
 ttaactggaattattagctgggtgaaagtgtgcaatgaaagcaaatatggaatatataccaaggatcccggatgcaactggatta  
 aggaaaaacaagctcactagctccagcagcaagggccctccccgagcctgccctcccccaagcaggtgctgcccctccgac  
 acaccaatctgccacagagcagctcctetaagggccctcctccatccctgccatccccctcccggctgctggcccctctgacaccc  
 tatcctgcctcagtgatgaaggctggtccgcccgc (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 20).

- 5 Se describe, además, que la secuencia de aminoácidos del Factor IX-CTP-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQG  
 NLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSY  
 ECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCE  
 PAVPFCGRVSVSQTSLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVG  
 GEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIE  
 ETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIF  
 LKFGSGYVSGWGRVFKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHE  
 GGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVSRYVNWIKEKT  
 KLTSSSSKAPPSLPSPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ\*\*  
 (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 21).

- 10 En otra modalidad, la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor IX-(CTP)<sub>3</sub> (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

tctagagtcgaccccgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgccttttaggatatctactc  
 agtgcagatgtacagttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattcgaatcggccaaagaggataatcaggtaaattggaagagtt  
 tgtcaagggaaccttgagagagaatgatggaagaaaagtgtagtttgaagaagcacgagaagttttgaaaactgaaagaacaa  
 ctgaattttggaagcagtatgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaattggcggcagttgcaaggatgacattaatcctat

gaatgttggtgccctttgattgaaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttaa  
 aatagtgctgataacaaggtggttctctctgactgagggatctgactgcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatt  
 tccatgtggaagagtttctgtttcacaacttctaagctcaccgctgctgagggcagtttctctgatgtggactatgtaattctactgaagct  
 gaaaccattttggataacatcactcaaaagcaccatcatttaactgactcactcaggtgttggtggagaagatgccaaccaggtcaat  
 tcccttggcaggtgtttgaaatggtaaaagtgatgcattctgtggaggctctatcgttaatgaaaaatggattgtaactgctgccactggt  
 tgaactggtttaaattacagttgctgcaggtgaacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaat  
 tattctcaccacaactacaatgcagctattaataagtacaacatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtctaaacagct  
 agttacacctatttgcattgctgacaaggataacacgaacatctctcaaatggatctggctatgtaagtggctggggaagagcttc  
 cacaaggagatcagcttagttctcagfaccttagagttccactgttgaccgagccacatgcttcgatctacaagttcaccatctat  
 aacaacatgtctgtgctgcttccatgaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtgggggacccatgttactgaaagtgaagg  
 gaccagtttctaactggaattattagctgggtgaagagtgatgcaatgaaaggcaaatatggaatataaccaaggtatcccggatgct  
 aactggattaaggaaaaaacaagctcactagctccagcagcaaggccccccccgagcctgccctcccccaagcaggctgcctgg  
 gcccagtgacacccctatcctgcccagtcagctccagcaaggccccccccctagcctgcttctccttctcggctgctggcccca  
 gcgatactccaattctgcccagctcctccagcagtaaggctccccctccatctctgccatccccagcagactgccaggcccttctgata  
 caccatcctcccacagtgatgaggtaccgcccgc (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 30).

5 En otra modalidad, la secuencia de aminoácidos del Factor IX-(CTP)<sub>3</sub> (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQG  
 NLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSY  
 ECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCE  
 PAVPFPCGRVSVSQTSLTRAEAVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVG  
 GEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIE  
 ETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIF  
 LKFGSGYVSGWGRVFKGRSALVLQYLRVPLVDRA TCLRSTKFTIYNNMFCAGFHE  
 GGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKT  
 KLTSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSS  
 KAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ\*\* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 31).

10 Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor IX-(CTP)<sub>4</sub> (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

tctagatcgaccccgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccagcctcaccatctgcttttaggatctactc  
 agtgcgtaatgtacagtttcttgcacatgaaaacgccaacaaaattctgaatcgccaagaggtataattcaggtaaattggaagagtt  
 tgtcaagggaacctgagagagaatgatggaagaaaagtgtagtttgaagaagcacgagaagttttgaaaacactgaaagaaca  
 ctgaattttggaagcagtatgtgatggagatcagtgtagtccaatccatgttaaatggcggcagttgcaaggatgacattaattcctat  
 gaatgttggtgtccctttgattgaaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttaa

aaatagtctgataacaaggtggttctctgtactgagggatafcgacttgcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatt  
 tccatgtggaagagtttctgtttcacaacttctaagctcacccgtgctgaggcagttttctgatgtggactatgtaaattctactgaagct  
 gaaaccatttggataacatcactcaaagcacccaatcatttaagtacttactcagagttgttggtggagaagatccaaaccagtgcaat  
 tcccttggcaggtgtttgaaatggtaaagttgatcattctgtggaggctctatcgttaaatgaaaaatggattgtaactgctgccactgtgt  
 tgaactggtgtaaaattacagttgctgcaggtgaacataataggaggacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaat  
 tattctcaccacaactacaatgcagctattaataagtaaacatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtctaaacagct  
 acgttacacctattgcatgctgacaaggaatacacgaacatcttctcaaattggatctggctatgtaagtggctggggaagagcttc  
 cacaaagggagatcagcttagttctcagctaccctagagttccactgttgaccgagccacatgtctcgaactacaagttcaccatctat  
 aacaacatgttctgtgctgcttccatgaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtgggggaccccatgttactgaagtggagg  
 gaccagtttctaactggaattattagctgggggtgaagagtgcaatgaaaggcaaatatggaatatataccaaggtatccggatgct  
 aactgattaaggaaaaaaaaagctcactagctccagcagcaagggccccccccgagcctgcctcccccaagcaggtgctgg  
 gccctctgacaccctatcctgctcagctcctcetaagggccccaccacttccctgcttagccttcaagactgccaggccctag  
 cgatacacaattctgccccagctcctccagcagcaaggtccccaccctagccttccatcaaggtgctggccccatccgata  
 ccccaatttgcctcagagcagctctgaagggcacctccccccagctgccccctccaagcagactccctggccttcagacactccc  
 attctgccacagtgatgaggatccgcggccgc (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 32).

Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor IX-(CTP)<sub>4</sub> (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

5

SRVDPAMQQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKL  
 EEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSC  
 KDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCKIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLA  
 ENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAEAVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFN  
 DFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV  
 AGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAD  
 KEYTNIFLKFSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNMF  
 CAGFHEGGRDSCQGD SGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVN  
 WIKEKTKLTSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPIL  
 PQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ\*\*GSA  
 A (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 33).

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor IX-(CTP)<sub>5</sub> (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

10

ctagagtcgaccccgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatccatctgcttttaggatctactca  
 gtgctgaatgtacagttttctgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcgccaagagggtataattcaggtaaattggaagagtt  
 gttcaagggaaacctgagagagaatgatggaagaaaagtgtgatttgaagaagcagcagagaagttttgaaaactgaaagaacaac  
 tgaatttggaaagcagtatgtgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaattggcggcagtgcaaggatgacattaattcctatg

aatgttggtgtcccttggattgaaggaaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagtttgtaaa  
 aatagtctgataacaaggtggttctcctgtactgaggatgactgagcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccattt  
 ccatgtggaagagtttctgttccaaaacttaagctcaccctgctgagcagttttctgatgaggactatgtaaattctactgaagctg  
 aaaccatttggataacatcactcaaaagcacccaatcatttaagtactcactcaggtgttggggagaagatgccaaccaggtcaattc  
 ccttggcaggttggtaaatggtaaaagttgatcattctgtggagcctctatcgttaataaaaaatggattgtaactgctgccactgtgtg  
 aaactggtgtaaaattacagttgtcgcaggtgaacataataggagagacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaatta  
 ttctcaccacaactacaatgcagctattaataagtaaacatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgtaaacagcta  
 cgttacacctatttgattgctgacaaggaatacacgaacatcttctcaaatggatctggctatgtaagtggctggggaagagtctcc  
 acaagggagatcagctttagttctcagctaccttagagttccactgttgaccgagccacatgtctctgactacaagttccactctata  
 acaacatgttctgtgctgcttccatgaaggaggtagagattcatgcaaggagatagtgggggaccccatgttactgaagtggagggg  
 accgatttcttaactggaattattagctgggggtaagagtgtgcaatgaaaggcaaatatggaatatataccaaggtatcccggtatgca  
 actggattaaggaaaaaacaagctcactagctccagcagcaaggccctccccgagcctgccctcccccaagcagggctgctggg  
 ccctctgacaccctatcctgctcagctcctccttaaggtccaccacctcctgcttagccctcaagactgccaggccctagc  
 gatacacaattctgccccagctcctccagcagcaaggctccccacctagcctgcttctccatcaaggctgctgccccatccgatac  
 cccaatttgcctcagagcagctctagcaaggcaccctccccagctgctcctctccaagcagactcctgccccctcagacactccaat  
 cctccccagctcctctagctetaaagctccacctccccagcctgccccagccttagtagactccccggacctctgataccccatcttgc  
 ccagtgatgaggatccgcggccgc (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 34).

5 Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor IX-(CTP)<sub>5</sub> (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

RVDPAMQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKL  
 EEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSC  
 KDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLA  
 ENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAFAVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFN  
 DFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV  
 AGEHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIAD  
 KEYTNIFLKFSGYVSGWGRVVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNMF  
 CAGFHEGGRDSCQGDGSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYKVSRYVN  
 WIEKTKLTSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL  
 PQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSK  
 APPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ\*\*GSAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 35).

10 En otra modalidad, puede añadirse furina a una célula que expresa el factor de coagulación-CTP de la invención. Se describe que la furina aumenta la eficiencia de la producción de un factor de coagulación-CTP de la invención en una célula. En otra modalidad, la furina se cotransfecta con el vector que comprende la secuencia codificante del factor de coagulación-CTP de la invención. En otra modalidad, la furina está codificada por un vector separado. En otra modalidad, la furina y un factor de coagulación-CTP están codificados por un vector. En otra modalidad, la secuencia codificante de furina se inserta en pCI-DHFR. En otra modalidad, la secuencia codificante de furina se modifica genéticamente en pCI-dhfr/smal+NotI, Furina/AsisI F.I.+NotI.

15 La secuencia de ácido nucleico que codifica la furina comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

tctagagtcgaccccgccatggagctgagggccctgggtgctatgggtgtagcagcaacaggaaccttggctcctgtagcagctgatg  
ctcagggccagaaggcttcaccaaacacgtgggctgtgcgcacccctggaggcccaagcgggtggccaacagtgtggcacgggaagcat  
gggttctcaacctgggcccagatcttcggggactattaccacttctggc atcaggagtgacgaagcggtcctctgcctcaccgccc  
ggggcacagccggctgcagagggagcctcaagtacagtggtggaacagcaggtggcaaaagcgacggactaaacgggacgtgta  
ccaggagcccacagaccccaagtttctcagcagtggtacctgtctggtgctactcagcgggacctgaatgtgaagcggcctgggc  
gcagggctacacagggcacggcattgtggtctccattctggacgatggc atcgagaagaaccaccggacttggcagggcaattatgat  
cctggggcccagttttagtcaatgaccaggacctgacccccagcctgggtacacacagatgaatgacaacaggcacggcacacgg  
tgtcgggggaaagtggctgcgggtggccaacaacgggtgctgtggtgtaggtgtggcctacaaccccgcattggaggggtgcatg  
ctggatggcaggtgacagatgagtgaggcagcgtcgtgggectgaacccccaacacatccacatctacagtgccagctgggg  
ccccgaggatgacggcaagacagtggtggccagcccgcctcggcagaggccttctccgtggggttagccagggccgagg  
gggctgggctccatcttctgctgggcccggggaaacggggccgggaacatgacagctgcaactgcgacggctacaccaacagta  
tctacacgctgtccatcagcagcggccacgcagttggcaacgtgccgtggtacagcagggcctgctcgtccacactggccacgaccta  
cagcagtggaaccagaatgagaagcagatcgtgacgactgacttgcggcagaagtgcacggagtctcacacgggcacctcagcct  
ctgcccccttagcagccggcatcttctcaccctggaggccaataagaacctcacatggcgggacatgcaaacctgggtgtaca  
gacctgaaagccagcccacctcaatgccaacgactgggccaacaatggtgtggccggaaagtgagccactcatatggctacgggc  
ttttggacgcagcggccatgggtggcctggcccagaattggaccacagtgccccccagcgggaagtgc atcgcacatcctaccg  
agcccaaagacatcgggaaacggctcagggctcgggaagaccgtgaccgcgtgcctgggcgagcccaaccacatcactgggctgg  
agcacgctcagggcggctcaccctgtcctataatgccgtggcgacctggccatccacctgtcagccccatgggcacccgctcca  
ccctgctggcagccagccacatgactactccgcagatgggttaatgactgggcttcatgacaactattcctgggatgaggatccct  
ctggcgagtgggtcctagagattgaaaacaccagcgaagccaacaactatgggacgctgaccaagttcacctcgtactctatggcac  
cggccctgaggggctcccgtacctccagaagcagtggtgctcaagacctcagctccagtcaggcctgtgtggtgctcagggaag  
gcttctcctgcaccagaagagctgtgtccagcactgccctccaggcttccccccaagtctcgcatacgcactatagcaccgagaat  
gacgtggagaccatecgggceagcgtctgcggccctgccacgcctcatgtgccacatgccagggggccgacctgacagactgcct  
cagctggcccagccacgctccttggacctgtggagcagacttctcccggcaaaagccagagcagccgagagtccccggccacag  
cagcagccacctggctgccccggaggtggagcggggcaacggctcggggcagggctgctgccctcacacctgcctgaggtg  
gtggccggcctcagctgcgcctcatcgtctggtcttcgctactgtcttctggtcctgcagctgcgctctggcttagtttccgggggt  
gaaggtgtacaccatggaccgtggcctcatctctacaaggggctgccccctgaagcctggcagggaggtgcccgtctgactcaga  
agaggacgagggccggggcgagaggaccgcttatacaagaccagagcgcctctgaacgcggccgc (SEC. CON NÚM.  
DE IDENT.: 22).

La secuencia de aminoácidos de furina comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFL  
 NLGQIFGDYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTRKRDVY  
 QEPTDPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQGYTGHGIVVSILDDGIEKNHPDLAGN  
 YDPGASFDVNDQDPDPQPRYTQMNDNRHGTRCAGEVAAVANNGVCGVGVAYNAR  
 IGGVRMLDGEVTDAREARSLGLNPNHIHIYSASWGPEDDGKTVDGPARLAEEAFFRG  
 VSQGRGGLGSIFVWASGNGGREHDCNCDGYTNSIYTLSSSATQFGNVPWYSEACS  
 STLATTYSSGNQNEKQIVTTDLRQKCTESHTGTSASAPLAAGIIALTLEANKNLTRD  
 MQHLVVQTSKPAHLNANDWATNGVGRKVSHSYGYGLLDAGAMVALAQNWTTVA  
 PQRKCIIDILTEPKDIGKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQARLTL SYNRRGDLAIH  
 LVSPMGTRSTLLAARPHDYSADGFNDWAFMTTHSWDEDPGGEVWLEIENTSEANNY  
 GTLTKFTLVLYGTAPEGLPVPPESSGCKTLTSSQACVVCEEGFSLHQKSCVQHCPPGF  
 APQVLDTHYSTENDVETIRASVCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPSHASLDPVEQTCS  
 RQSQSSRESPPQQPPRLPPEVEAGQRLRAGLLPSHLPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLV  
 LQLRSGFSFRGVKYYTMDRGLISYKGLPPEAWQEPCSDSEEDDEGRGERTAFIKDQSA  
 L\* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 23).

5 En una modalidad, el término factor de coagulación incluye además un homólogo del factor de coagulación que tiene actividad coagulante. En algunas modalidades, la homología de acuerdo con la presente descripción abarca, además, variantes de delección, inserción o sustitución, que incluye una sustitución de aminoácidos, de estos y fragmentos polipeptídicos biológicamente activos de estos. En una modalidad, la variante comprende sustituciones conservadoras, o delecciones, inserciones o sustituciones que no alteran significativamente la estructura tridimensional del factor de coagulación. En otra modalidad, la delección, inserción o sustitución no altera la función de interés del factor de coagulación, que en una modalidad, es la unión a una pareja de unión en particular.

15 En otra modalidad, la descripción incluye un homólogo de un factor de coagulación que tiene unión funcional. En otra modalidad, los homólogos, por ejemplo, son polipéptidos que son al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 87 %, al menos 89 %, al menos 91 %, al menos 93 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % homólogos al factor de coagulación según se determina mediante el uso del programa informático BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante el uso de parámetros predeterminados.

20 En otra modalidad, en la presente se proporciona un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y tres CTP unidos al carboxilo terminal del factor de coagulación.

25 Debe entenderse que las composiciones y los métodos de la presente invención que comprenden los elementos o etapas como se describen en la presente pueden consistir en esos elementos o etapas, o consisten en esos elementos o etapas. En algunas modalidades, el término "comprender" se refiere a la inclusión del agente activo indicado, tal como el factor de coagulación modificado con CTP, así como a la inclusión de otros agentes activos, y portadores, excipientes, emolientes, estabilizadores farmacéuticamente aceptables, etcétera, como se conocen en la industria farmacéutica. En algunas modalidades, el término "que consiste esencialmente en" se refiere a una composición, cuyo único ingrediente activo es el ingrediente activo indicado, sin embargo, pueden incluirse otros compuestos que son para estabilizar, preservar, etcétera, la formulación, pero no están implicados directamente en el efecto terapéutico del ingrediente activo indicado. En algunas modalidades, el término "que consiste esencialmente en" puede referirse a componentes que facilitan la liberación del ingrediente activo. En algunas modalidades, el término "que consiste" se refiere a una composición, que contiene el ingrediente activo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables.

35 En otra modalidad, la invención proporciona un polipéptido que consiste en un factor de coagulación que no tiene CTP en su amino terminal. En otra modalidad, la invención proporciona un polipéptido que consiste en un factor de coagulación que carece de un CTP en su amino terminal. En otra modalidad, la invención proporciona un polipéptido que consiste en un factor de coagulación que tiene tres CTP en su carboxilo terminal como se describe en la presente y no tiene CTP en su amino terminal.

40 En otra modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido como se describió anteriormente.

5 En otra modalidad, la presente invención proporciona además una composición que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido modificado con CTP que consiste en un polipéptido del factor IX (FIX) y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX.

10 En otra modalidad, la presente invención proporciona además un polinucleótido que codifica un polipéptido modificado con CTP que consiste en un polipéptido del factor VIIa (FVIIa) y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa.

15 En una modalidad, la presente invención proporciona un factor de coagulación recombinante como se describió anteriormente. En una modalidad, la presente invención proporciona un factor de coagulación modificado genéticamente como se describió anteriormente. En una modalidad, el factor de coagulación modificado genéticamente como se describió anteriormente se refiere como un factor de coagulación modificado con CTP.

En una modalidad, los CTP que se unen al carboxilo terminal del factor de coagulación se unen en tándem al carboxilo terminal.

20 En una modalidad, un factor de coagulación modificado genéticamente como se describe en la presente tiene una actividad biológica equivalente o mejorada en comparación con el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra modalidad, un factor de coagulación modificado genéticamente como se describe en la presente tiene medidas farmacológicas equivalentes o mejoradas en comparación con el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra modalidad, un factor de coagulación modificado genéticamente como se describe en la presente tiene una farmacocinética equivalente o mejorada en comparación con el factor de coagulación sin modificación con CTP.

25 En otra modalidad, un factor de coagulación modificado genéticamente como se describe en la presente tiene una farmacodinámica equivalente o mejorada en comparación con el factor de coagulación sin modificación con CTP.

30 En una modalidad, la presente invención proporciona un factor de coagulación modificado con CTP para usar en la prevención o el tratamiento de un trastorno de coagulación o de formación de coágulos. En otra modalidad, la invención proporciona un factor de coagulación modificado con CTP para usar en la prevención o el tratamiento de hemofilia en un sujeto, que comprende administrar un factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención. En otra modalidad, la invención proporciona un factor de coagulación modificado con CTP para usar en la prevención y el tratamiento de hemofilia en un sujeto, que comprende administrar al sujeto el factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención. En otra modalidad, la invención proporciona un factor de coagulación modificado con CTP para usar en la prevención o el tratamiento de hemofilia en un sujeto, que comprende administrar al sujeto por vía subcutánea el factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención. En otra modalidad, la invención proporciona un Factor VII modificado con CTP para usar en el tratamiento de la hemofilia en un sujeto, que comprende administrar un Factor VII modificado con CTP de la presente invención.

40 En otra modalidad, la invención proporciona un Factor IX modificado con CTP para usar en el tratamiento de la hemofilia en un sujeto, que comprende administrar un Factor IX modificado con CTP de la invención. En otra modalidad, la hemofilia es hemofilia B. En otra modalidad, la hemofilia B se conoce como deficiencia del factor IX o enfermedad de Christmas. En otra modalidad, la hemofilia es hemofilia grave, que en una modalidad, describe la hemofilia en la cual los niveles del factor de coagulación son 0-1 %. En otra modalidad, la hemofilia es hemofilia moderada, que en una modalidad, describe la hemofilia en la cual los niveles del factor de coagulación son 1-5 %. En otra modalidad, la hemofilia es hemofilia ligera, que en una modalidad, describe la hemofilia en la cual los niveles del factor de coagulación son 5-50 %.

50 En otra modalidad, la invención proporciona un factor IX modificado con CTP (FIX) para usar en la prevención o el tratamiento de un trastorno de coagulación o de formación de coágulos en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto, el polipéptido del FIX modificado con CTP que comprende un polipéptido del FIX y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX, para así prevenir o tratar un trastorno de coagulación o de formación de coágulos en dicho sujeto. En otra modalidad, la invención proporciona un Factor VII modificado con CTP (FVII) para usar en la prevención o el tratamiento de un trastorno de coagulación o de formación de coágulos en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto, un polipéptido del FVII modificado con CTP que comprende un polipéptido del FVII y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FVII, para así prevenir o tratar un trastorno de coagulación o de formación de coágulos en dicho sujeto.

60 En otra modalidad, la invención proporciona un FIX modificado con CTP para usar en la prevención o el tratamiento de hemofilia en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto, el polipéptido del FIX modificado con CTP que comprende un polipéptido del FIX y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX, para así prevenir o tratar la hemofilia en dicho sujeto. En otra modalidad, la invención proporciona un Factor VIIa (FVIIa) modificado con CTP para usar en la prevención o el tratamiento de hemofilia en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto, un polipéptido del FVIIa modificado con CTP que comprende un polipéptido de FVIIa y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica

(CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa, para así prevenir o tratar la hemofilia en dicho sujeto.

La solicitud describe un método para tratar la hemofilia en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto uno o más factores de coagulación modificados con CTP como se describe en la presente. Por lo tanto, la solicitud describe un método para tratar la hemofilia en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto, un polipéptido del factor IX (FIX) modificado con CTP que comprende un polipéptido del FIX y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX y un polipéptido del factor VIIa (FVIIa) modificado con CTP que comprende un polipéptido de FVIIa y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa, para así tratar la hemofilia en dicho sujeto. En una modalidad, el FIX modificado con CTP y el FVIIa modificado con CTP se administran en la misma composición al mismo tiempo. En otra modalidad, el FIX modificado con CTP y el FVIIa modificado con CTP se administran en composiciones separadas al mismo tiempo. En otra modalidad, el FIX modificado con CTP y el FVIIa modificado con CTP se administran en composiciones separadas en momentos diferentes.

En otra modalidad, la invención proporciona un polipéptido del factor IX modificado con CTP (FIX) o del factor VII modificado con CTP que comprende un polipéptido del FIX o FVII y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) unidos al carboxilo terminal del polipéptido de dicho FIX o de dicho FVII para usar en la prevención o el tratamiento de la hemofilia en un sujeto, mediante la administración a dicho sujeto, por vía subcutánea o intravenosa, de dicho FIX modificado con CTP o dicho FVII modificado con CTP, para así prevenir o tratar la hemofilia en dicho sujeto.

En algunas modalidades, en la presente se proporciona un factor de coagulación modificado con CTP que comprende tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del factor de coagulación, en donde la secuencia de dicho factor de coagulación modificado con CTP se selecciona del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident.: 25, los aminoácidos 39-528 de la sec. con núm. de ident.: 25, la sec. con núm. de ident.: 31, o los aminoácidos 47-545 de la sec. con núm. de ident.: 31, para usar en la prevención o el tratamiento de la hemofilia en un sujeto.

En una modalidad de la invención, se proporciona un Factor VII modificado con CTP o un factor VII activado (FVIIa) modificado con CTP que comprende tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FVII para usar en la prevención o el tratamiento de una hemofilia en un sujeto mediante la administración al sujeto, por vía subcutánea, de dicho factor VII modificado con CTP o dicho factor VIIa modificado con CTP, en donde la secuencia de dicho FVII modificado con CTP se selecciona del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident.: 25 o los aminoácidos 39-528 de la sec. con núm. de ident.: 25.

En otras modalidades, el factor de coagulación modificado genéticamente es para usar en el tratamiento de pacientes con hemofilia B. En una modalidad, el factor de coagulación IX que comprende 3 CTP en tándem en su carboxilo terminal es para usar en el tratamiento de pacientes con hemofilia B. En otras modalidades, el factor de coagulación modificado genéticamente puede reducir la cantidad de infusiones necesarias para un paciente, reducir las dosis necesarias para un paciente, o una combinación de estas.

En una modalidad, el factor de coagulación IX que comprende 3 CTP en tándem en su carboxilo terminal muestra un mejor perfil PK a la vez que mantiene su actividad de coagulación frente a la cosecha de FIX-CTP-CTP, la cosecha de FIX-CTP o rhFIX. En una modalidad, el tiempo de vida media de eliminación de rFIX-CTP3 es de 2,5 a 4 veces mayor que para rFIX en ratas y en ratones deficientes de FIX. En la presente se describe que la administración de rFIX-CTP3 prolongó significativamente el efecto de procoagulación en ratones deficientes de FIX durante al menos 76 horas después de la dosificación. En la presente se describe además que la administración de rFIX-CTP3 produjo un mayor pico de actividad que rFIX en ratones deficientes de FIX. Se describe, además, que el factor de coagulación IX que comprende 2 CTP en tándem en su carboxilo terminal muestra un mejor perfil PK a la vez que mantiene su actividad de coagulación frente a la cosecha de FIX-CTP o rhFIX y que el factor de coagulación IX que comprende 2 CTP en tándem en su carboxilo terminal muestra un aumento de 3 veces en el tiempo de vida media y un AUC 4,5 veces mayor en comparación con rhFIX.

En otra modalidad de la invención, la administración SC da como resultado una mayor biodisponibilidad del FVII modificado con CTP en comparación con el FVII recombinante. Se describe que el tiempo de vida media es más prolongado y la biodisponibilidad (AUC SC/AUC IV) es mayor después de la administración SC de FVIIa-CTP3 y 5 en comparación con la administración SC de NovoSeven®. Se describe que MOD-5014 y MOD-5019 inyectados por vía subcutánea muestran una mejor supervivencia de los ratones en comparación con el FVII recombinante (NovoSeven®) (véase el Ejemplo 8 más adelante).

En otra modalidad, los términos "péptido CTP", "péptido del carboxilo terminal" y "secuencia de CTP" se usan indistintamente en la presente. En otra modalidad, el péptido del carboxilo terminal es un CTP de longitud completa.

En otra modalidad, un péptido señal puede unirse al amino terminal del CTP, como se describe en el documento US 7,553,940.

En otras modalidades, el término factor de coagulación modificado genéticamente se refiere a la secuencia de aminoácidos de un factor de coagulación maduro. En otras modalidades, el término factor de coagulación modificado genéticamente se refiere a la secuencia de aminoácidos del factor de coagulación que incluye su secuencia señal o péptido señal.

En otra modalidad, "secuencia señal" y "péptido señal" se usan indistintamente en la presente. En otra modalidad, "secuencia" cuando hace referencia a una molécula polinucleotídica puede referirse a una parte codificante.

En otra modalidad, un factor de coagulación modificado genéticamente que comprende al menos un CTP como se describe en la presente tiene una mayor actividad biológica in vivo en comparación con el mismo factor de coagulación sin al menos un CTP. En una modalidad, la actividad biológica mejorada se deriva del tiempo de vida media más prolongado del factor de coagulación modificado genéticamente a la vez que mantiene al menos alguna actividad biológica. En otra modalidad, la actividad biológica mejorada se deriva de la actividad biológica mejorada que resulta de la modificación con CTP. En otra modalidad, la actividad biológica mejorada se deriva tanto de un tiempo de vida media más prolongado como de una mejor funcionalidad del factor de coagulación modificado con CTP.

Como se describe en la presente, al menos una secuencia CTP en el extremo carboxilo terminal del factor de coagulación proporciona mayor protección contra la degradación de un factor de coagulación, proporciona mayor protección contra el aclaramiento, proporciona un tiempo de aclaramiento prolongado, aumenta su  $C_{m\acute{a}x}$ , aumenta su  $T_{m\acute{a}x}$ , y/o prolonga su  $T_{1/2}$ .

En otra modalidad, un factor de coagulación conjugado de esta invención se usa de la misma manera que un factor de coagulación conjugado no modificado. En otra modalidad, un factor de coagulación conjugado de esta invención tiene un mayor tiempo de vida media en circulación y tiempo de residencia en el plasma, menor aclaramiento, y una actividad clínica in vivo aumentada. En otra modalidad, debido a las propiedades mejoradas del factor de coagulación conjugado como se describe en la presente, este conjugado se administra menos frecuentemente que la forma no modificada del mismo factor de coagulación.

En otra modalidad, una disminución en la frecuencia de administración dará como resultado una mejor estrategia de tratamiento, que en una modalidad, conducirá a una mayor satisfacción del paciente lo que conduce a mejores resultados del tratamiento, así como una mejor calidad de vida del paciente. En otra modalidad, en comparación con los conjugados convencionales de factores de coagulación, se ha encontrado que los conjugados que tienen el peso molecular y la estructura de enlazador de los conjugados de esta invención tienen una mejor potencia, mejor estabilidad, elevados niveles de AUC, y mayor tiempo de vida media en circulación.

En otra modalidad, en la presente se proporciona una composición que comprende un factor de coagulación conjugado de la invención como se describe en la presente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una composición farmacéutica que comprende el factor de coagulación conjugado. En otra modalidad, en la presente se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad con eficacia terapéutica del factor de coagulación conjugado. En una modalidad, una cantidad con eficacia terapéutica de un factor de coagulación conjugado se determina de acuerdo con factores como la afección específica que se trata, la afección del paciente que se trata, así como los otros ingredientes en la composición.

En otra modalidad, un factor de coagulación conjugado de la invención como se describe en la presente es útil en el tratamiento de sujetos que padecen hemofilia. En otra modalidad, el factor de coagulación conjugado es útil en la terapia profiláctica de la hemofilia para reducir así el riesgo de hemorragia y complicaciones asociadas. En otra modalidad, el factor de coagulación conjugado es útil en el tratamiento de sujetos que padecen de hemofilia a la vez que reduce el riesgo de desarrollar anticuerpos inhibitorios contra los factores de coagulación administrados de manera exógena. En otra modalidad, el factor de coagulación conjugado es útil en el tratamiento de sujetos que padecen de hemofilia para inducir así la homeostasis.

En una modalidad, un factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención tiene usos terapéuticos. En otra modalidad, un factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención tiene usos profilácticos.

En otra modalidad, un factor de coagulación conjugado de la invención es útil en el tratamiento de sujetos que padecen de hemorragia excesiva o hematomas o que tienen un prolongado tiempo de protrombina (PT) o tiempo de tromboplastina parcial (PTT). En otra modalidad, un factor de coagulación conjugado de la invención es útil en el tratamiento de sujetos que tienen una afección adquirida que provoca hemorragias, como la deficiencia de vitamina K o enfermedad hepática. En una modalidad, el factor de coagulación conjugado es útil en el tratamiento de sujetos que tienen deficiencias en factores de coagulación que se adquieren (debido a otras enfermedades) o se heredan, ligeras o graves, permanentes o temporales. En otra modalidad, el factor de coagulación conjugado es útil en el tratamiento de sujetos que padecen de hemofilia A. En otra modalidad, el factor de coagulación conjugado es útil en el tratamiento de sujetos que padecen de hemofilia B. Se describe, además, que el factor de coagulación conjugado de la invención es útil en el tratamiento de sujetos que tienen deficiencias adquiridas debido a enfermedades

crónicas, como una enfermedad hepática o cáncer; a una afección aguda como la coagulación intravascular diseminada (DIC), que utiliza factores de coagulación a una velocidad rápida; o a una deficiencia de la vitamina K o un tratamiento con un antagonista de la vitamina K como la warfarina (la producción de los factores II, VII, IX y X requiere de vitamina K). Se describe, además, que un factor de coagulación conjugado de la invención es útil en el tratamiento de sujetos que padecen de una enfermedad que provoca desequilibrios en la coagulación tales como pero sin limitarse a: una enfermedad hepática, uremia, un cáncer, un trastorno de la médula ósea, una exposición al veneno de serpiente, una deficiencia de vitamina K, una terapia anticoagulante, una ingestión accidental del anticoagulante warfarina, múltiples transfusiones de sangre (las unidades almacenadas de sangre pierden algunos de sus factores de coagulación), o una combinación de estos. En otra modalidad, el factor de coagulación modificado con CTP puede ser para usar en el tratamiento de la trombosis venosa profunda en un sujeto mediante la administración de un factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención. En una modalidad, la invención proporciona un factor de coagulación modificado con CTP para usar en la prevención de una hemorragia no controlada en un sujeto con hemofilia mediante la administración al sujeto del factor de coagulación modificado con CTP. En otra modalidad, la invención proporciona un factor de coagulación modificado con CTP para usar en la prevención de episodios de hemorragia en un sujeto con hemofilia mediante la administración al sujeto del factor de coagulación modificado con CTP. En otra modalidad, la presente invención proporciona un factor de coagulación modificado con CTP para usar en el control de episodios de hemorragia en un sujeto con hemofilia B (deficiencia congénita del factor IX).

En otra modalidad, las composiciones y usos médicos descritos en la presente son para el tratamiento de episodios de hemorragia en pacientes con hemofilia A o B con inhibidores para FVIII o FIX y en pacientes con hemofilia adquirida; prevención de hemorragia en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con hemofilia A o B con inhibidores para FVIII o FIX y en pacientes con hemofilia adquirida; tratamiento de episodios de hemorragia en pacientes con deficiencia congénita del FVII y prevención de hemorragia en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con deficiencia congénita del FVII. En otra modalidad, las composiciones descritas en la presente son para usar en el tratamiento o prevención de hemorragias en los músculos o hemorragias en las articulaciones o para proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de epistaxis y hemorragia en las encías, hemorragia de membranas mucosas, o hemorragia en el sistema nervioso central, proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de hemorragia gastrointestinal o cerebral, proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de sangrados ligeros de baja frecuencia, proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de sangrados moderados de baja frecuencia, proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de sangrados ligeros de alta frecuencia, o proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de sangrados moderados de alta frecuencia.

En una modalidad, las composiciones y usos médicos de la presente invención proporcionan tratamiento terapéutico o profiláctico de la hemofilia asintomática. En otra modalidad, las composiciones y usos de la invención proporcionan tratamiento terapéutico o profiláctico de la hemofilia ligera a moderada. En otra modalidad, las composiciones y usos de la invención proporcionan tratamiento terapéutico o profiláctico de la hemofilia grave.

En una modalidad, las composiciones y usos médicos de la presente invención proporcionan tratamiento terapéutico o profiláctico de la hemorragia, que en una modalidad, es una hemorragia incontrolable y, en otra modalidad, hemorragia intracerebral. En otra modalidad, las composiciones y usos de la presente invención proporcionan tratamiento terapéutico o profiláctico de coagulopatías neonatales; enfermedad hepática grave; procedimientos quirúrgicos de alto riesgo; pérdida de sangre por trauma; trasplante de médula ósea; trombocitopenias y trastornos de la función plaquetaria; reversión urgente de la anticoagulación oral; deficiencias congénitas de los factores V, VII, X, y XI; enfermedad de von Willebrand, o enfermedad de von Willebrand con inhibidores del factor de von Willebrand.

En una modalidad, un factor de coagulación modificado con CTP de la invención es para usar en el tratamiento de la hemofilia o una enfermedad relacionada como se describe en la presente en un sujeto. En una modalidad, el sujeto es un ser humano. En otra modalidad, el sujeto es un animal domesticado. En otra modalidad, el sujeto es un mamífero. En otra modalidad, el sujeto es un animal de granja. En otra modalidad, el sujeto es un mono. En otra modalidad, el sujeto es un caballo. En otra modalidad, el sujeto es una vaca. En otra modalidad, el sujeto es un ratón. En otra modalidad, el sujeto es una rata. En otra modalidad, el sujeto es un canino. En otra modalidad el sujeto es un felino. En otra modalidad, el sujeto es bovino, ovino, porcino, equino, murino o cervino. En una modalidad, el sujeto es macho. En otra modalidad el sujeto es hembra. En una modalidad, el sujeto es un niño, en otra modalidad, un adolescente, en otra modalidad, un adulto o, en otra modalidad, un sujeto anciano. En otra modalidad, el sujeto es un sujeto pediátrico, en otra modalidad, un sujeto geriátrico.

Un [(CTP)<sub>n</sub>>1-factor de coagulación] como se describe en la presente puede comprender un factor de coagulación de longitud completa o un fragmento activo de este conectado por medio de un enlace peptídico en su carboxilo terminal a al menos una unidad de CTP, sin CTP en su amino terminal. Un [(CTP)<sub>n</sub>>1-factor de coagulación] como se describe en la presente puede comprender, además, un factor de coagulación o un fragmento activo de este conectado por medio de un enlace peptídico a al menos una unidad de CTP que se conecta a una unidad de CTP adicional por medio de un enlace peptídico sin CTP en su amino terminal. En otra modalidad, una molécula de ácido nucleico codifica un factor de coagulación modificado genéticamente que comprende al menos un CTP unido a su extremo C-terminal y sin CTP en su amino terminal.

- 5 En otra modalidad, el CTP se une al factor de coagulación por medio de un enlazador. En otra modalidad, el enlazador que conecta la secuencia CTP al factor de coagulación es un enlace covalente. En otra modalidad, el enlazador que conecta la secuencia CTP al factor de coagulación es un enlace peptídico. En otra modalidad, el enlazador que conecta la secuencia CTP al factor de coagulación es un enlace peptídico sustituido. En otra modalidad, la secuencia CTP comprende: DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL (sec. con núm. de ident.: 1). En otra modalidad, la secuencia CTP comprende: SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (sec. con núm. de ident.: 2). En otra modalidad, la secuencia CTP comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias expuestas en la sec. con núm. de ident.: 1 y la sec. con núm. de ident.: 2.
- 10 En otra modalidad, el péptido del carboxilo terminal (CTP) de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos a partir del aminoácido 112 a la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana, como se expone en la sec. con núm. de ident.: 1. En otra modalidad, la secuencia CTP de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos a partir del aminoácido 118 a la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana, como se expone en la sec. con núm. de ident.: 2. En otra modalidad, la secuencia CTP además comienza a partir de cualquier posición entre las posiciones 112-118 y termina en la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana. En algunas modalidades, la secuencia del péptido CTP es de 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 aminoácidos de longitud y comienza en la posición 112, 113, 114, 115, 116, 117 o 118 de la secuencia de aminoácidos del CTP.
- 15 En otra modalidad, el péptido CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo por 1-5 sustituciones de aminoácidos conservadoras como se describe en la patente de EE.UU. núm. 5,712,122. En otra modalidad, el péptido CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo por 1 sustitución de aminoácidos conservadora. En otra modalidad, el péptido CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo por 2 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra modalidad, el péptido CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo por 3 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra modalidad, el péptido CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo por 4 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra modalidad, el péptido CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo por 5 sustituciones de aminoácidos conservadoras.
- 20 En otra modalidad, la secuencia de aminoácidos del péptido CTP de la presente invención es al menos 70 %, o al menos 80 %, o al menos 90 %, o al menos 95 %, o al menos 98 % homóloga a la secuencia de aminoácidos del CTP nativo o un péptido de este.
- 25 En otra modalidad, el polinucleótido que codifica al péptido CTP de la presente invención es al menos 70 %, o al menos 80 %, o al menos 90 %, o al menos 95 %, o al menos 98 % homólogo a la secuencia de ADN del CTP nativo o un fragmento codificante del péptido de esta.
- 30 En una modalidad, al menos una de las secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica puede estar truncada. En otra modalidad, 2 de las secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica están truncadas. En otra modalidad, las 3 secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica están truncadas. En una modalidad, el CTP truncado comprende los primeros 10 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 3. La sec. con núm. de ident.: 3 comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (AA): SSSSKAPPPSLP.
- 35 En una modalidad, el CTP truncado comprende los primeros 10 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4. La sec. con núm. de ident.: 4 comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (AA): SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ.
- 40 En una modalidad, el CTP truncado comprende los primeros 11 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4 o los primeros 12 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4. En una modalidad, el CTP truncado comprende los primeros 8 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4 o la sec. con núm. de ident.: 3. En una modalidad, el CTP truncado comprende los primeros 13 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4 o los primeros 14 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4. En una modalidad, el CTP truncado comprende los primeros 6 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4 o la sec. con núm. de ident.: 3. En una modalidad, el CTP truncado comprende los primeros 5 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4 o la sec. con núm. de ident.: 3.
- 45 En una modalidad, al menos una de las secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica está glicosilada. En otra modalidad, 2 de las secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica están glicosiladas. En otra modalidad, las 3 secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica están glicosiladas.
- 50 En una modalidad, la secuencia CTP de la presente invención comprende al menos un sitio de glicosilación. En una modalidad, la secuencia CTP comprende 2 sitios de glicosilación. En una modalidad, la secuencia CTP comprende 3 sitios de glicosilación. En una modalidad, la secuencia CTP comprende 4 sitios de glicosilación. En una modalidad, una o más de las secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica están completamente glicosiladas. En otra modalidad, una o más de las secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica
- 55
- 60
- 65

están parcialmente glicosiladas. En una modalidad, parcialmente glicosilado indica que uno de los sitios de glicosilación del CTP está glicosilado. En otra modalidad, dos de los sitios de glicosilación del CTP están glicosilados. En otra modalidad, tres de los sitios de glicosilación del CTP están glicosilados.

5 En algunas modalidades, la modificación de la secuencia del CTP es ventajosa porque permite el uso de menores dosificaciones. En algunas modalidades, la modificación de la secuencia del CTP es ventajosa porque permite menos dosificaciones. En algunas modalidades, la modificación de la secuencia del CTP es ventajosa porque permite un efecto seguro, de acción prolongada.

10 En algunas modalidades, "polipéptido", "factor de coagulación modificado genéticamente" o "proteína" como se usan en la presente, abarca polipéptidos nativos (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 modalidades, modificaciones que hacen que los polipéptidos que comprenden un factor de coagulación sean incluso más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar a las células.

15 Como se usa en la presente, los términos "aminoácido" o "secuencia de aminoácidos" se entiende que incluyen los 20 aminoácidos de origen natural; los aminoácidos frecuentemente modificados postraduccionalmente in vivo, que incluyen, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos inusuales que incluyen, pero sin limitarse a, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. En una modalidad, "aminoácido" incluye D- y L-aminoácidos.

20 En algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención se utilizan en agentes terapéuticos que requieren que los polipéptidos que comprenden un factor de coagulación estén en una forma soluble. En algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención incluyen uno o más aminoácidos polares naturales o no naturales, que incluyen pero sin limitarse a serina y treonina que son capaces de aumentar la solubilidad del polipéptido debido a su cadena lateral que contiene hidroxilo.

25 En algunas modalidades, los factores de coagulación modificados genéticamente de la presente invención se sintetizan bioquímicamente tal como mediante el uso de técnicas estándar en fase sólida. En algunas modalidades, estos métodos bioquímicos incluyen síntesis exclusiva en fase sólida, síntesis parcial en fase sólida, condensación de fragmentos, o síntesis clásica en solución.

30 En algunas modalidades, se usan técnicas de proteínas recombinantes para generar los factores de coagulación modificados genéticamente de la presente invención. En algunas modalidades, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la generación de polipéptidos relativamente largos (por ejemplo, más largos que 18-25 aminoácidos). En algunas modalidades, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la generación de grandes cantidades de los factores de coagulación modificados genéticamente de la presente invención. En algunas modalidades, las técnicas recombinantes se describen por Bitter y otros, (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier y otros (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson y otros (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu y otros (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi y otros (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 y Brogli y otros, (1984) *Science* 224:838-843, Gurley y otros (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 y Weissbach y Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, pp 421-463.

35 En una modalidad, la invención proporciona una molécula polinucleotídica que consiste en la porción codificante de un gen que codifica un polipéptido que comprende un factor de coagulación y péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina unidos al carboxilo terminal del factor de coagulación, como se describió anteriormente.

40 En una modalidad, la invención proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina unidos al carboxilo terminal del factor de coagulación, como se describió anteriormente. En una modalidad, el polinucleótido es una secuencia de polinucleótido. En una modalidad, el polinucleótido es una molécula polinucleotídica.

45 En la presente se describe un vector de expresión que comprende una molécula polinucleotídica. El vector de expresión puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido modificado con CTP que consiste en un polipéptido del factor IX (FIX) y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX. El vector de expresión puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido modificado con CTP que consiste en un polipéptido del factor VIIa (FVIIa) y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa.

50 Se describe, además, una célula que comprende el vector de expresión como se describe en la presente. La célula puede comprender un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido modificado con CTP que consiste en un polipéptido del factor IX (FIX) y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX. La célula puede comprender un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido modificado con CTP que consiste en un polipéptido del

factor VIIa (FVIIa) y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa.

5 Se describe, además, una composición que comprende el vector de expresión descrito en la presente. La composición puede comprender un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido modificado con CTP que consiste en un polipéptido del factor IX (FIX) y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX. La composición puede comprender un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido modificado con CTP que consiste en un polipéptido del factor VIIa (FVIIa) y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa.

También se describe una composición que comprende la célula como se describe en la presente. La célula puede ser una célula eucariota, o una célula procariota.

15 En otra modalidad, la invención proporciona un método para producir un polipéptido del factor IX (FIX) modificado con CTP, que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX, para producir así un polipéptido del FIX modificado con CTP. En otra modalidad, la invención proporciona un método para producir un polipéptido del factor VIIa (FVIIa) modificado con CTP, que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa, para producir así un polipéptido del FVIIa modificado con CTP.

20 En otra modalidad, los factores de coagulación modificados genéticamente de la presente invención pueden sintetizarse mediante el uso de una molécula polinucleotídica que codifica un polipéptido de la presente invención. En algunas modalidades, la molécula polinucleotídica que codifica al factor de coagulación modificado genéticamente se liga a un vector de expresión, que comprende un control de la transcripción de una secuencia reguladora en cis (por ejemplo, secuencia promotora). En algunas modalidades, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión constitutiva de un factor de coagulación modificado genéticamente, o para dirigir la expresión con especificidad tisular, o para dirigir la expresión inducible de los factores de coagulación modificados genéticamente de la presente invención como se describe en la presente.

30 Los promotores de especificidad tisular, adecuados para usar con la presente invención, incluyen secuencias que son funcionales en una o más poblaciones celulares específicas. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, promotores tales como el de la albúmina que es específico del hígado [Pinkert y otros, (1987) Genes Dev. 1:268-277], promotores específicos de tejido linfoide [Calame y otros, (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]; en particular promotores de receptores de células T [Winoto y otros, (1989) EMBO J. 8:729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji y otros (1983) Cell 33729-740], promotores específicos de neuronas tal como el promotor de neurofilamentos [Byrne y otros (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 86:5473-5477], promotores específicos de páncreas [Edlunch y otros (1985) Science 230:912-916] o promotores específicos de glándulas mamarias tal como el promotor del suero de leche (patente de EE.UU. núm. 4,873,316 y publicación de patente europea núm. 264,166). Los promotores inducibles adecuados para usar con la presente invención incluyen, por ejemplo, el promotor inducible por tetraciclina (Srouf, M.A., y otros, 2003. Thromb. Haemost. 90: 398-405).

45 En una modalidad, la frase "una molécula polinucleotídica" se refiere a una secuencia de ácido nucleico monocatenario o bicatenario que se aísla y se proporciona en la forma de una secuencia de ARN, una secuencia de polinucleótido complementaria (ADNc), una secuencia de polinucleótido genómica y/o una secuencia de polinucleótido compuesta (por ejemplo, una combinación de lo anterior).

50 En una modalidad, después de la expresión y la secreción, los péptidos señal se escinden de los factores de coagulación modificados genéticamente precursores lo que resulta en los factores de coagulación modificados genéticamente maduros.

55 En algunas modalidades, los polinucleótidos de la presente invención pueden prepararse mediante el uso de técnicas de PCR, o cualquier otro método o procedimiento conocido por un experto en la técnica. En algunas modalidades, el procedimiento implica la ligadura de dos secuencias de ADN diferentes (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel y otros, John Wiley & Sons, 1992).

60 En una modalidad, los polinucleótidos que codifican los factores de coagulación modificados genéticamente se insertan en los vectores de expresión (es decir, una construcción de ácido nucleico) para permitir la expresión del polipéptido recombinante. En una modalidad, el vector de expresión incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación y la integración en procariotas. En otra modalidad, el vector de expresión incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación y la integración en eucariotas. En una modalidad, el vector de expresión incluye un vector lanzadera que hace que este vector sea adecuado para la replicación y la integración en procariotas y eucariotas. En algunas modalidades, los vectores de clonación comprenden secuencias de iniciación de la transcripción y la traducción (por ejemplo, promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y la traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación).

- 5 Puede usarse una variedad de células procariotas o eucariotas como sistemas de expresión en un huésped para expresar los factores de coagulación de la presente invención. Estas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con un ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vector de expresión de ADN cósmido que contiene la secuencia codificante del polipéptido; levadura transformada con vectores de expresión recombinante en levaduras que contienen la secuencia codificante del polipéptido; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión recombinantes en virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes, como el plásmido Ti, que contiene la secuencia codificante del polipéptido.
- 10 En algunas modalidades, se usan sistemas de expresión no bacterianos (por ejemplo sistemas de expresión en mamíferos, como las células CHO) para expresar los factores de coagulación de la presente invención. En una modalidad, el vector de expresión usado para expresar los polinucleótidos de la presente invención en células de mamífero es el vector pCI-DHFR que comprende un promotor de CMV y un gen de resistencia a la neomicina. La construcción del vector pCI-dhfr se describe, de acuerdo con una modalidad, en el ejemplo 1.
- 15 En los sistemas bacterianos puede seleccionarse ventajosamente una serie de vectores de expresión en dependencia del uso previsto para el polipéptido expresado. En una modalidad, se desean grandes cantidades de polipéptido. Pueden ser convenientes los 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 hacia el periplasma de las bacterias o el medio de cultivo donde el producto proteico se purifica fácilmente. Ciertas proteínas de fusión se modifican genéticamente con un sitio de escisión específico para ayudar a recuperar el polipéptido. Los vectores que pueden adaptarse a dicha manipulación incluyen, pero no se limitan a, la serie pET de los vectores de expresión de *E. coli* [Studier y otros, *Methods in Enzymol.* 185:60-89 (1990)].
- 20 En una modalidad, se usan sistemas de expresión en levaduras. Una serie de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles puede usarse en levaduras como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. núm.: 5,932,447. También pueden usarse los vectores que promueven la integración de secuencias de ADN foráneo en el cromosoma de levadura.
- 25 El vector de expresión puede incluir, además, secuencias de polinucleótidos adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de numerosas proteínas a partir de un único ARNm tal como un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y secuencias para la integración genómica del promotor-polipéptido quimérico.
- 30 Los vectores de expresión adecuados para mamíferos incluyen, pero no se limitan 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 de Invitrogen, pCI que está disponible de Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles de Strategene, pTRES que está disponible de Clontech, y sus derivados.
- 35 En la presente invención se usan vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus de eucariotas tal como los retrovirus. Los vectores de SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. Se describe, además, que 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 ilustrativos incluyen pMSG, pAV009/A+, pMT010/A+, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus, y cualquier otro vector que permita 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 la polihedrina, u otros promotores que han demostrado su eficacia para la expresión en células eucariotas.
- 40 En algunas modalidades, 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 la infección lateral y la especificidad dirigida. En una modalidad, los vectores virales se producen de manera que no son capaces de propagarse lateralmente; esta característica puede ser útil si el propósito deseado es introducir un gen específico solamente en un número localizado de células diana.
- 45 Pueden usarse diversos métodos para introducir el vector de expresión a las células. Dichos métodos se describen generalmente en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang y otros, *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega y otros, *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa y otros [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, véase las patentes de EE.UU. núms. 5,464,764 y 5,487,992 para los métodos de selección positiva-negativa.
- 50 Se apreciará que aparte de contener los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica al polipéptido), la construcción de expresión de la presente invención puede
- 55
- 60
- 65

incluir, además, secuencias modificadas genéticamente para optimizar la estabilidad, la producción, la purificación, el rendimiento o la actividad del polipéptido expresado.

5 En algunas modalidades, las células transformadas se cultivan en condiciones eficaces, que permitan la expresión de grandes cantidades de factores de coagulación recombinantes modificados genéticamente. En algunas modalidades, las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero no se limitan a, medios eficaces, condiciones del biorreactor, temperatura, pH y oxígeno que permitan la producción de proteínas. En una modalidad, un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el cual se cultiva una célula para producir el polipéptido recombinante de la presente invención. En algunas modalidades, un medio típicamente incluye una solución acuosa que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables, y sales, minerales, metales y otros nutrientes adecuados, como las vitaminas. En algunas modalidades, las células pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas Petri. En algunas modalidades, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno adecuados para una célula recombinante. La determinación de las condiciones de cultivo está dentro de la experiencia de un experto en la técnica.

15 En dependencia del sistema de vector y huésped usado para la producción, los factores de coagulación modificados genéticamente resultantes de la presente invención lo mismo permanecen dentro de la célula recombinante, se secretan hacia el medio de fermentación, se secretan hacia un espacio entre dos membranas celulares, tal como el espacio periplasmático en *E. coli*; o son retenidos en la superficie externa de una membrana celular o viral.

20 En una modalidad, después de un tiempo predeterminado en cultivo, se lleva a cabo la recuperación del factor de coagulación recombinante modificado genéticamente. La frase "recuperar el factor de coagulación recombinante modificado genéticamente" que se usa en la presente puede referirse a recolectar todo el medio de fermentación que contiene el polipéptido y no necesariamente implica etapas adicionales de separación o purificación.

25 En una modalidad, los factores de coagulación modificados genéticamente de la presente invención se purifican mediante el uso de una variedad de técnicas estándar de purificación de proteínas, tales como, pero sin limitarse a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía por interacciones hidrofóbicas, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía con concanavalina A, cromatoenfoco y solubilización diferencial.

35 En una modalidad, para facilitar la recuperación, la secuencia codificante expresada puede modificarse genéticamente para codificar el factor de coagulación modificado genéticamente de la presente invención y un resto escindible fusionado. En una modalidad, una proteína de fusión puede diseñarse de manera que el polipéptido se pueda aislar fácilmente mediante cromatografía de afinidad; por ejemplo, mediante inmovilización en una columna específica para el resto escindible. En una modalidad, un sitio de escisión se modifica genéticamente entre el factor de coagulación modificado genéticamente y el resto escindible y el polipéptido puede liberarse de la columna cromatográfica mediante el tratamiento con una enzima o agente adecuados que escindan específicamente la proteína de fusión en este sitio [por ejemplo, véase Booth y otros, *Immunol. Lett.* 19:65-70 (1988); y Gardella y otros, *J. Biol. Chem.* 265:15854-15859 (1990)].

40 En una modalidad, el factor de coagulación modificado genéticamente de la presente invención se recupera en una forma "sustancialmente pura". En una modalidad, la frase "sustancialmente pura" se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína en las aplicaciones descritas en la presente.

45 En una modalidad, el factor de coagulación modificado genéticamente de la presente invención puede sintetizarse, además, mediante el uso de sistemas de expresión in vitro. En una modalidad, los métodos de síntesis in vitro se conocen bien en la técnica y los componentes del sistema están disponibles comercialmente.

50 En algunas modalidades, los factores de coagulación recombinantes modificados genéticamente se sintetizan y purifican; su eficacia terapéutica puede analizarse in vivo o in vitro. En una modalidad, las actividades de unión de los factores de coagulación recombinantes modificados genéticamente de la presente invención pueden determinarse mediante el uso de diversos ensayos como conoce el experto en la técnica.

55 En la presente se describe que el factor de coagulación modificado genéticamente de la presente invención puede proporcionarse al individuo per se. En una modalidad, el factor de coagulación modificado genéticamente de la presente invención puede proporcionarse al individuo como parte de una composición farmacéutica donde se mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable.

60 En otra modalidad, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente con otros componentes químicos como los portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

65 En otra modalidad, "ingrediente activo" se refiere a la secuencia polipeptídica de interés, que es responsable del efecto biológico.

La descripción proporciona preparaciones combinadas donde "una preparación combinada" define especialmente un "estuche de partes" en el sentido de que las parejas de combinación como se definió anteriormente pueden dosificarse independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades características de las parejas de combinación, es decir, de manera simultánea, concurrente, separada o secuencial. Las partes del estuche de partes pueden administrarse después, por ejemplo, simultánea o cronológicamente escalonadas, o sea, en puntos de tiempo diferentes y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del estuche de partes. La relación de las cantidades totales de las parejas de combinación puede administrarse en la preparación combinada. La preparación combinada puede variarse, por ejemplo, para hacer frente a las necesidades de una subpoblación de pacientes que se va a tratar o a las necesidades del paciente individual en el cual las diferentes necesidades pueden deberse a una enfermedad en particular, a la severidad de una enfermedad, la edad, el sexo, o el peso corporal como puede realizar fácilmente un experto en la técnica.

En otra modalidad, las frases "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" que se usan indistintamente se refieren a un portador o un diluyente que no provoca una irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado. En estas frases se incluye un adyuvante. En una modalidad, uno de los ingredientes incluidos en el portador farmacéuticamente aceptable puede ser por ejemplo polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio intervalo de solubilidad tanto en medios orgánicos como acuosos (Mutter y otros (1979)).

En otra modalidad, "excipiente" se refiere a una sustancia inerte que se añade a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. En una modalidad, los excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados celulósicos, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Las técnicas para la formulación y la administración de fármacos se encuentran en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Esta invención contempla varias modalidades de los intervalos de dosificación. La dosificación del factor de coagulación modificado genéticamente de la presente invención, en una modalidad, está en el intervalo de 0,005-100 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 0,005-5 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 0,01-50 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 0,1-20 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 0,1-10 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 0,01-5 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 0,001-0,01 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 0,001-0,1 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 0,1-5 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 0,5-50 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 0,2-15 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 0,8-65 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 1-50 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 5-10 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 8-15 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en un intervalo de 10-20 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 20-40 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en un intervalo de 60-120 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 12-40 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 40-60 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en un intervalo de 50-100 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en un intervalo de 1-60 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 15-25 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 5-10 mg/día. En otra modalidad, la dosificación está en el intervalo de 55-65 mg/día.

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

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

En una modalidad, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es 1-5 mg/día. En una modalidad, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es 1-3 mg/día. En otra modalidad, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es 2 mg/día.

En otra modalidad, la dosificación es 1-90 mg/día. En otra modalidad, la dosificación es 1-90 mg/2 días. En otra

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

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

En otra modalidad, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención se formula en una forma de dosificación intranasal. En otra modalidad, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se formula en una forma de dosificación inyectable. En otra modalidad, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0,0001 mg a 0,6 mg. En otra modalidad, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0,001 mg a 0,005 mg. En otra modalidad, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0,005 mg a 0,01 mg. En otra modalidad, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0,01 mg a 0,3 mg. En otra modalidad, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0,2 mg a 0,6 mg. En otra modalidad, el factor de coagulación está libre de CTP en su amino terminal.

Se describe que un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 1-100 microgramos, o en una dosis en el intervalo de 10-80 microgramos, o en una dosis en el intervalo de 20-60 microgramos, o en una dosis en el intervalo de 10-50 microgramos, o en una dosis en el intervalo de 40-80 microgramos, o en una dosis en el intervalo de 10-30 microgramos, o en una dosis en el intervalo de 30-60 microgramos.

En otra modalidad, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0,2 mg a 2 mg, o en una dosis en el intervalo de 2 mg a 6 mg, o en una dosis en el intervalo de 4 mg a 10 mg, o en una dosis en el intervalo de 5 mg y 15 mg.

En una modalidad, la dosificación del FIX modificado con CTP comprende el 50 % de la cantidad de FIX administrado en la dosificación recomendada del FIX recombinante (por ejemplo, Benefix®, Wyeth o Mononine®, CSL Behring) a los pacientes durante el mismo periodo de tiempo. En otra modalidad, la dosificación del FVIIa modificado con CTP comprende el 50 % de la cantidad de FVIIa administrado en la dosificación recomendada del FVIIa recombinante (por ejemplo, NovoSeven®) a los pacientes durante el mismo periodo de tiempo. En otra modalidad, la dosificación del FVII modificado con CTP comprende el 50 % de la cantidad de FVII administrado en la dosificación recomendada del FVII recombinante a los pacientes durante el mismo periodo de tiempo. Por ejemplo, si NovoSeven® se administra a una dosis de 90 mcg/kg cada dos horas a un paciente pre- o postoperatorivamente (es decir, 7,65 mg cada dos horas o 45,9 mg en seis dosis en un periodo de 12 horas, para un paciente de 85 kg), un factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención puede administrarse a una dosis que es el 50 % de la dosis de FVIIa recombinante en 12 horas de un paciente (es decir, a una dosis de 23 mg administrados una vez en un periodo de 12 horas).

En otra modalidad, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es de manera que contiene el 45 % de la cantidad del factor de coagulación que se administra cuando se usa el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra modalidad, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es de manera que contiene el 10 % de la cantidad del factor de coagulación que se administra cuando se usa el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra modalidad, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es de manera que contiene el 25 % de la cantidad del factor de coagulación que se administra cuando se usa el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra modalidad, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es de manera que contiene el 35 % de la cantidad del factor de coagulación que se administra cuando se usa el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra modalidad, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es de manera que contiene el 75 % de la cantidad del factor de coagulación que se administra cuando se usa el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra modalidad, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es de manera que contiene el 100 % de la cantidad del factor de coagulación que se administra cuando se usa el factor de coagulación sin modificación con CTP. Sin embargo, incluso si la dosificación contiene la misma cantidad del factor de coagulación (por ejemplo FIX) que el factor de coagulación sin modificación con CTP, todavía es ventajosa para los sujetos en el hecho de que se administrará menos frecuentemente debido a su mayor tiempo de vida media en comparación con los factores de coagulación recombinantes.

5 En otra modalidad, una cantidad con eficacia terapéutica de un factor de coagulación conjugado está entre 50-500 UI por kg de peso corporal administrada una vez al día a una vez a la semana para FIX o 10 µg/Kg-500 µg/Kg para FVIIa. En otra modalidad, una cantidad con eficacia terapéutica de un factor de coagulación conjugado es 150-250 UI por kg de peso corporal, administrada una vez al día. En otra modalidad, una composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación conjugado se formula a una concentración eficaz para la administración mediante diversos medios a un paciente humano.

10 En una modalidad, FIX se administra en una cantidad eficaz para llevar la actividad del Factor IX circulante a 20-30 UI/dl en un sujeto. En otra modalidad, FIX se administra en una cantidad eficaz para llevar la actividad del Factor IX circulante a 25-50 UI/dl en un sujeto. En otra modalidad, FIX se administra en una cantidad eficaz para llevar la actividad del Factor IX circulante a 50-100 UI/dl en un sujeto. En otra modalidad, FIX se administra en una cantidad eficaz para llevar la actividad del Factor IX circulante a 100-200 UI/dl en un sujeto. En otra modalidad, FIX se administra en una cantidad eficaz para llevar la actividad del Factor IX circulante a 10-50 UI/dl en un sujeto. En otra modalidad, FIX se administra en una cantidad eficaz para llevar la actividad del Factor IX circulante a 20-100 UI/dl en un sujeto.

20 En una modalidad, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto semanalmente. En otra modalidad, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto dos veces a la semana. En otra modalidad, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto bisemanalmente (una vez cada dos semanas). En otra modalidad, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto dos veces al mes. En otra modalidad, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto una vez al mes. En otra modalidad, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto diariamente. En otra modalidad, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto cada dos días.

25 En otra modalidad, el factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención se administra a un sujeto una vez cada tres días, una vez cada cuatro días, una vez cada cinco días, una vez cada seis días, una vez cada 7-14 días, una vez cada 10-20 días, una vez cada 5-15 días, o una vez cada 15-30 días.

30 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para reducir la frecuencia de dosificación de un polipéptido del factor IX (FIX), que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX, para así reducir la frecuencia de dosificación de dicho polipéptido del FIX. En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para reducir la frecuencia de dosificación de un polipéptido del factor VIIa (FVIIa), que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa, para así reducir la frecuencia de dosificación de dicho polipéptido de FVIIa.

40 Se describe que los métodos de la invención dan como resultado aumentar la satisfacción en el uso de la terapia con factores de coagulación. El término satisfacción comprende adherencia. Se describe, además, que la invención aumenta la satisfacción de los pacientes con necesidad de una terapia con factores de coagulación mediante la reducción de la frecuencia de administración del factor de coagulación. Se describe, además, que la reducción en la frecuencia de administración del factor de coagulación se logra debido a las modificaciones con CTP que hacen que el factor de coagulación modificado con CTP sea más estable. Se describe, además, que la reducción en la frecuencia de administración del factor de coagulación se logra como resultado de aumentar el T<sub>1/2</sub> del factor de coagulación. Se describe, además, que la reducción en la frecuencia de administración del factor de coagulación se logra como resultado de aumentar el tiempo de aclaramiento o reducir la velocidad de aclaramiento del factor de coagulación.

50 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para reducir la velocidad de aclaramiento de un polipéptido del factor IX (FIX), que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX, para así reducir la velocidad de aclaramiento de dicho polipéptido del FIX. En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para reducir la velocidad de aclaramiento de un polipéptido del factor VIIa (FVIIa), que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa, para así reducir la velocidad de aclaramiento de dicho polipéptido de FVIIa.

55 En otra modalidad, la reducción en la frecuencia de administración del factor de coagulación se logra como resultado de aumentar la medida de AUC del factor de coagulación.

60 En una modalidad de la invención, en la presente se proporciona un método para reducir la frecuencia de dosificación de un factor de coagulación, que comprende la etapa de unir tres CTP al carboxilo terminal del factor de coagulación, para así reducir la frecuencia de dosificación del factor de coagulación.

65 En otra modalidad, la presente invención muestra que las composiciones proporcionadas en la presente sorprendentemente se absorben más eficazmente hacia el torrente sanguíneo después de la administración SC (véase los ejemplos 7-9 en la presente). La posibilidad de administrar el FVIIa por vía subcutánea constituye una

ventaja ya que puede usarse para aplicaciones profilácticas. Además es mucho más fácil que los pacientes se inyecten ellos mismos las inyecciones subcutáneas, y son una ventaja cuando los pacientes son muy jóvenes y sus venas son pequeñas y difíciles de encontrar.

5 La administración oral, en una modalidad, comprende una forma de dosificación unitaria que comprende tabletas, cápsulas, pastillas, tabletas masticables, suspensiones, emulsiones y similares. Dichas formas de dosificación unitaria comprenden una cantidad segura y eficaz del factor de coagulación deseado de la invención, cada una de las cuales es, en una modalidad, de aproximadamente 0,7 o 3,5 mg a aproximadamente 280 mg/70 kg, o en otra modalidad, aproximadamente 0,5 o 10 mg a aproximadamente 210 mg/70 kg. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de las formas de dosificación unitaria para la administración peroral se conocen bien en la técnica. En algunas modalidades, las tabletas comprenden típicamente adyuvantes farmacéuticamente compatibles convencionales como diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, manitol, lactosa y celulosa; aglutinantes como almidón, gelatina y sacarosa; desintegrantes como almidón, ácido algínico y croscarmelosa; lubricantes como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. En una modalidad, los deslizantes como el dióxido de silicio pueden usarse para mejorar las características de flujo de la mezcla en polvo. En una modalidad, pueden añadirse agentes colorantes, tal como los colorantes FD&C para la apariencia. Los agentes edulcorantes y saborizantes, tales como aspartamo, sacarina, mentol, menta y saborizantes de frutas, son adyuvantes útiles para las tabletas masticables. Típicamente las cápsulas comprenden uno o más diluyentes sólidos descritos anteriormente. En algunas modalidades, la selección de los componentes portadores depende de consideraciones secundarias como el gusto, el costo y la estabilidad en almacenaje, que no son críticos para los propósitos de esta invención, y puede realizarse fácilmente por un experto en la técnica.

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

Las composiciones perorales, en algunas modalidades, comprenden soluciones, emulsiones, suspensiones líquidas, y similares. En algunas modalidades, los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de tales composiciones se conocen bien en la técnica. En algunas modalidades, las composiciones orales líquidas comprenden de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,933 % del compuesto o compuestos deseados, o en otra modalidad, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 10 %.

En algunas modalidades, las composiciones para uso médico de esta invención comprenden soluciones o emulsiones, que pueden ser soluciones o emulsiones acuosas que comprenden una cantidad segura y eficaz de los compuestos de la presente invención y opcionalmente, otros compuestos, previstos para una administración intranasal tópica. En algunas modalidades, las composiciones h comprenden de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 10,0 % en p/v de un compuesto objetivo, con mayor preferencia de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2,0, que se usa para la administración sistémica de los compuestos mediante la vía intranasal.

En otra modalidad, el factor de coagulación modificado con CTP puede inyectarse en el músculo (inyección intramuscular), o puede inyectarse debajo de la piel (inyección subcutánea), o inyectarse en la piel, o administrarse por medio de administración sistémica, o administrarse por inyección intravenosa. En otra modalidad, la administración puede ser administración parenteral, pulmonar, oral, tópica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, transnasal, intraocular, oftálmica, epidural, bucal, rectal, transmucosal, intestinal o parenteral, que incluye inyecciones intramedulares así como administración intratecal o intraventricular directa.

En otra modalidad, la preparación se administra de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, por medio de la inyección de la preparación directamente en una región específica del cuerpo de un paciente.

55 En una modalidad, la vía de administración puede ser enteral. En otra modalidad, la vía puede ser conjuntival, transdérmica, intradérmica, intraarterial, vaginal, rectal, intratumoral, paracanceral, transmucosal, intramuscular, intravascular, intraventricular, intracraneal, intranasal, sublingual, o una combinación de estas.

En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por inyección intravenosa, intraarterial, o intramuscular de una preparación líquida. En algunas modalidades, las formulaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En una modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa, y se formulan por lo tanto en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intraarterial y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intraarterial. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intramuscular, y se formulan por lo tanto en una forma adecuada para la administración intramuscular.

Además, en otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran de manera tópica a las superficies corporales, y se formulan por lo tanto en una forma adecuada para la administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, ungüentos, cremas, lociones, gotas y similares. Para la administración tópica, los compuestos de la presente invención se combinan con un agente o agentes terapéuticos adecuados adicionales, preparados y aplicados como soluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un portador farmacéutico.

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se fabrican mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, producción de grajeas, levigación, emulsión, encapsulado, atrapamiento o liofilización.

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas para usar de acuerdo con la presente invención se formulan de una manera convencional mediante el uso de uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en las preparaciones, las cuales pueden usarse farmacéuticamente. En una modalidad, la formulación depende de la vía de administración escogida. En una modalidad, los inyectables de la invención se formulan en soluciones acuosas. En una modalidad, los inyectables de la invención se formulan en tampones fisiológicamente compatibles como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón de solución salina fisiológica. En algunas modalidades, para la administración transmucosal, en la formulación se usan penetrantes adecuados para la barrera que se va a penetrar. Dichos penetrantes generalmente se conocen en la técnica.

En una modalidad, las preparaciones descritas en la presente se formulan para una administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección por bolo o infusión continua. En algunas modalidades, las formulaciones para inyección se presentan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis con opcionalmente, un conservante adicionado. En algunas modalidades, las composiciones son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones comprenden, además, conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal y similares; agentes quelantes, como edetato de sodio y otros; tampones como fosfato, citrato y acetato; agentes de tonicidad como cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerina, manitol y otros; antioxidantes como ácido ascórbico, acetilcistina, metabisulfito de sodio y otros; agentes aromáticos; agentes de ajuste de la viscosidad, tales como polímeros, que incluyen celulosa y derivados de esta; y polivinil alcohol y ácidos y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas según se necesite. Las composiciones pueden comprender, además, anestésicos locales u otros activos. Las composiciones pueden usarse como aerosoles, neblinas, gotas y similares.

En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los ingredientes activos, en algunas modalidades, se preparan como suspensiones adecuadas para inyección basadas en aceite o agua. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen, en algunas modalidades, aceites grasos como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección contienen, en algunas modalidades, sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. En otra modalidad, la suspensión contiene, además, estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

En otra modalidad, el compuesto activo puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat y otros, en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez- Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; J. E. Diederichs y al., *Pharm./nd.* 56 (1994) 267- 275).

En otra modalidad, la composición farmacéutica suministrada en un sistema de liberación controlada se formula para la infusión intravenosa, bomba osmótica implantable, parche transdérmico, liposomas, u otros modos de administración. En una modalidad, se usa una bomba (véase Langer, más arriba; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald y otros, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek y otros, *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989). En otra modalidad, pueden usarse materiales poliméricos. Aún en otra modalidad, un sistema de liberación controlada puede colocarse próximo al blanco terapéutico, por ejemplo, el cerebro, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, más arriba, vol. 2, pp. 115-138 (1984). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (*Science* 249: 1527-1533 (1990).

En algunas modalidades, el ingrediente activo está en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, solución a base de agua, estéril, libre de pirógenos, antes del uso. Las composiciones se formulan, en algunas modalidades, para la administración por atomización e inhalación. En otra modalidad, las composiciones están contenidas en un contenedor con medios de atomización adheridos.

En una modalidad, la preparación de la presente invención se formula en composiciones rectales tal como supositorios o enemas de retención, mediante el uso, por ejemplo, de bases convencionales de supositorios tal como manteca de cacao u otros glicéridos.

5 En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas adecuadas para usar en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos se contienen en una cantidad eficaz para lograr el propósito deseado. En algunas modalidades, una cantidad con eficacia terapéutica significa una cantidad de ingredientes activos eficaces para usar en la prevención, alivio o mejoría de los síntomas de una enfermedad o  
10 prolongar la supervivencia del sujeto que se trata.

En una modalidad, la determinación de una cantidad con eficacia terapéutica está dentro de la habilidad de los expertos en la técnica.

15 Algunos ejemplos de sustancias que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables o componentes de estos son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa, y metilcelulosa; 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 maní, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva,  
20 aceite de maíz y aceite de theobroma; polioles tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido alginico; emulsionantes, tales como los emulsionantes de la marca Tween™; agentes humectantes, tales como lauril sulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes; agentes de formación de tabletas, estabilizadores; antioxidantes; conservantes; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; y soluciones tampón de fosfato. La elección de un portador farmacéuticamente aceptable para usarse junto con el compuesto se  
25 determina básicamente por la manera en que el compuesto se va a administrar. Si el compuesto objetivo es para inyectar, en una modalidad, el portador farmacéuticamente aceptable es solución salina fisiológica, estéril, con un agente de suspensión compatible con la sangre, cuyo pH se ha ajustado a aproximadamente 7,4.

Adicionalmente, las composiciones pueden comprender además aglutinantes (por ejemplo acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma de guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil metil celulosa, povidona),  
30 agentes desintegrantes (por ejemplo almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma de 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 prevenir la absorción a superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), inhibidores de proteasas, tensoactivos (por ejemplo, lauril sulfato de sodio), potenciadores de la permeación, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, glicerol de polietileno), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico, hidroxianisol butilado), estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa), agentes que aumentan la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etilcelulosa, goma de guar),  
40 edulcorantes (por ejemplo aspartamo, ácido cítrico), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por ejemplo ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, lauril sulfato de sodio), adyuvantes de flujo (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (por ejemplo carbómero, hidroxipropilcelulosa, laurilsulfato sódico), recubrimientos de polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y formadores de película (por ejemplo etilcelulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

45 Los componentes típicos de los portadores para jarabes, elixires, emulsiones y suspensiones incluyen etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, sacarosa líquida, sorbitol y agua. Para una suspensión, los agentes de suspensión típicos incluyen metil celulosa, carboximetilcelulosa sódica, celulosa (por ejemplo Avicel™, RC-591), tragacanto y alginato de sodio; los agentes humectantes típicos incluyen lecitina y sorbitán de óxido de polietileno  
50 (por ejemplo polisorbato 80). Los conservantes típicos incluyen metil parabeno y benzoato de sodio. En otra modalidad, las composiciones líquidas perorales contienen, además, uno o más componentes tales como edulcorantes, agentes saborizantes y colorantes descritos anteriormente.

55 En algunas modalidades, la preparación de una cantidad o dosis eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos in vitro. En una modalidad, una dosis puede formularse en modelos animales y dicha información puede usarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los seres humanos.

60 En una modalidad, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritas en la presente puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar in vitro, en cultivos celulares o animales experimentales. En una modalidad, los datos obtenidos a partir de estos ensayos in vitro y en cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para usar en el ser humano. En una modalidad, las dosificaciones varían en dependencia de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y dosificación puede ser elegida por el médico individual teniendo en cuenta la afeción del paciente. (Ver, por ejemplo Fingl y otros, 1975, en "The Pharmacological Basis of  
65 Therapeutics", C. 1 p.1].

En dependencia de la severidad y la capacidad de respuesta de la afección que se va a tratar, la dosificación puede ser de una única administración o una pluralidad de ellas, donde un curso de tratamiento puede durar de varios días a varias semanas o hasta que se logre la cura o la disminución del estado de la enfermedad.

5 La cantidad de una composición que se va a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se trata, la severidad de la afección, la manera de administración, el criterio del médico responsable, etcétera.

10 En una modalidad, las composiciones que incluyen la preparación de la presente invención formulada en un portador farmacéutico compatible se preparan, además, colocadas en un contenedor adecuado, y marcado para el tratamiento de una afección indicada.

15 En otra modalidad, un factor de coagulación como se describe en la presente es una preparación liofilizada (es decir, secada por congelación) en combinación con excipientes orgánicos complejos y estabilizadores tales como agentes tensoactivos no iónicos (es decir, surfactantes), diversos azúcares, polioles orgánicos y/o albúmina sérica humana. En otra modalidad, una composición farmacéutica comprende un factor de coagulación liofilizado como se describe en agua estéril para inyección. En otra modalidad, una composición farmacéutica comprende un factor de coagulación liofilizado como se describe en PBS estéril para inyección. En otra modalidad, una composición farmacéutica comprende un factor de coagulación liofilizado como se describe en NaCl al 0,9 % estéril para inyección.

20 En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende el factor de coagulación modificado con CTP como se describe en la presente y portadores complejos como albúmina sérica humana, polioles, azúcares y agentes estabilizantes tensoactivos aniónicos. En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende el factor de coagulación modificado con CTP como se describe en la presente y ácido lactobiónico y un tampón de acetato/glicina. En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende el factor de coagulación modificado con CTP como se describe en la presente y aminoácidos, tal como arginina o glutamato que aumentan la solubilidad de las composiciones de interferón en agua. En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación modificado con CTP, liofilizado, como se describe en la presente y glicina o albúmina sérica humana (HSA), un tampón (por ejemplo acetato) y un agente isotónico (por ejemplo NaCl). En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación modificado con CTP, liofilizado, como se describe en la presente y tampón fosfato, glicina y HSA.

35 En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente se estabiliza cuando se coloca en soluciones tamponadas que tienen un pH entre aproximadamente 4 y 7,2. En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación está en una solución tamponada que tiene un pH entre aproximadamente 4 y 8,5. En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación está en una solución tamponada que tiene un pH entre aproximadamente 6 y 7. En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación está en una solución tamponada que tiene un pH de aproximadamente 6,5. En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente se estabiliza con un aminoácido como un agente estabilizante y en algunos casos una sal (si el aminoácido no contiene una cadena lateral cargada).

45 En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente es una composición líquida que comprende un agente estabilizante entre aproximadamente 0,3 % y 5 % en peso el cual es un aminoácido.

50 En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente proporciona precisión de la dosificación y seguridad del producto. En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente proporciona una formulación líquida, estable, biológicamente activa, para usar en aplicaciones inyectables. En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación no liofilizado como se describe en la presente.

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

60 En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra modalidad, la composición farmacéutica inyectable que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra modalidad, la producción de micropartículas de lípidos mediante congelación por pulverización se describió por Speiser (Speiser y al., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54) seguido por nanogránulos de lípidos para la administración peroral (Speiser EP 0167825 (1990)). En otra modalidad, los lípidos que se usan se toleran bien por el cuerpo (por ejemplo glicéridos compuestos de ácidos grasos que están presentes en las emulsiones para la nutrición parenteral).

65

Las composiciones de la presente invención pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un estuche aprobado por la FDA, que contiene una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. En una modalidad, el envase, por ejemplo, comprende una lámina de metal o plástico, tal como un blíster. En una modalidad, el envase o dispositivo dispensador se acompaña de instrucciones para la administración. En una modalidad, el envase o dispensador incluye un aviso asociado con el contenedor en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de los productos farmacéuticos, dicho aviso es reflejo de la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Dicho aviso, en una modalidad, es el etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para los fármacos controlados, o el prospecto del producto aprobado.

Se apreciará que los factores de coagulación modificados con CTP de la presente invención pueden proporcionarse al individuo con agentes activos adicionales para lograr un mejor efecto terapéutico en comparación con el tratamiento con cada agente por sí mismo. En una modalidad, se toman medidas (por ejemplo, la dosificación y la selección del agente complementario) para evitar los efectos secundarios adversos que se asocian con las terapias de combinación.

En la presente se describe un método para tratar la hemofilia en un sujeto, que comprende administrar un polipéptido del factor VIIa (FVIIa) modificado con CTP que comprende un polipéptido de FVIIa y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa a dicho sujeto, para así tratar la hemofilia en dicho sujeto.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido del factor IX (FIX) modificado con CTP que consiste en un polipéptido del FIX y tres péptidos del carboxilo terminal (CTP) de la gonadotropina, unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX modificado con CTP. En una modalidad, al menos un CTP se une a dicho polipéptido del FIX por medio de un enlazador. En una modalidad, dicho enlazador es un enlace peptídico.

En una modalidad, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el polipéptido del FIX modificado con CTP.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido modificado con CTP que consiste en un polipéptido del factor IX (FIX) y tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina (CTP) unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX. En otra modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido, en donde la secuencia de dicho polinucleótido es como se expone en la sec. con núm. de ident.: 30. Como se conoce generalmente en la técnica, los péptidos y proteínas modificados de la invención pueden acoplarse a marcajes, fármacos, agentes de direccionamiento, portadores, soportes sólidos y similares, en dependencia de la aplicación deseada. Las formas marcadas de los agentes biológicos modificados pueden usarse para seguir su destino metabólico; los marcajes adecuados para este propósito incluyen, especialmente, marcajes con radioisótopos tales como yodo 131, tecnecio 99, indio 111, y similares. Los marcajes pueden usarse, además, para mediar la detección de las proteínas o péptidos modificados en sistemas de ensayo; en este caso, también pueden usarse los radioisótopos así como marcajes con enzimas, marcajes fluorescentes, marcajes cromogénicos y similares. El uso de tales marcajes es particularmente útil si el péptido o la proteína es en sí mismo un agente de direccionamiento tal como un anticuerpo o un ligando de un receptor.

Pueden emplearse técnicas de unión similares, junto con otras, para acoplar los péptidos y proteínas modificados de la invención a soportes sólidos. Cuando se acoplan, estos péptidos y proteínas modificados pueden usarse después como reactivos de afinidad para la separación de componentes deseados con los que se muestra una reacción específica.

Se describe, además, que los péptidos y proteínas modificados de la invención pueden usarse para generar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con estos nuevos compuestos. Estos anticuerpos son útiles en una variedad de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, en dependencia de la naturaleza de la actividad biológica del péptido o proteína no modificados. Debe entenderse que la invención proporciona anticuerpos que son inmunorreactivos con FIX, FVII o FVIIa modificados con CTP como se describe en la presente. En una modalidad, tales anticuerpos pueden usarse para distinguir o identificar los factores de coagulación modificados con CTP administrados con relación a los factores de coagulación endógenos. En otra modalidad, los anticuerpos pueden usarse para localizar los factores de coagulación modificados con CTP administrados.

Otros objetos, ventajas y características novedosas de la presente invención resultarán evidentes para una persona experta en la técnica luego del análisis de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Además, cada una de las diversas modalidades y aspectos de la presente invención tal como se expone en la presente descripción y como se reivindica en la sección de reivindicaciones más abajo encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

## Ejemplos

Generalmente, la nomenclatura usada en la presente y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican ampliamente en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y otros, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y otros, "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 y otros, "Recombinant ADN", Scientific American Books, Nueva York; Birren y otros (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se exponen en las patentes de EE.UU. núms. 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" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y otros (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8va Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la literatura científica y de patentes, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. núms. 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., y 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 y otros, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales.

25 Ejemplo 1

Generación y utilización del Factor de coagulación IX

30 Clonaje y expresión de la molécula de FIX recombinante:

Los clones del factor IX se construyeron en nuestro vector de expresión en eucariota pCI-neo (Promega, núm. de catálogo E1841). El clon del ORF del factor de coagulación IX de Homo sapiens se solicitó a "OriGene" (RC219065). Los cebadores se solicitaron a **Sigma-Genosys**.

35 Construcción de 301-1-pCI-neo-p200-11 (Factor IX-ctp x2):

Cebador 101: 5' GTTTAGTGAACCGTCAGAAT 3' (sec. con núm. de ident.: 36)

40 Cebador 103<sup>R</sup>: 5' TTGAGGAAGATGTTCTGTGA 3' (contiene el sitio de Sspl del factor IX) (sec. con núm. de ident.: 37)

Se realizó una reacción de PCR con el cebador 101 y el cebador 103<sup>R</sup> y ADN plasmídico, el clon de ADNc del factor IX (OriGene) RC219065) como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 1085 pb (pcr 10) y se purificó a partir del gel (el fragmento que contenía el amino terminal de la secuencia del factor IX).

45 Cebador 98: 5' ATTACAGTTGTCGCAGGTGA 3' (sec. con núm. de ident.: 38)

Cebador 99<sup>R</sup>: 5' GCTGGAGCTAGTGAGCTTTGTTTTTCTT 3' (sec. con núm. de ident.: 39)

Cebador 100: 5' GCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCC 3' (sec. con núm. de ident.: 40)

Cebador 27<sup>R</sup>: 5' TTTTACTGCATTCTAGTTGTGG 3' (sec. con núm. de ident.: 41)

50 Se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se realizó con el cebador 98 y el cebador 99<sup>R</sup> y ADN plasmídico, el clon de ADNc del factor IX (OriGene", RC219065) como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 540 pb.

La segunda reacción se realizó con el cebador 100 y el cebador 27<sup>R</sup> y ADN plasmídico de 402-2-p72-3 (hGH-CTP-CTP) como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 258 pb.

55 La última reacción (pcr 3) se realizó con los cebadores 98 y 27<sup>R</sup> y una mezcla de los productos de las dos reacciones anteriores como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 790 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se aisló el fragmento de Sspl -EcoRI (TA 3-3).

60 Otra reacción de PCR se realizó (pcr 12) con el cebador 101 y el cebador 27<sup>R</sup> y una mezcla de los productos de la pcr 10 y el fragmento de Sspl-EcoRI de la pcr 3 como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 1700 pb (Factor IX-ctp-ctp) y se ligó al vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01) (lig 180).

65 Se encontró un error en la secuencia del factor IX por lo que los fragmentos se volvieron a colocar para formar un inserto del Factor IX-ctp-ctp con la secuencia de ADN correcta.

TA- pcr 3-3 se digirió con Sspl y Xbal y se aisló el fragmento grande (vector). TA 180-4 se digirió con Sspl y Xbal y se aisló el fragmento pequeño (inserto) y se ligó al fragmento grande aislado de TA-pcr-3-3 digerido con Sspl y Xbal. El nuevo plásmido TA-183-2 se digirió con Sal I y NotI, y se aisló el inserto Factor IX-CTP-CTP (~1575 pb). Este fragmento se insertó en el vector de expresión pCI-neo de eucariotas (digerido con Sal I y Not I) para producir el clon 301-2-p200-11.

Construcción pCI-dhfr -Factor 9- ctpx2 (p223-4): El vector pCI-dhfr (p6-1) se digirió con SmaI y NotI. Factor IX-CTP-CTP (p200-11) se digirió con ASiSI F.I. y NotI. Los dos fragmentos se ligaron.

Construcción pCI-dhfr Factor 9-ctp x3 (p225-7): El vector pCI-dhfr OXM-CTP×3 (p216-4) se digirió con XbaI y ApaI. El factor IX-CTP-CTP (223-4) se digirió con XbaI y ApaI. Los dos fragmentos se ligaron.

Construcción pCI-dhfr Factor 9-ctp x3 T148A (p243-2): El plásmido p225-7 contenía treonina en la posición 148, dado que la versión más común del FIX contiene alanina en esta posición, la Thr se reemplazó por Ala mediante el uso del método de mutagénesis dirigida a un sitio.

Cebador 75: ctcccagttcaattacagct (sec. con núm. de ident.: 42)  
 Cebador 122r: ggaaaaactgcctcagcagcgggtgagc (sec. con núm. de ident.: 43)  
 Cebador 123: gtgctgaggcagttttcctgatgtggactat (sec. con núm. de ident.: 44)  
 Cebador 124r: caacacagtgggcagcag (sec. con núm. de ident.: 45)

Se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se realizó con el cebador 75 y el cebador 122r y ADN plasmídico p225-7 como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 692 pb y se purificó a partir del gel. Una segunda reacción de PCR se realizó con el cebador 123 y el cebador 124r y ADN plasmídico p225-7 como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~237 pb y se purificó a partir del gel. La tercera reacción de PCR de superposición se realizó con los cebadores 75 y 124r, y una mezcla de los productos de las dos reacciones anteriores como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 910 pb. Este producto de PCR de superposición se digirió con XbaI y NsiI y se volvió a ligar al plásmido p225-7 (digerido con XbaI y NsiI) para producir el Factor IX-ctpx3 T148A designado p243-2.

Construcción FIX-4CTP (p259-4): El fragmento 3,5CTP se aisló a partir de oxym-4CTP (p254-3) mediante las enzimas de restricción ApaI y XbaI. El fragmento FIX+0,5CTP se aisló a partir de FIX-3CTP (p243-2) con las enzimas de restricción ApaI y XbaI. Los dos fragmentos se ligaron.

Construcción FIX-5CTP (p260-18): El fragmento 4,5CTP se aisló a partir de oxym-5CTP (255-1) mediante las enzimas de restricción ApaI y XbaI. El fragmento FIX+0,5CTP se aisló a partir de FIX-3CTP (p243-2) mediante el uso de las enzimas ApaI y XbaI. Los dos fragmentos se ligaron.

Las células Dg44 se sembraron en placas para cultivo de tejidos de 100 mm y se cultivaron hasta una confluencia del 50-60 %. Un total de 2 µg (microgramo) de ADNc de FIX se usó para la transfección de una placa de 100 mm mediante el uso del reactivo FuGene (Roche) en medio libre de proteína (Invitrogene CD Dg44). El medio se eliminó 48 horas después de la transfección y se reemplazó con un medio libre de proteína (Invitrogene CD Dg44) sin nucleósidos y en presencia de 800 µg/ml de G418 (neomicina). Después de 14 días, la población celular transfectada se transfirió a matraces para el cultivo de tejidos T25, y la selección continuó durante otros 10-14 días hasta que las células comenzaron a crecer como clones estables. Se seleccionaron clones con alta expresión. Se usaron aproximadamente  $2 \times 10^7$  células para inocular 300 ml de medio de crecimiento en una botella de rodillo de 1700 cm<sup>2</sup> (Corning, Corning NY), suplementado con vitamina K3 a 5 ng/ml (menadiona bisulfato de sodio; Sigma). El medio de producción (cosecha) se recogió después de una disminución rápida en la viabilidad celular a aproximadamente 70 %. El medio de producción se clarificó primero y después se concentró aproximadamente 20 veces y se dializó con PBS mediante el uso de un casete de filtración de flujo (10 KDa MWCO; Millipore Corp.).

Determinación del nivel del antígeno FIX: los niveles de antígeno en la cosecha de FIX-CTP se determinaron mediante el uso del estuche de ELISA para el FIX humano AssayMax (AssayPro-EF1009-1). La concentración de proteínas calculada es el promedio de tres diluciones diferentes en dos ejecuciones independientes (figura 1A, tabla 1).

Tabla 1: Concentración de proteínas calculada

	FIX-CTP	FIX-CTP-CTP
Nivel del Ag FIX (µg/ml)	41.9	19.2
SD	8.76	3.67
%CV	20.92	19.15

5 FIX SDS-PAGE - inmunotransferencia: las cosechas de FIX-CTP o rhFIX purificado (American Diagnostics), 100 ng de proteína, se cargaron en gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante inmunotransferencia Western con el uso del anticuerpo policlonal anti-FIX humano y anticuerpo monoclonal anti-gamma carboxilación humana (American Diagnostics). Como se informó previamente, rhFIX migró a 55 KDa, mientras que FIX fusionado a dos CTP migró a 75 KDa. Ambas variantes de las proteínas FIX-CTP se mostraron estar gamma carboxiladas, una modificación postraduccional esencial para la actividad y la función de FIX (figura 1B).

10 Determinación de la actividad cromogénica de FIX: Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de las cosechas de FIX-CTP frente a la proteína rhFIX (American Diagnostics) se realizó mediante el uso del estuche de prueba para la actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). En la presencia de trombina, fosfolípidos, calcio, cantidades en exceso de FXIa activa el FIX muestreado a FIXa. FIXa forma un complejo enzimático con trombina, FVIII activado:C (suministrado en cantidades en exceso), fosfolípidos, y calcio y activa el Factor X, presente en el sistema de ensayo, a FXa. La actividad se correlaciona directamente con la cantidad de FIX, que es el factor limitante. El FXa generado se mide después mediante su actividad específica sobre un sustrato cromogénico de FXa (pNA). La cantidad de pNA generado es directamente proporcional a la actividad de FIXa. rhFIX y las cosechas de FIX-CTP se diluyeron en serie, y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta de las cosechas de FIX con una preparación de referencia que consistió en rhFIX o plasma humano. La EC50 promedio del FIX fue 21 ng/ml, mientras que la EC50 calculada para la cosecha de FIX-(CTP<sub>2</sub>) fue 382 ng/ml, y la EC50 calculada para la cosecha de FIX-CTP fue 1644 ng/ml. Se observó una disminución de aproximadamente 15 veces en la actividad enzimática de la cosecha de FIX-(CTP<sub>2</sub>) (figura 2).

15 Actividad de coagulación de FIX (aPTT): El tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) es una medida de la integridad de las vías intrínseca y común 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 vía intrínseca, fosfolípido y calcio. El reactivo de aPTT se denomina una tromboplastina parcial porque el factor tisular no se incluye con el fosfolípido ya que está con el reactivo protime (PT). El activador inicia el sistema y después tiene lugar el resto de las etapas de la vía intrínseca en presencia de fosfolípido. El intervalo del aPTT de referencia varía entre los diferentes laboratorios, pero usualmente está en el intervalo de 27-34 segundos.

20 Lo importante del ensayo fue cuantificar la capacidad de las cosechas de FIX-CTP para restaurar la actividad de coagulación del plasma humano con agotamiento de FIX mediante la adición de rhFIX. Se mezclaron 300 µl de plasma humano deficiente de FIX con 100 µl de rhFIX o las cosechas de FIX-CTP y diluidas en serie. Después de una incubación de 60 segundos a 37 °C, se añadieron tromboplastina, CaCl<sub>2</sub> y fosfolípidos a la mezcla, y se determinó el tiempo de coagulación en segundos (realizado por American Medical Laboratories). La potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta de las cosechas de FIX con una preparación de referencia que consistió en rhFIX o plasma humano. Una unidad de actividad de FIX corresponde a la concentración del FIX que iguala la actividad de un ml de plasma humano normal. Los resultados de aPTT presentados indican que FIX-(CTP)<sub>2</sub> muestra una reducción de 5,7 veces en su actividad específica de coagulación en comparación con rhFIX (tabla 2). Además, los resultados de aPTT junto con el ensayo de la actividad cromogénica *in vitro* sugieren que la cosecha de FIX-(CTP)<sub>2</sub> tiene una actividad enzimática mejorada frente a la cosecha de FIX-CTP (tabla 2). Una mejor actividad de las proteínas FIX-CTP puede obtenerse después de la optimización del sistema de expresión (es decir cotransfección con furina y optimización de la concentración de vitamina K3 en el medio), que se fortaleció después de la super-transfección con furina (datos no mostrados).

Tabla 2: Actividad de coagulación de FIX

rhFIX(A D) (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
0.07812	52.1	0.140625	76.3	0.0625	77.4

50 Estudio farmacocinético: rhFIX (American Diagnostic) y las cosechas de FIX-CTP se administraron en una única

inyección intravenosa a las ratas Sprague-Dawley (seis ratas por sustancia) a una dosis de 75 µg/kg de peso corporal (tabla 3).

Tabla 3: Plan de operación del estudio PK

5

Grupos tratados	Elemento de prueba	Núm. de animales / grupo	Vía de dosificación	Género	Nivel de dosis (µg/kg)	Nivel de dosis (µg por animal)	Vol. inyectado (µl)	Con. (µg/ml)	*Puntos de tiempo (horas después de la dosis)
1	rFIX	6	IV	M	75	15	500	30	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48, 72.
2	rFIX-CTP	6	IV	M	75	15	500	30	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48, 72.
3	rFIX-CTP-CTP	6	IV	M	75	15	1000	15	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48, 72.

Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital 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 -20 °C hasta su análisis. La concentración del FIX se cuantificó mediante ensayo ELISA específico para FIX (AssayPro). Se calculó un perfil farmacocinético para cada proteína y representa la media de 3 animales en cada punto de tiempo (figura 3). Los tiempos de vida media terminal se calcularon mediante el uso del programa informático PK solutions 2.0. La tabla 4 resume las concentraciones observadas de FIX en los diferentes puntos de tiempo de muestreo.

10

15

Tabla 4: Concentraciones de FIX observadas

Tiempo (horas)	FIX-AD (ng/ml)	FIX-CTP (ng/ml)	FIX-CTP-CTP (ng/ml)
0.083	1506.7	1477.5	1914.8
0.5	1949.8	1150.1	1830.1
1.5	2189.4	1009.0	1264.3
4	733.90	709.33	1000.00
8	319.80	167.20	1234.67
24	BLQ	54.625	230
48	BLQ	BLQ	120.9

El perfil PK y el resumen de los tiempos de vida media terminal se resumen en la tabla 5. Las cosechas de FIX-CTP muestran mejores valores de  $T_{1/2\beta}$  en comparación con rhFIX (aumentos de 2 y 5 veces, respectivamente). Dado que en la recolección de la dosificación del FIX, las concentraciones séricas en el animal del FIX a las 24 horas estaban por debajo del límite de cuantificación (BLQ), no se calcularon otros parámetros PK.

25

Tabla 5: Resumen de los parámetros PK

Producto	Tiempo de vida media terminal (horas)	Relación (FIX-(CTP) <sub>x</sub> /rhFIX)
rhFIX (American Diagnostics)	2.62	–
FIX-CTP	5.55	2.11
FIX-CTP (FIX-CTP-CTP)	12.9	4.92

En este estudio, se describió un novedoso enfoque para prolongar el tiempo de vida media del FIX mientras que se retiene la potencia terapéutica. La adición de un péptido CTP a una proteína activa tiene un potencial perjudicial al 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 en el extremo C-terminal del FIX es inesperada.

Caracterización de un FIX-CTP-CTP purificado por inmovinoafinidad

Purificación del FIX-CTP-CTP

Para evaluar una proteína en un contenido de alto grado con aumento de la actividad cuyo perfil PK imita y puede extrapolarse a un entorno clínico, FIX-CTP-CTP es un FIX modificado con 2 unidades de CTP en tándem en su carboxilo terminal. FIX-CTP-CTP se purificó mediante el uso de un anticuerpo monoclonal unido a la matriz contra residuos  $\gamma$  y carboxiglutamilo (Gla) presentes en la región N-terminal del FIX (American Diagnostics Cat. # 3570MX). El anticuerpo monoclonal se unió a sefarosa CL-4B. La cosecha de FIX-CTP-CTP a una concentración de 88  $\mu$ g/ml se dializó contra Tris 20 mM, NaCl 150 mM y EDTA 10 mM a pH =7,4. La velocidad de carga fue 0,5 ml/min, la elución se realizó mediante el uso de Tris-HCl 20 mM, NaCl 350 mM y CaCl 50 mM, y la fracción no unida se recicló cinco veces. Finalmente, la fracción de elución se dializó con PBS, se mezcló bien y se concentró.

Determinación del nivel del antígeno FIX: los niveles de las cosechas de FIX-CTP, las cosechas de FIX-(CTP)<sub>2</sub>, y la proteína purificada FIX-(CTP)<sub>2</sub> se determinaron mediante el uso del estuche de ELISA para el FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. #FIX-AG RUO). La concentración de proteínas calculada ( $\mu$ g/ml) es el promedio de dos ejecuciones independientes (figura 4, tabla 6).

Tabla 6: Concentración de proteínas calculada

	FIX-CTP	FIX-CTP-CTP	FIX-CTP-CTP (purificada)
Nivel del Ag FIX ( $\mu$ g/ml)	125.78	88.53	172.9
SD	17.28	21.31	2.63
%CV	13.74	24.08	1.52

Adicionalmente, FIX-CTP-CTP se cuantificó mediante el ensayo de Bradford. La concentración calculada fue 202  $\mu$ g/ml, que es similar a la concentración obtenida por el ELISA para FIX humano.

Transferencias de SDS-PAGE: la cosecha de FIX-CTP-CTP, la fracción no unida y la proteína purificada, se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis del SDS-PAGE Coomassie se realizó mediante tinción del gel con el reactivo azul de Coomassie (800 ng de proteína). Se realizó una inmunotransferencia Western con 100 ng de proteína, anticuerpo policlonal anti-FIX humano (Ac), y Ac monoclonal anti-gamma carboxilación humana (American Diagnostics Cat #499 y #3570). El procedimiento de purificación por inmovinoafinidad enriqueció significativamente la porción FIX-CTP-CTP mientras que se redujeron las impurezas (figura 5).

Secuenciación del N-terminal: La proteína purificada FIX-CTP-CTP se separó mediante SDS-PAGE en Tris-glicina al 12 % y posteriormente se electrotransfirió a una membrana de PVDF. La banda de interés se cortó y se colocó sobre un filtro de fibra de vidrio tratada Biobrene, purificado. El análisis de la secuencia N-terminal se llevó a cabo mediante degradación de Edmann con el uso de un secuenciador de proteína líquida por pulsos equipado con un sistema de microgradientes de HPLC 140 C. La secuenciación del N-terminal reveló que FIX-CTP-CTP es una mezcla de proteínas escindidas completas e incompletas del propéptido. Se demostró que la escisión no adecuada del propéptido reduce la actividad de coagulación del FIX. Mediante cotransfección con furina, el proceso de escisión del propéptido puede mejorarse.

Determinación de la actividad cromogénica de FIX: Se realizó una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de

la proteína purificada FIX-CTP-CTP frente a rhFIX (American Diagnostics) y una mezcla de plasma humano normal mediante el uso del estuche de prueba de la actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). En la presencia de trombina, fosfolípidos y calcio, cantidades en exceso de FXIa activan FIX a FIXa. FIXa forma un complejo enzimático con trombina (suministrada en cantidades en exceso), fosfolípidos y calcio activan el Factor X, presente en el sistema de ensayo, a FXa. La actividad se correlaciona directamente con la cantidad de FIX, que es el factor limitante. El FXa generado se midió por su actividad específica sobre un sustrato cromogénico de FXa (pNA). La cantidad de pNA generada fue directamente proporcional a la actividad de FIXa. rhFIX, plasma humano y FIX-CTP-CTP se diluyeron en serie, y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta (figura 6). La EC<sub>50</sub> promedio de rhFIX fue 68,74 ng/ml mientras que la EC<sub>50</sub> calculada de FIX-CTP-CTP fue 505 ng/ml. Se observó una disminución de aproximadamente 7 veces en la actividad enzimática de FIX-CTP-CTP frente a FIX recombinante y una disminución de 16,5 veces frente al plasma normal humano bien mezclado. Esta actividad reducida puede explicarse por la escisión inadecuada del propéptido N-terminal, que se identificó mediante análisis del N-terminal.

Actividad de coagulación de FIX (aPTT): El tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) es una medida de la integridad de las vías intrínseca y común de la cascada de coagulación. El aPTT es el tiempo (medido en segundos) necesario para que el plasma coagule después de la adición de un activador de la vía intrínseca, fosfolípido y calcio.

El ensayo cuantificó la capacidad de la proteína FIX-CTP-CTP para restaurar la actividad de coagulación del plasma humano con agotamiento del FIX mediante la adición de rhFIX. 300 µl de plasma humano deficiente de FIX se mezcló con 100 µl de rhFIX, FIX-CTP-CTP (FIX-CTP-CTP (los CTP están en tándem en el C-terminal)), o plasma humano normal mezclado que se diluyó adicionalmente. Después de una incubación de 60 segundos a 37 °C, se añadió el factor tisular (TF), CaCl<sub>2</sub>, y fosfolípidos a la mezcla. Se determinó el tiempo de coagulación en segundos. La potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta de FIX-CTP-CTP con una preparación de referencia de rhFIX o plasma humano. Una unidad de FIX se definió como la cantidad de FIX que iguala la actividad de 1 ml de plasma humano normal.

Los resultados de aPTT indican que la actividad de coagulación de FIX-CTP-CTP es solo 1,4 menor que el plasma humano normal mezclado y similar al rhFIX. Los resultados de aPTT junto con el ensayo de actividad cromogénica *in vitro* sugieren que la purificación de FIX-CTP-CTP no afectó su actividad.

Actividad farmacocinética de FIX-CTP-CTP: FIX-CTP-CTP purificado, rhFIX (American Diagnostic) y las cosechas que contenían FIX-CTP-CTP y FIX-CTP se administraron en una única inyección intravenosa a las ratas Sprague-Dawley (ocho ratas por sustancia) en una dosis de 100 µg/kg de peso corporal (tabla 7).

Tabla 7: Descripción del estudio de PK

Grupos tratados	Elemento de prueba	Núm. 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 después de la dosis)
A	rFIX	8	100	20	500	40	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
B	rFIX-CTP (cosecha)	8	100	20	500	40	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
C	rFIX-CTP-CTP(cosecha)	6	100	20	500	40	0 (Antes de la 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.

Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 4 ratas alternativamente a las 0,083, 0,5, 2, 4, 7, 10, 24, 48, y 72 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,32 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. La concentración del FIX se cuantificó mediante el uso de un estuche de ELISA para FIX humano (Affinity Biologicals). El perfil farmacocinético se calculó para cada proteína como la media de 4 animales en cada punto de tiempo (figura 7). El tiempo de vida media terminal se calculó mediante el uso del programa informático PK Solutions 2.0. La tabla 8 resume las concentraciones observadas de FIX en diferentes puntos de tiempo de muestreo.

Tabla 8: Concentraciones de FIX observadas

Tiempo (horas)	Cosecha de FIX-CTP ng/ml	Cosecha de FIX-(CTP) <sub>2</sub> ng/ml	rhFIX ng/ml	FIX-CTP-CTP purificada ng/ml
0.085	1038.97	1123.62	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

En la tabla 9 se presenta un resumen de los parámetros PK.

5

Tabla 9: Resumen de los parámetros PK

Tiempo (horas)	T <sub>1/2</sub> (hr)	AUC ng-hr/ml	MRT (hr)	Vd ml/Kg	CL ml/hr/Kg
Cosecha de FIX-CTP	4.17	3622	4.5	155.1	27.6
Cosecha de FIX-(CTP) <sub>2</sub>	10.44	9105.7	12	165.4	10.9
rhFIX	3.72	1416.8	5.1	373.8	70.183
FIX-CTP-CTP purificada	11.14	6314.2	12.3	254.5	15.83

10

La cosecha de FIX-CTP-CTP demostró un mejor perfil PK en comparación con la cosecha de FIX-CTP. Además, FIX-CTP-CTP purificado mostró un aumento de 3 veces en el valor de T<sub>1/2</sub> y un aumento de 4,5 veces en el AUC en comparación con rhFIX.

15

La cantidad reducida del FIX secretado fusionado a las moléculas CTP en tándem frente a la fusión de un único CTP parece deberse a la adición de un CTP adicional y no a la detección reducida del ELISA, porque la concentración calculada de FIX-CTP-CTP purificado por Bradford fue similar a la concentración calculada por ELISA.

20

La actividad de coagulación de FIX-CTP-CTP fue similar al plasma humano mezclado; sin embargo, su actividad cromogénica *in vitro* fue significativamente menor cuando se comparó con rhFIX o el plasma humano mezclado. El ensayo de actividad cromogénica se reportó como un ensayo muy sensible en comparación con el ensayo de coagulación. El motivo de la actividad reducida de FIX-CTP-CTP puede variar. La adición de CTP puede disminuir la afinidad de FIX por el FXIa o reducir las modificaciones postranscripcionales (por ejemplo 12-10 residuos GLA y la escisión del propéptido). El análisis del N-terminal reveló que la escisión proteolítica del propéptido de FIX-CTP-CTP no se completó totalmente antes de la secreción. Dado que esta modificación postranscripcional es crucial para la

25

actividad enzimática normal de la proteína, la cotransfección con el plásmido de furina-PACE es favorable y puede mejorar la actividad de FIX-CTP-CTP.

Finalmente, el estudio PK comparativo de FIX-CTP-CTP en ratas demostró que la fusión de dos CTP en tándem al C-terminal del FIX generó un FIX con un tiempo de vida media prolongado.

5 Modelo de ratón con agotamiento de FIX: Para evaluar la actividad *in vivo*, se obtienen ratones con inactivación del FIX, y se establece una colonia de reproducción. Se inyectaron 10 µg de hFIX recombinante comercial (BeneFIX®) o de rFIX-(CTP)<sub>2</sub> (FIX-CTP-CTP) en la vena de la cola de un ratón con inactivación del FIX, anestesiado (22-28 g). La cantidad de proteína inyectada es igual a la concentración requerida de FIX en el plasma normal (5 µg/ml). Las muestras de sangre se toman de la cola comprimida a los tubos capilares heparinizados en puntos de tiempo específicos. Las muestras de plasma se evalúan en cuanto a los niveles de FIX mediante ELISA y se mide la eficacia mediante el ensayo de coagulación de aPTT.

15 Aumento de la eficacia de la escisión del propéptido de FIX: El ADNc del péptido CTP se fusionó al extremo 3' del ADNc del FIX humano. Las construcciones de expresión de 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 control. La secreción de un alto nivel de FIX conduce a la secreción de una mezcla del pro-factor y un factor FIX maduro, debido a la cantidad limitada de la proteasa de furina en la célula. La cotransfección de un vector de expresión de furina con un vector de expresión del pro-factor aumenta la recuperación y da como resultado la secreción de FIX completamente procesado al medio.

25 Después de la cotransfección de FIX-(CTP)<sub>2</sub> y furina, los clones estables se generan y la cosecha se recolecta para la evaluación de la escisión del propéptido. Se cargan 100 ng de proteína en gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realiza mediante inmunotransferencia Western con el uso de Ac policlonal anti-FIX humano (American Diagnostics) y anticuerpo policlonal anti-propéptido. Como se informó previamente, el rhFIX migró a 55 KDa, mientras que el FIX fusionado a dos CTP migró a 75 kDa. Se muestra que ambas variantes de proteínas FIX experimentan una adecuada escisión completa del propéptido.

30 Para determinar si la escisión adecuada del propéptido mejora la actividad enzimática de FIX-(CTP)<sub>2</sub>, se realiza una evaluación comparativa de la actividad cromogénica y de coagulación de la cosecha de FIX-(CTP)<sub>2</sub> cotransfectada con furina. Se observa una mejora significativa de la actividad específica de FIX-(CTP)<sub>2</sub>, que es similar a rhFIX.

35 En conclusión, los resultados descritos en la presente sugieren que FIX-CTP-CTP puede usarse eficazmente para el tratamiento de pacientes con hemofilia B. El FIX fusionado a las construcciones de CTP tiene el beneficio de un mejor rendimiento farmacológico *in vivo* que supera el inconveniente en determinadas medidas *in vitro*. Este tratamiento propuesto es ventajoso respecto a los tratamientos anteriores ya que se reduce la tasa de infusiones y la cantidad de dosis requeridas.

40 Es importante señalar que cuando se usó una estrategia de una molécula fusionada a la albúmina para mejorar el tiempo de vida media del FIX, el FIX recombinante se inactivó. El novedoso enfoque actual conduce al diseño y la purificación de una novedosa proteína fusionada con FIX recombinante que presenta una mejor actividad a largo plazo. Dado que las modificaciones de tamaño solas no mejoraron la farmacocinética del FIX inyectado, el hallazgo de que el CTP fusionado al FIX facilita los parámetros farmacocinéticos fue inesperado. La presencia de residuos de ácido siálico en el péptido altamente glicosilado estabilizó la proteína y la protegió de las interacciones con los receptores vasculares sin anular los determinantes principales de la función de FIX.

50 FIX-CTP tiene una eficacia terapéutica similar al rFIX en los pacientes con hemofilia B y se necesitó una dosificación menos frecuente. Una única inyección de FIX-CTP es suficiente para controlar los episodios de hemorragia y reducir la cantidad de inyecciones que se necesitan durante una intervención quirúrgica en pacientes con hemofilia B.

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

60 Ejemplo 2

Evaluación comparativa del FIX-CTP<sub>3</sub> purificado vs. FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub>

2.1 Objetivo del estudio

Una evaluación comparativa de los parámetros farmacocinéticos de FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub> frente a FIX-CTP<sub>3</sub> después de un proceso de purificación parcial.

5 2.2 Producción de cosechas de FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub>

El ADNc de FIX (OriGene RC219065) fusionado en el extremo C-terminal a cuatro o cinco secuencias de CTP en tándem se expresó en células Dg44 mediante el uso del sistema de expresión Excellgene en presencia de vitamina K3 a 10 ng/l (Sigma, Mennadion). Las cosechas se recolectaron (300 ml), filtraron y congelaron.

10

2.3 Producción de la cosecha de FIX-CTP<sub>3</sub>

FIX-CTP<sub>3</sub> se expresó en el laboratorio en células CHO mediante el uso del vector pCI-DHFR, clon 196, BR-9 en presencia de vitamina K3 a 25 ng/l (Sigma). Las cosechas se recolectaron y filtraron.

15

Todas las muestras de FIX-CTP (3, 4 y 5 CTP) se purificaron solo mediante una columna de jacalina debido a la falta de material.

2.4 Determinación del nivel del antígeno FIX

20

El nivel del antígeno FIX se determinó mediante el uso del estuche de ELISA para el FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO). La concentración de proteínas calculada es el promedio de cuatro ejecuciones independientes. La concentración de FIX-CTP<sub>3</sub> fue ligeramente mayor en comparación con las dos versiones adicionales (tabla 10).

25

30

Tabla 10: Nivel del Ag FIX

35

	3 CTP	4 CTP	5 CTP
	Final	Final	Final
	jacalina40	jacalina40	jacalina40
Prom. (ng/ml)	1016.69	4644.11	1686.82
SD	225.41	925.63	160.07
%CV	22.17	19.93	9.49

2.5 Tinción de Coomassie e inmunotransferencia de FIX-CTP

40 Las cosechas de FIX-CTP<sub>3</sub>, FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub> se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante inmunotransferencia Western con el uso del Ac policlonal anti-CTP (Adar Biotech Production) o Ac anti-Gla (American Diagnostica).

45 Como se informó previamente, el FIX fusionado a tres CTP migró a 80 kDa mientras que el FIX fusionado a cuatro o cinco CTP migró a 85 kDa o 90 kDa, respectivamente. Como se esperaba, las cosechas de FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub> de Excellgene mostraron muy bajos niveles de gamma carboxilación en comparación con la cosecha de FIX-CTP<sub>3</sub>, que se produjo en Prolor (figura 8).

50 Después de un proceso de purificación con la utilización de una columna de jacalina (purificación por inmunoafinidad de las proteínas glicosiladas), FIX-CTP<sub>3</sub>, FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub> se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El SDS-PAGE se tiñó mediante el colorante azul de Coomassie para la detección de las muestras. Todas las variantes mostraron perfiles de bandas mucho más limpios (figura 9), lo que sugiere una mayor pureza.

55

2.6 Determinación de la actividad cromogénica de FIX

Se realizó una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de FIX-CTP<sub>3</sub>, FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub> completamente purificados (columna HA) frente al plasma mezclado normal humano mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). Todas las muestras se diluyeron en serie, y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia de plasma normal humano. La reducción de la actividad cromogénica de FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub> (figura 10) en comparación con el plasma puede ser una consecuencia de modificaciones postranscripcionales inadecuadas de las proteínas FIX, por ejemplo gamma carboxilación y escisión del propéptido inapropiadas o, alternativamente, debido a la adición de los casetes de CTP. La fluctuación en la actividad de FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub> (tabla 11) podría estar causada por las inapropiadas capacidades de cuantificación del ELISA para FIX debido al enmascaramiento del CTP del sitio antigénico.

Tabla 11: Relación de EC50 muestra/plasma

Muestra	Relación de EC50 muestra/plasma
Plasma	1
3 CTP Final HA	2
4 CTP Final HA	5.35
5 CTP Final HA	2.73

2.7 Estudio farmacocinético

FIX-CTP<sub>3</sub>, FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub> purificados en jacalina (Grupo A, B y C, respectivamente) se administraron en una única inyección intravenosa a las ratas Sprague-Dawley (seis ratas por grupo de tratamiento) a una dosis de 250 µg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 3 ratas alternativamente a las 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72 y 96 horas después de la dosificación (tabla 12). El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Tabla 12: Plan de operación del estudio PK

Grupo de tratamiento	Tratamiento	Núm. de animales/grupo	Vía de dosificación	Nivel de dosis (µg por animal)	Vol. inyectado (µl)	Conc. (µg/ml)	Puntos de tiempo (horas después de la dosis)
A	FIX-CTP*3 jacalina 40	6	IV	50	200	250	0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
B	FIX-CTP*4 jacalina 40	6	IV	50	200	250	0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
C	FIX-CTP*5 jacalina 40	6	IV	50	200	250	0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96

La concentración del FIX en las muestras de plasma se cuantificó mediante el uso de estuches de ELISA para FIX humano (Affinity Biologicals). El perfil farmacocinético se calculó y es la media de 3 animales en cada punto de tiempo. Los tiempos de vida media terminal se calcularon mediante el uso del programa informático PK Solutions 2.0 x. La tabla 13 más adelante resume las concentraciones de FIX calculadas en los diferentes puntos de tiempo de muestreo.

Tabla 13: Concentraciones de FIX calculadas

Tiempo (horas)	Pr. 3 CTP ng/ml	SD 3 CTP	Pr. 4 CTP ng/ml	SD 4 CTP	Pr. 5 CTP ng/ml	SD 5 CTP
0.083	1087.82	72.39	904.54	21.06	1097.23	82.24
0.5	774.18	86.31	736.82	66.93	998.79	70.43
2	562.23	3.70	627.09	32.47	747.85	14.02
5	357.44	8.63	431.23	29.41	576.49	27.36
8	239.20	7.82	327.46	30.26	394.96	36.48
24	77.08	4.26	107.38	5.18	142.42	16.13
48	27.73	2.02	39.83	1.85	53.66	3.33
72	12.55	1.48	21.53	1.55	23.54	3.32
96	6.66	1.23	10.63	0.13	18.54	3.39

- 5 El perfil PK y un resumen de los parámetros PK se presentan en la tabla 14 más adelante y en la figura 11. Un perfil del análisis PK en todos los puntos de tiempo sugirió que la adición de 4 o 5 casetes de CTP al FIX no aumentó su tiempo de vida media en comparación con FIX-CTP<sub>3</sub>. El AUC después de la administración de FIX-CTP<sub>5</sub> aumentó en 1,4 a 1,6 veces frente a FIX-CTP<sub>3</sub>, el cual no fue estadísticamente significativo.

Tabla 14: Perfil PK y resumen de los parámetros PK

24- 96 horas	3 CTP	4 CTP	5 CTP
Tiempo de vida media (horas)	20,43	22,02	23,96
AUC (ng-horas/ml)	8218,38	10504,49	13329,41
Vd (ml/kg)	700,76	586,02	494,89
CL (ml/horas/kg)	23,77	18,45	14,32

- 10 Dado que se demostró que las muestras a las 96 horas después de la dosificación tenían concentraciones de FIX muy bajas, que estaban por debajo del límite de cuantificación del ensayo, el tiempo de vida media terminal se recalculó para proporcionar un cálculo más preciso y científicamente adecuado (tabla 15). De acuerdo con este cálculo, se obtuvieron incluso las diferencias más pequeñas entre el tiempo de vida media de FIX-CTP<sub>3</sub>, FIX-CTP<sub>4</sub> y  
15 FIX-CTP<sub>5</sub>.

Tabla 15: Tiempo de vida media terminal recalculado

8-72 horas	3 CTP	4 CTP	5 CTP
Tiempo de vida media (horas)	15,38	16,63	16,04

## 20 2.8 Conclusiones:

- En este estudio, se evaluaron los parámetros farmacocinéticos y la actividad de coagulación potencial de FIX-CTP<sub>3</sub>, FIX-CTP<sub>4</sub> y FIX-CTP<sub>5</sub>. La fusión de 4 y 5 CTP al FIX no proporcionó una superior o mayor extensión del tiempo de vida media, en comparación con FIX-CTP<sub>3</sub>, y se observó una reducción de la actividad cromogénica. La tabla 16  
25 más adelante resume la mejora en por ciento del tiempo de vida media para las diferentes variantes fusionadas FIX-CTP (1 a 5 CTP). La fusión de CTP al FIX mejoró su comportamiento farmacocinético, pero, de manera impredecible, esta mejora fue limitada. Sorprendentemente, después de la fusión de 3, 4 o 5 CTP en tándem al FIX, se calculó un valor similar del tiempo de vida media.

30

Tabla 16: Resumen del por ciento de mejora del tiempo de vida media

Versión de FIX	T <sub>1/2</sub> (8-72hr) % de incremento
rhFIX vs. 1CTP	112
1CTP vs. 2CTP	141
2CTP vs. 3CTP	37
3CTP vs. 4CTP	6
4CTP vs. 5CTP	0

Estos datos sugieren que la fusión de 3 CTP al FIX produce una mejora máxima en el tiempo de vida media de la proteína, lo que confirma que FIX-CTP<sub>3</sub> es la variante óptima en términos de tiempo de vida media, estructura y actividad potencial de coagulación para el desarrollo clínico futuro.

### Ejemplo 3

Tratamiento con FIX-CTP<sub>3</sub> del modelo de ratón hemofílico FIX-/-

Como se describió anteriormente, se realizó un estudio que probó el perfil PK de las cosechas de FIX-CTP, FIX-CTP<sub>2</sub> y FIX-CTP<sub>3</sub> y la actividad de coagulación frente a rhFIX. FIX-CTP<sub>3</sub> mostró un mejor perfil PK a la vez que mantuvo su actividad de coagulación frente a las cosechas de FIX-CTP<sub>1</sub> y FIX-CTP<sub>2</sub> o rhFIX. Para evaluar adicionalmente este resultado, se purificó la proteína FIX-CTP<sub>3</sub>  $\gamma$ -carboxiglutamato. FIX-CTP<sub>3</sub> muestra un aumento de 3 veces en el tiempo de vida media y un AUC 4,5 veces mayor en comparación con rhFIX en las ratas normales después de una única administración IV. FIX-CTP<sub>3</sub> demostró una reducción de la actividad cromogénica y de coagulación *in vitro*, muy probablemente debido a la escisión insuficiente del propéptido N-terminal y a modificaciones postranscripcionales (PTM) inadecuadas, tal como la gamma carboxilación adecuada.

En el estudio actual, se analizaron las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del FIX humano recombinante fusionado a tres CTP en tándem en ratones deficientes de FIX.

Propósito del estudio:

Determinar los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de rFIX-(CTP)<sub>3</sub> frente al rhFIX comercial (BeneFIX®) en ratones deficientes de FIX después de una única administración IV de FIX-(CTP)<sub>3</sub> a una actividad específica y dosis similares (actividad específica similar a la PD y similar constante de FIX para la PK).

Producción de la cosecha de FIX-CTP<sub>3</sub>:

El ADNc de FIX (OriGene RC219065-Thr 148) fusionado en el extremo C-terminal a tres secuencias de CTP en tándem se expresó en células Dg44 mediante el uso del sistema de expresión Excellgene en presencia de vitamina K3 a 25 ng/ml (Sigma, Mennadion). Se cultivaron cinco lotes separados que contenían 5 litros de suspensión celular (total de veinticinco litros) y se cosecharon después que la viabilidad disminuyó a 60-70 %. La cosecha se filtró y congeló a -70 °C.

Determinación del nivel del antígeno FIX de la cosecha:

El nivel del antígeno FIX de la cosecha se determinó mediante el uso de un estuche de ELISA para FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO). El nivel del antígeno se calculó por cada lote. La concentración del FIX se mantuvo entre los diferentes lotes (tabla 17).

Tabla 17: Nivel del antígeno FIX

Lote	Nivel del antígeno FIX		
	#1	Lot #2	Lot #3
Pr. ( $\mu$ g/ml)	28.81	32.74	42.9
STD	2.5	2.69	4.0
%CV	8.84	8.38.2	9.4

Proceso de purificación de FIX-CTP<sub>3</sub>:

Después de un corto estudio de purificación, se realizó un proceso de purificación mediante el uso de las siguientes 3 columnas: DEAE sefarosa, Heparina sefarosa e hidroxipatita cerámica HA Bio Rad tipo 1 (40  $\mu$ m), FIX-CTP<sub>3</sub>. Se purificó la proteína enriquecida  $\gamma$ -carboxilada. En resumen: Se descongelaron cinco litros de cosecha clarificada a 4 °C durante un periodo de 4 días. Para cada lote de purificación, la cosecha clarificada (2 litros) se concentró 4 veces

y se dializó contra Tris-HCl 20 mM pH 8,2 mediante el uso de un cartucho desechable de fibra hueca con un valor de corte del peso molecular nominal de 10 KDa. Este proceso (UFDF1) se realizó dos veces, y se cargó un litro de UFDF1 en columna de DEAE sefarosa, y el Factor IX se eluyó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 8,2. El producto se diluyó 1:1 con Tris-HCl 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7,5, y el pH se ajustó a 7,5 antes de cargar en la columna de Heparina sefarosa. La elución se realizó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, y CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7,5. El producto eluido se concentró y dializó contra fosfato 10 mM pH 6,8 mediante el uso de una membrana con valor de corte de 10 KDa del casete Pellicon XL (UFDF2). El producto se cargó en una columna HA, y la fracción activada del Factor IX se eluyó con fosfato 150 mM pH 6,8. El producto de purificación se concentró hasta una concentración objetivo de 2 mg/ml y se dializó contra TBS pH 7,45, se dividió en alícuotas y se almacenó a -70 °C.

El proceso de purificación se repitió cinco veces, de manera semanal para purificar el volumen total (25 litros). Los procesos de purificación se denominaron HA# 6-10. Cada producto de purificación se evaluó separadamente (App # 1-5). Al final del proceso de purificación, los diferentes lotes se combinaron y se concentraron adicionalmente hasta una concentración objetivo de 4 mg/ml.

Propiedades analíticas de FIX-CTP<sub>3</sub>:

Determinación del nivel del antígeno FIX

El nivel del antígeno de la proteína FIX-CTP<sub>3</sub> enriquecida γ-carboxilada se determinó mediante el uso de un estuche de ELISA para FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO). La concentración de proteínas calculada es el promedio de dos ejecuciones independientes (tabla 18).

Tabla 18: Nivel del antígeno FIX-CTP<sub>3</sub>

ELISA #1 de mezcla de FIX-CTP <sub>3</sub> purificada en HA				ELISA #2 de mezcla de FIX-CTP <sub>3</sub> purificada en HA				Pr. final
Dil.	1	2	Pr.	Dil.	1	2	Pr.	
130000	3412240	3781830	3597035	130000	3692260	3568240	3630250	3613643
260000	3915600	4158440	4037020	260000	3706820	3595540	3651180	3844100
520000	4158544	4334096	4246320	520000	3831464	3530748	3681106	3963713
1040000	4096352	4004104	4050228	1040000	3863392	3684304	3773848	3912038
Pr. (ng/ml)	3895684	4069618	3982651	Pr. (ng/ml)	3773484	3594708	3684096	3833373
STD	338367.5	234486.7	274313.5	STD	86576.66	65369.65	63369.86	154459.6
%CV	8.685703	5.761884	6.887712	%CV	2.294343	1.818497	1.720092	4.029338
Pr. (mg/ml)	3.895684	4.069618	3.982651	Pr. (mg/ml)	3.773484	3.594708	3.684096	3.833373

ELISA #1 de mezcla de FIX-CTP <sub>3</sub> purificada en HA				ELISA #2 de mezcla de FIX-CTP <sub>3</sub> purificada en HA				Pr. final
Dil.	1	2	Pr.	Dil.	1	2	Pr.	
130000	3412240	3781830	3597035	130000	3692260	3568240	3630250	3613643
260000	3915600	4158440	4037020	260000	3706820	3595540	3651180	3844100
520000	4158544	4334096	4246320	520000	3831464	3530748	3681106	3963713
1040000	4096352	4004104	4050228	1040000	3863392	3684304	3773848	3912038
Pr. (ng/ml)	3895684	4069618	3982651	Pr. (ng/ml)	3773484	3594708	3684096	3833373
STD	338367.5	234486.7	274313.5	STD	86576.66	65369.65	63369.86	154459.6
%CV	8.685703	5.761884	6.887712	%CV	2.294343	1.818497	1.720092	4.029338
Pr. (mg/ml)	3.895684	4.069618	3.982651	Pr. (mg/ml)	3.773484	3.594708	3.684096	3.833373

Transferencias de SDS-PAGE:

La proteína enriquecida γ-carboxilada FIX-CTP<sub>3</sub>, rhFIX y rFIXa (FIX activado) se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis de Coomassie en SDS-PAGE se realizó mediante tinción del gel con el reactivo azul de Coomassie (800 ng de proteína) (figura 12). Una inmunotransferencia Western se realizó mediante el uso de 100 ng de proteína con Ac policlonal anti-FIX humano (figura 12B), anticuerpo monoclonal anti-gamma carboxilación humana (American Diagnostics Cat #499, 3570) (figura 12C), Ac policlonal anti-propéptido de FIX (figura 12D), y Ac policlonal anti-CTP (figura 12E). Como se informó previamente, el FIX-CTP<sub>3</sub> migró a 75 KDa.

El procedimiento de purificación enriqueció significativamente la porción FIX-CTP<sub>3</sub> a la vez que redujo impurezas. El rendimiento del proceso de purificación fue muy bajo en el intervalo de alrededor de 2-3 % (datos no mostrados) debido al requisito de recolectar solo las fracciones FIX-CTP<sub>3</sub> γ-carboxiladas, como se demuestra en la inmunotransferencia anti-Gla (figura 12B). Basado en la tinción de Coomassie y la inmunotransferencia de FIX, la porción de FIX-CTP<sub>3</sub> es solo de alrededor de 60-70 %, y también se detectaron bandas adicionales de menor peso molecular, presumiblemente con menos formas de glicosilación.

Actividad de coagulación de FIX-CTP<sub>3</sub>:

Actividad cromogénica de FIX-CTP<sub>3</sub>:

5 Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de la cosecha de FIX-CTP<sub>3</sub> y de la proteína enriquecida  $\gamma$ -carboxilada FIX-CTP<sub>3</sub>, frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica, disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). La cosecha de FIX-CTP<sub>3</sub> y la proteína se diluyeron en serie, y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia que consistió en plasma normal humano. Como se demostró  
10 previamente, la cosecha de FIX-CTP<sub>3</sub> fue 50 veces menos activa que el plasma humano mezclado (tabla 19, figura 13). Después de la purificación de FIX-CTP<sub>3</sub>, la actividad cromogénica mejoró significativamente y fue solo 4,72 veces menos activa que el plasma humano mezclado (tabla 19, figura 13). La actividad cromogénica reducida de la cosecha puede ser una consecuencia de inadecuadas modificaciones postranscripcionales de las variantes de la proteína FIX, por ejemplo inapropiadas gamma carboxilación y escisión del propéptido. Después de la purificación y enriquecimiento de la fracción  $\gamma$ -carboxilada FIX-CTP<sub>3</sub>, la actividad fue mejor, lo que demuestra la contribución  
15 importante de la  $\gamma$ -carboxilación a la actividad del FIX.

Tabla 19: Actividad cromogénica de FIX-CTP3

Muestra	EC <sub>50</sub> (ng/ml)	Relación de EC50 muestra/plasma
Cosecha de FIX-(CTP) <sub>3</sub>	741.3	54.4
FIX-CTP <sub>3</sub> pur.	64.6	4.72
Plasma	13.63	1

20 Ensayo de coagulación de una etapa (aPTT):

El tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) es una medida de la integridad de las vías intrínseca y común 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 vía intrínseca, fosfolípido y calcio. Lo importante del ensayo fue cuantificar la capacidad de FIX-CTP<sub>3</sub> para restaurar la actividad de coagulación del plasma humano con agotamiento de FIX mediante la adición de rhFIX. Se mezclaron 200  $\mu$ l de plasma humano deficiente de FIX con 25  $\mu$ g/ml de FIX-CTP<sub>3</sub> y se diluyeron adicionalmente en TBS. Después de una incubación de 60 segundos a 37 °C, se añadieron 50  $\mu$ l del activador de PTT (Actina FS) y 50  $\mu$ l de calcio 25 mM a la mezcla, y se determinó el tiempo de coagulación en segundos mediante el uso de un Coagulador Sysmex® CA 1500 (realizado por Sheba hospital, Centro Nacional de Coagulación, mediante el uso de un ensayo de aPTT validado). La potencia se evaluó mediante la comparación de FIX-CTP<sub>3</sub> con la curva de dosis-respuesta de una preparación de referencia de plasma mezclado normal humano. Los resultados se expresan en por ciento de actividad interpolada a partir de la curva estándar que incluye niveles de FIX de <1-110 %. FIX-CTP<sub>3</sub> mostró una reducción de 15-20 veces en su actividad de coagulación frente al plasma mezclado normal humano ya que la actividad de 5  $\mu$ g/ml, que es el valor normal de FIX en el cuerpo, se demostró que fue de 6,5 % (tabla 20).  
35

40

Tabla 20: Actividad de coagulación de FIX-CTP<sub>3</sub>

FIX-CTP <sub>3</sub>	Concentración de FIX según el proveedor (mg/ml)	Concentración en la muestra analizada ( $\mu$ g/ml)	% de actividad de FIX (normalizado respecto al plasma mezclado normal humano)
	3,83	25	34,7
		5	6,5

45 FIX-CTP<sub>3</sub> también mostró aumento del tiempo de coagulación en comparación con BeneFIX® (tabla 21 y figura 14).

Tabla 21: Tiempo de coagulación comparativo (aPTT)

<b>Tiempo de coagulación</b>		
	FIX-CTP <sub>3</sub>	BeneFIX®
<b>38ug/ml</b>	77.6	
<b>19ug/ml</b>	83.4	
<b>7.6ug/ml</b>	93.2	50.6
<b>3.8ug/ml</b>	104.8	57.6
<b>1.9ug/ml</b>	112.2	63.7
<b>0.95ug/ml</b>	122.6	71.5
<b>0.475ug/ml</b>		83.7
<b>0.238ug/ml</b>		94.3

Se realizó un ensayo de coagulación adicional de manera independiente en ratones deficientes de FIX por el Dr. Paul Monahan en la Universidad de Carolina del Norte antes de iniciar el estudio PK-PD. Los resultados de aPTT sugirieron que la actividad de coagulación de FIX-CTP<sub>3</sub> es 40 veces menor que el plasma humano mezclado normal como se demuestra por el periodo más prolongado (según se midió en segundos) y la mayor concentración necesaria para la actividad de coagulación adecuada (tabla 22).

Tabla 22: Actividad de coagulación comparativa

<b>Actividad de FIX (unidades)</b>		
	FIX-CTP <sub>3</sub>	BeneFIX®
<b>38ug/ml</b>	13.9	
<b>19ug/ml</b>	8.8	
<b>7.6ug/ml</b>	4	116.8
<b>3.8ug/ml</b>	1.6	67.4
<b>1.9ug/ml</b>	0.9	41.7
<b>0.95ug/ml</b>	0.4	22.4
<b>0.475ug/ml</b>		8.5
<b>0.238ug/ml</b>		3.7

La actividad específica (u/ml), que se basó en el nivel del antígeno FIX según se calculó mediante ELISA para FIX-CTP<sub>3</sub> y BeneFIX®, fue de 4,46 y 198,9 respectivamente.

La inconsistencia en la actividad calculada de FIX-CTP<sub>3</sub> como se demuestra en los ensayos cromogénicos frente a aPTT puede explicarse por la sensibilidad superior del ensayo de aPTT y la relevancia *in vivo*. En el ensayo de actividad cromogénica, está presente una cantidad en exceso de los reactivos y enzimas lo que puede activar versiones de FIX menos potentes. La diferencia en los valores de actividad específica de FIX-CTP puede explicarse por el uso de diferentes reactivos y equipos automatizados. El valor de actividad según se calculó en la Universidad de Carolina del Norte se usó para el diseño del estudio PK-PD.

Detección de la proteína FIXa:

Para confirmar que después del proceso de purificación, no se produjo activación de FIX (FIXa), se realizó un ensayo de detección de FIXa mediante el uso del ensayo cromogénico de FIXa Biophen (Cat. # Ref. 221812). El ensayo mide la cantidad de FIXa presente en una muestra específica mediante el uso de la cascada de actividad cromogénica, como se describió previamente. FIX-CTP<sub>3</sub> y rhFIX se diluyeron y se evaluaron los niveles de FIXa. FIX-CTP<sub>3</sub> no se activó durante la purificación o el almacenamiento (tabla 23).

## ES 2 665 319 T3

Tabla 23: Detección de FIXa

Muestra	FIX- CTP <sub>3</sub>	rhFIX
<b>Conc. inicial (mg/ml)</b>	<b>1000</b>	<b>5.7</b>
<b>rFIXa (mg/ml)</b>	<b>BLQ</b>	<b>0.00487</b>
<b>% de FIXa en la muestra</b>	<b>BLQ</b>	<b>0.085</b>

5 Estudio PK-PD de FIX-CTP<sub>3</sub>: FIX-CTP<sub>3</sub> y rhFIX (BeneFIX®) se administraron en una única inyección intravenosa a los ratones C57Bl deficientes de FIX en una dosis de 625 µg/kg de peso corporal que contenía 100 UI de FIX/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 3 ratones alternativamente a las 0,25, 4, 24, 48, 72 y 96 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,32 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. Se evaluó el nivel del antígeno hFIX, y se realizó un análisis PK detallado. Para evaluar la capacidad de FIX-CTP<sub>3</sub> de prolongar la actividad de coagulación de los animales deficientes del FIX en comparación con BeneFIX®, se calculó la actividad del FIX en muestras plasmáticas citratadas, extraídas de ratones tratados FIX<sup>-/-</sup>, mediante el uso de un ensayo automatizado de la actividad del FIX (tabla 24).

Tabla 24: Descripción del estudio

	Producto	Administración	Dosis	Núm. de ratones	Puntos de extracción (horas después de la dosificación)	Cantidad requerida
<b>**Cohorte 1</b>	FIX-CTP <sub>3</sub>	Dosis única: IV	100 UI/Kg 2,5 UI/ratón (553 µg/ratón)	12 ratones,	0,25, 1, 4,8, 16, 24, 48	<b>6636 µg</b>
<b>Cohorte 2</b>	FIX-CTP <sub>3</sub>	Dosis única: IV	**472 µg/Kg 12,57 µg/ratón	18 ratones	*0,25,1*, 4*,8 *,16*, 24*, 48*, 72*,96*	<b>200 µg 12,57 µg/ratón</b>
<b>**Cohorte 3</b>	BeneFIX®	Dosis única: IV	100 UI/Kg 2,5 UI/ratón	18 ratones,	0,25, 1,4,8,16, 24, 48, *72,*96	<b>226,3 µg 12,57 µg/ratón</b>

\* Puntos de extracción para PK solo

\*\* Sangrado por la vena de la cola en T=48 después de la dosificación; cohortes 1 y 3

15 Perfil farmacocinético de FIX-CTP<sub>3</sub> en ratones FIX<sup>-/-</sup>

La concentración del FIX se cuantificó mediante el uso de estuches de ELISA para FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO). El perfil farmacocinético se calculó para cada proteína y es la media de tres animales en cada punto de tiempo. La tabla 25 más adelante y la figura 15 resumen las concentraciones de FIX calculadas en los diferentes puntos de tiempo de muestreo para las cohortes 1 y 3. Más adelante se presentan el perfil PK y un resumen de los parámetros PK (tablas 26 y 27). También se realizó un análisis PK para la cohorte #2 para verificar la exposición (datos no mostrados).

25

30

Tabla 25: Concentraciones de FIX

Punto de tiempo (horas)	FIX-CTP <sub>3</sub> ng/ml	BeneFIX® ng/ml
0.25	3645.397	2823.023
1	2411.09	2416.248
4	1703.205	1506.228
8	1139.736	864.764
16	415.32	347.465
24	238.37	158.7973
36	141.0105	94.40067
48	95.461	42.28833
72	76.90953	11.87567
96	24.955	BLQ

Se usó un módulo de dos compartimentos (programa informático WinLin) para determinar AUC<sub>0-inf</sub>, T<sub>terminal</sub> y aclaramiento (CL). Los parámetros PK se describen más adelante en la tabla 26.

5

Tabla 26: Propiedades PK

Versión del FIX	T <sub>1/2α</sub> (1/hr)	T <sub>1/2β</sub> (1/hr)	AUC ng/ml*hr	CL ml/Kg/hr	MRT (hr)	V <sub>ss</sub> (ml/Kg)
BeneFIX®	3.4	12.7	22428	29	11.5	320.8
FIX-CTP <sub>3</sub>	4	28.7	31770	19	22	425.2

La adición de los tres "casetes" de CTP al rhFIX prolongó el tiempo de vida media *in vivo* de FIX en al menos 2,5 veces. El AUC después de la administración *in vivo* de FIX-CTP<sub>3</sub> aumentó 2 veces frente a rhFIX. Los ratones inyectados con FIX-CTP<sub>3</sub> demostraron un mejor perfil PK en comparación con los ratones inyectados con BeneFIX®.

10

Perfil farmacodinámico de FIX-CTP<sub>3</sub> en ratones deficientes de FIX:

15

En paralelo al muestreo de PK, los animales deficientes del FIX administrados con BeneFIX® o FIX-CTP<sub>3</sub>, las muestras plasmáticas citratadas, se evaluaron en cuanto a su actividad de coagulación mediante el ensayo de aPTT, que se tradujo a % de actividad. El % de actividad en cada punto de muestreo se calculó como el tiempo de coagulación actual/tiempo de coagulación del plasma mezclado de ratones normales \* 100. La tabla 27 resume los valores de actividad después de la administración de BeneFIX® o FIX-CTP<sub>3</sub>.

20

Después de la administración de FIX-CTP<sub>3</sub>, se detectó una actividad de coagulación significativa una hora después de la administración que alcanzó el 96 % de actividad a las cuatro horas después de la dosificación, mientras que el mayor valor de actividad de BeneFIX® fue de 40 % (tabla 27, figura 16). La actividad de coagulación de FIX-CTP<sub>3</sub> se mantuvo durante un periodo de tiempo más prolongado, lo que demuestra una actividad prolongada. La actividad de coagulación para los ratones tratados con BeneFIX® no se detectó en los puntos de tiempo después de las 36 horas, mientras que los ratones tratados con FIX-CTP<sub>3</sub> mantuvieron una actividad medible a las 72 horas después de la dosificación (tabla 27, figura 16). El análisis del perfil farmacocinético del % de coagulación sugiere que la actividad de coagulación de FIX-CTP<sub>3</sub> se mantiene durante un periodo significativamente más prolongado y su tiempo de vida media es casi 2 veces mayor que para BeneFIX® (tabla 28).

25

30

35

40

Tabla 27: % de actividad de FIX

Horas después de la dosificación	BeneFIX® % de actividad	FIX-CTP <sub>3</sub> % de actividad
0.25	39.9	1.0
1	33.4	15.5
4	24.9	93.6
8	18.8	65.2
16	10.3	39.9
24	1.7	11.9
36	1.4	11.0
48	<1	4.6
72	<1	1.4

Tabla 28: Actividad de coagulación

Versión del FIX	T <sub>1/2</sub> α (1/hr)	T <sub>1/2</sub> β (1/hr)
BeneFIX®	5.7	-----
FIX-CTP <sub>3</sub>	7.3	16

5

9.3 Reto de sangrado en ratones deficientes de FIX

10 Los ratones deficientes de FIX se administraron con una única inyección intravenosa de 100 UI/kg de BeneFIX® o rFIX-CTP<sub>3</sub>. La vena de la cola se comprimió ligeramente 48 horas después de la dosificación, y se evaluaron el tiempo de sangrado por la vena de la cola (TVBT) y la intensidad del sangrado (DO de hemoglobina). Un segundo reto de sangrado se realizó 15 minutos después de alcanzar la homeostasis, y se midieron los mismos parámetros. Después del primer reto de sangrado, el sangrado de los animales administrados con FIX-CTP<sub>3</sub> fue significativamente menos intenso que el sangrado para BeneFIX® como se demuestra por los valores de DO de hemoglobina (figura 17).

15

20 Dado que se informó previamente que durante el primer reto de sangrado en ratones hemofílicos, el tiempo de sangrado no necesariamente se correlaciona con la eficacia del tratamiento, se recomienda evaluar la homeostasis después de un sangrado adicional. Una vez que el primer sangrado se detuvo espontánea o manualmente, se realizó un segundo reto de sangrado 15 minutos después del primero, y se volvieron a medir el tiempo y la intensidad del sangrado. Durante el episodio del segundo sangrado los animales administrados con FIX-CTP<sub>3</sub> tuvieron una reducción del tiempo de sangrado y de la intensidad, lo que demuestra que FIX-CTP<sub>3</sub> fue potente en puntos de tiempo más tardíos (figura 18).

25 Finalmente, los animales también se observaron durante las 12 horas después del segundo reto de sangrado, y se registraron todos los eventos de sangrado recurrentes. Los animales administrados con FIX-CTP<sub>3</sub> fueron capaces de mantener la homeostasis sanguínea durante las próximas 12 horas sin que volvieran a ocurrir eventos de sangrado. Por el contrario, el 50 % de los ratones tratados con BeneFIX® tuvieron episodios espontáneos de sangrado por la cola (tabla 29).

30

Tabla 29: Resultado 12 horas después del corte de la cola

Grupo de ratones	Nuevo sangrado tardío	Muerte o angustia que requiera eutanasia
FIX-CTP <sub>3</sub> (100 UI/kg)	0/5 (0 %)	0/5
BeneFIX® (100 UI/kg)	3/6 (50 %)	0/6
FIX-/- (no tratados)	5/6 (100 %)	1/6

35 FIX-CTP<sub>3</sub> recombinante, una proteína de fusión compuesta de una única molécula de FIX fusionada a tres "casetes" de CTP en tándem se desarrolló para abordar el corto tiempo de vida media de los productos de FIX disponibles actualmente que se usan para tratar a los pacientes con hemofilia B. Nosotros hemos demostrado que el tiempo de vida media de eliminación de rFIX-CTP<sub>3</sub> fue consistentemente 2,5 a 4 veces más prolongado que el de rFIX en ratas (como se informó previamente) y en ratones deficientes de FIX.

Sin estar atados por la teoría, la proteína de fusión reduce el aclaramiento del FIX y protege al FIX de la actividad de proteasas, la degradación por enmascaramiento y reduce la afinidad del FIX por los receptores hepáticos. En conjunto estas características del dominio CTP extienden el tiempo de vida media de FIX.

Además del análisis farmacocinético de rFIX-CTP<sub>3</sub>, examinamos las propiedades farmacodinámicas de FIX-CTP<sub>3</sub> en ratones deficientes de FIX. rFIX-CTP<sub>3</sub> y rFIX, se administraron en dosis comparables (en unidades) para compensar los niveles de deficiencia en la coagulación en los ratones deficientes de FIX. Sin embargo, el efecto de rFIX-CTP<sub>3</sub> en los ratones deficientes de FIX se prolongó significativamente a al menos 76 horas después de la dosificación, para alcanzar un pico de actividad mayor. La actividad de coagulación de FIX-CTP<sub>3</sub> comenzó después de un retraso de 1 hora en comparación con BeneFIX®. La activación de FIX puede requerirse ya que la adición de tres CTP en tándem podría enmascarar teóricamente el sitio de activación y retrasar el inicio de la cascada. Después de la administración de FIX-CTP<sub>3</sub>, se observó una actividad máxima del 100 %, mientras que la actividad de BeneFIX® fue de solo 40 %. La actividad inicial superior es un parámetro muy importante y demuestra que la adición de 3 CTP tiene el potencial de mejorar la recuperación.

La terapia de reemplazo de FIX de manera profiláctica para los pacientes con hemofilia B ayuda a mantener los niveles plasmáticos de 1-2 % de la actividad de coagulación normal. El ensayo de sangrado por la vena de la cola es una prueba *in vivo* sensible que mide la capacidad para mantener la homeostasis del sangrado a valores bajos de actividad lo cual imita el modelo de homeostasis del sangrado en humanos. En respuesta al reto de sangrado por la vena de la cola 48 horas después de la dosificación, los animales administrados con rFIX-CTP<sub>3</sub> mantuvieron la homeostasis sanguínea con episodios de sangrado más cortos y menos graves, lo que demuestra una actividad de coagulación sostenida.

FIX es una proteína compleja que contiene una serie de dominios funcionales que experimentan grandes modificaciones postraduccionales. Una de las modificaciones postraduccionales esenciales para la actividad del FIX es la gamma-carboxilación de los primeros 12 ácidos glutámicos en el dominio Gla por la  $\gamma$ -glutamil carboxilasa dependiente de la vitamina K. Esta modificación facilita la unión de FIX a las membranas fosfolípídicas y, por lo tanto, es crítica para su función. El FIX que no está gamma-carboxilado no es funcional, y por tanto la gamma-carboxilación es una etapa limitante de la velocidad.

Este estudio PK-PD se realizó mediante el uso de células transfectadas transitoriamente. Se realiza una amplia evaluación analítica de las modificaciones postraduccionales en la proteína FIX-CTP<sub>3</sub> estable producida y secretada por un clon optimizado estable.

Basado en los datos presentados, el factor de coagulación FIX-CTP<sub>3</sub> tiene el potencial de reducir la frecuencia de inyecciones en los pacientes que reciben dosis profilácticas de rutina de una terapia de reemplazo de FIX. Se anticipa que rFIX-CTP<sub>3</sub> puede conferir una protección prolongada contra la hemorragia después de cada dosis del factor, disminución de las unidades totales del factor necesarias para tratar los episodios de hemorragia, y/o mantenimiento de la hemostasis adecuada durante los procedimientos quirúrgicos con menos inyecciones.

#### Ejemplo 4

##### Generación y utilización del Factor de coagulación FVII

Una versión de acción prolongada del factor de coagulación Factor VII activado (FVIIa) será útil para el tratamiento de pacientes con hemofilia A y B. La proteína recombinante FVIIa-CTP<sub>3</sub> tiene el potencial clínico de mejorar el tratamiento de pacientes de hemofilia mediante la reducción de la frecuencia de infusiones e incluso mediante la reducción de la carga del fármaco, lo que permite un enfoque de tratamiento profiláctico que puede mejorar significativamente la calidad de vida del paciente, evitar episodios espontáneos de hemorragia y daño acumulado a la articulación y otros órganos.

En la presente se describe la generación de una molécula FVIIa recombinante-CTP con un tiempo de vida media prolongado basado en la fusión del FVII con un CTP humano. El FVIIa recombinante-CTP se expresó en células de mamífero y se caracterizó *in vitro* e *in vivo*. Se demostró que la actividad de rFVII-CTP fue comparable con rFVII. Los estudios farmacocinéticos y de eficacia en ratas demostraron mejores propiedades del rFVII-CTP. Los resultados de este estudio demostraron que es posible desarrollar una molécula de rFVIIa con tiempo de vida media prolongado con propiedades hemostáticas muy similares a la enzima de tipo silvestre.

Clonación y expresión de la molécula de FVII recombinante: Se construyeron numerosos clones del Factor VII en nuestro vector de expresión en eucariotas (pCI-dhfr) (figura 19). El clon de ADNc de FL verificado MGC humano (IRCM) que contiene la secuencia del factor de coagulación VII de *homo sapiens* se solicitó a "Open Biosystems" (OB-MHS4426). Los siguientes cebadores se sintetizaron por Sigma-Genosys en la siguiente secuencia: Cebador 67: 5'CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCC3' (contiene el extremo 5' del ADN del Factor VII y el sitio de restricción de XhoI) (sec. con núm. de ident.: 5); Cebador 68<sup>R</sup>: 5' TCTAGAATAGGTATTTTCCACATG3' (contiene el sitio de restricción de XbaI) (sec. con núm. de ident.: 6); Cebador 69: 5' TCTAGAAAAAGAAATGCCAGC3' (contiene el sitio

de restricción de XbaI) (sec. con núm. de ident.: 7); y Cebador 70<sup>R</sup>: 5'GCGGCCGCATCCTCAGGGAAATGGGGCTCGCA3' (contiene el extremo 3' del ADN del Factor VII y el sitio de restricción de NotI) (sec. con núm. de ident.: 8).

5 La clonación se realizó en dos conjuntos de reacciones de PCR. La primera reacción se realizó con el cebador 67 y el cebador 68<sup>R</sup> mediante el uso de un ADNc plasmídico con la secuencia del factor VII (OB-MHS4426) como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~534 pb, se aisló y se ligó al vector de clonación TA (Invitrogen, núm. de catálogo: K2000-01). Se aisló un fragmento de XhoI-XbaI que contenía el amino terminal de la secuencia del factor VII. La segunda reacción se realizó con el cebador 69 y el cebador 70<sup>R</sup> y de nuevo, un ADNc plasmídico con la secuencia del factor VII (OB-MHS4426) se usó como molde. Como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~813 pb y se ligó al vector de clonación TA (Invitrogen, núm. de catálogo: K2000-01). Se aisló un fragmento de XbaI-NotI que contenía el carboxilo terminal de la secuencia del factor VII. Los dos fragmentos se insertaron en nuestro vector de expresión en eucariotas pCI-dhfr (triple ligadura) para producir el clon 501-0-p136-1.

15 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. Un clon parcial del Factor VII (1180 pb-1322 pb) seguido por una secuencia CTP, una secuencia de terminación y una secuencia de NotI que se sintetizó por GeneArt (0721543) se digirió 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 en eucariotas pCI-dhfr (triple ligadura) para producir el clon 501-1-p137-2. pCI-dhfr-701-2-p24-2 se digirió con las enzimas de restricción XhoI y ApaI, y el fragmento grande (vector) se aisló.

25 pCI-dhfr-501-2-p137-2 (Factor VII-ctp x1) se digirió con las enzimas de restricción XhoI y ApaI, y se aisló un inserto de ~1200 pb. El vector y el inserto se ligaron para producir 501-2-p139-2. Las células Dg44 se sembraron en placas para cultivo de tejidos de 100 mm y se cultivaron hasta una confluencia de 50-60 %. Se usó un total de 2 µg de ADN para la transfección de una placa de 100 mm mediante el uso del reactivo FuGene (Roche) en medio libre de proteína (Invitrogen CD Dg44). El medio se eliminó a las 48 horas después de la transfección y se reemplazó con un medio libre de proteína (Invitrogen CD Dg44) sin nucleósidos. Después de 14 días, la población celular transfectada se transfirió a matraces T25 para el cultivo de tejidos, y la selección se continuó durante 10-14 días hasta que las células comenzaron a crecer bien como un clon estable. Los clones con alta expresión se seleccionaron y se usaron aproximadamente  $2 \times 10^7$  células para inocular 300 ml de medio de crecimiento en una botella tipo rodillo de 1700cm<sup>2</sup> (Corning, Corning NY), suplementado con vitamina K3 a 5 ng/ml (menadiona bisulfato de sodio; Sigma). El medio de producción (cosecha) se recogió después de una disminución rápida en la viabilidad celular hasta alrededor de 70 %. El medio de producción se clarificó primero y después se concentró aproximadamente 20 veces y se dializó con PBS mediante el uso de un casete de filtración de flujo (10KDaMWCO; Millipore Corp, Billerica, MA).

#### Determinación del nivel del antígeno FVII

40 El ADNc que codifica al péptido CTP se fusionó al extremo 3' del ADNc que codifica al FVII humano. La construcción de rFVII correspondiente se transfectó a las células Dg44. Como control, se utilizó un ADNc de rFVII humano. El medio de producción (cosecha) se recogió, se concentró y el FVII recombinante secretado se evaluó adicionalmente. Se determinaron los niveles de los antígenos rFVII, rFVII-CTP y rFVII-CTP-CTP mediante un estuche de ELISA para FVII humano AssayMax (AssayPro) (figura 20A). No se encontraron diferencias significativas en el nivel de secreción de rFVII-CTP y rFVII-(CTP)<sub>2</sub> en comparación con rFVII nativo.

#### 45 Transferencias de SDS-PAGE

50 El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante la carga de 50 ng de cada proteína rFVII de cosecha, purificada o activada. Las muestras se cargaron en gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se llevó a cabo mediante la realización de una inmunotransferencia Western con el uso de un anticuerpo monoclonal anti-FVII humano (Ac) (R&D systems) o un anticuerpo policlonal anti-CTP generado en conejo.

55 El nivel del antígeno rFVII se correlacionó con el nivel detectado de proteína en una inmunotransferencia de SDS-PAGE con Ac anti-FVII. El rFVII-CTP migró como una única banda, mientras que el peso molecular correspondiente del control de FVII fue de aproximadamente 52 KDa (datos no mostrados). Ambas proteínas reaccionaron con los anticuerpos específicos para FVII en las inmunotransferencias. El rFVII-CTP también reaccionó con anticuerpos específicos para CTP. rFVII se secretó en su forma de zimógeno sin traza de la proteína activada.

#### 60 Actividad cromogénica de FVII:

65 Las actividades de rFVII, de la cosecha de rFVII-CTP y de rFVII-(CTP)<sub>2</sub> se determinaron mediante el uso de un estuche de prueba cromogénica disponible comercialmente (estuche de ensayo para la actividad cromogénica del FVII humano AssaySense (AssayPro). Para la caracterización funcional del rFVII-CTP y su capacidad para activarse adicionalmente (FVIIa), el rFVII-CTP concentrado (cosechas) se colocaron en un estuche de prueba cromogénica disponible comercialmente que mide la capacidad de TF/FVIIa para activar el Factor X a Factor Xa que en presencia

del sustrato específico de FXa libera una señal cuantificable (AssayPro). La adición del péptido CTP en el extremo C-terminal de la proteína rFVII no deterioró la actividad de serina proteasa del FVII (figura 20B, 20C).

Actividad de coagulación del FVII:

5 El tiempo de protrombina (PT) mide la vía de coagulación extrínseca. El PT es el tiempo (medido en segundos) necesario para que el plasma coagule después de la adición de un activador de la vía extrínseca, fosfolípido y calcio. Se usa para determinar la tendencia de coagulación de la sangre, específicamente en la medida de la dosificación de warfarina, daño hepático, y estado de la vitamina K. El intervalo de referencia para el tiempo de protrombina está  
10 usualmente alrededor de 12-15 segundos. Específicamente, el ensayo cuantificó la capacidad de la cosecha de FVII-CTP y FVII-(CTP)<sub>2</sub> para restaurar la actividad de coagulación del plasma humano con agotamiento de FVII mediante la adición de rhFVII. Se mezclaron 300 µl de plasma humano deficiente de FVII con 100 µl de FVII, cosechas de FVII-CTP y FVII-(CTP)<sub>2</sub> a concentraciones específicas, o plasma humano normal mezclado y se diluyeron adicionalmente. Después de una incubación de 60 segundos a 37 °C, se añadió el factor tisular (TF),  
15 CaCl<sub>2</sub>, y fosfolípidos a la mezcla. Se determinó el tiempo de coagulación en segundos. La potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta de las cosechas de FVII-CTP y FVII-(CTP)<sub>2</sub> con una preparación de referencia que consistió en rhFVII o plasma humano mezclado. Una unidad de FVII activo se definió como la cantidad de FVII que iguala la actividad de un ml de plasma humano normal. La actividad de coagulación por PT de rFVII y rFVII-CTP se midió en un coagulómetro (Instrumentation Laboratory).

20 Como se mostró previamente, la adición de un péptido CTP en el extremo C-terminal de la proteína rFVII no afectó su actividad de serina proteasa y condujo a la iniciación y activación de un Factor X nativo y Factor IX en plasma humano. Después de la inserción de un CTP adicional en el C terminal, hubo una reducción de tres veces en la actividad de serina proteasa (datos no mostrados).

25 Estudio farmacocinético:

Las cosechas de rFVII, rFVII-CTP, y rFVII-(CTP)<sub>2</sub> se administraron por vía intravenosa a las ratas Sprague-Dawley (seis ratas por sustancia) con una dosis de 100 µg/kg de peso corporal. Para todos los experimentos *in vivo*, la  
30 cantidad de la proteína respectiva se determinó sobre la base de un estuche de ELISA para FVII. Para cada sustancia de prueba FVII, la cantidad inyectada se calculó teniendo en cuenta las diferencias en el peso molecular de rFVII frente a rFVII-CTP, lo que conduce a una concentración molar diferente.

35 Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital mediante el uso de un esquema de muestreo alternante para minimizar la interferencia del procedimiento de muestreo en los niveles a cuantificar: de 3 ratas a los 30 y 90 min y a las 2, 6 y 48 horas, y de las tres ratas restantes a los 15 y 60 min y a las 1,5, 4, y 24 horas alternativamente. El plasma se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. La concentración de FVII se cuantificó mediante un ensayo específico ELISA para FVII. El tiempo de vida media y el área bajo la curva (AUC) se calcularon mediante el uso de una regla trapezoidal lineal. La comparación  
40 de estos parámetros de aclaramiento revelaron que el tiempo de vida media *in vivo* y el AUC de rFVII-(CTP)<sub>2</sub> son significativamente mayores que los de rFVII (tabla 30).

Tabla 30: Parámetros del estudio PK

Grupo	Vía	Dosis	T <sub>1/2</sub>	AUC <sub>0-t</sub>	CL/F	MRT
		µg/kg	min	ng/min/mL	mL/min/kg	min
FVII	IV	60	4.07	3314.7	6.195	6.2
FVII-CTP	IV	60	B=51.06	31353.9	0.287	73.7
FVII-CTP-CTP	IV	60	B=13.66	7626.8	1.18	15.4

45 Caracterización de FVIIa recombinante-CTP:

Durante la activación, el FVII se escinde en R152 lo que resulta en que los dominios de las cadenas pesada y ligera se mantienen juntos por un único puente disulfuro. rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> se purifica y activa mediante un proceso de  
50 purificación en una columna de intercambio iónico. Para evaluar completamente el rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>, la proteína se carga en SDS-PAGE en condiciones reductoras para el FVIIa comercial (NovoSeven®). Los dominios de la cadena pesada y la ligera se separan y migran como bandas separadas de pesos moleculares 55 y 25 KDa. Ambas proteínas reaccionan con anticuerpos específicos para FVII, pero la cadena pesada del rFVIIa-CTP reacciona específicamente con anticuerpos específicos anti-CTP, lo que indica que esta banda representa la cadena pesada

de FVII fusionada al CTP. La cadena ligera reacciona específicamente con Ac anti-gamma carboxilasa. La concentración de la proteína FVIIa se determina mediante el estuche de ELISA específico para FVIIa.

Secuenciación del N-terminal de FVIIa:

5 rFVII-CTP-CTP en proteínas purificadas activadas o como zimógeno se separa mediante SDS-PAGE (en Tris-glicina al 12 %) y posteriormente se electrotransfiere a una membrana de PVDF. Las bandas de interés se cortan y se colocan en un filtro de fibra de vidrio purificado y tratado con Biobrene. El análisis de la secuencia del N-terminal se lleva a cabo mediante degradación de Edmann con el uso de un secuenciador de proteína líquida con pulsos, 10 equipado con un sistema de microgradientes HPLC 140C. La identidad de la proteína recombinante y la adecuada escisión del pro péptido se verifican adicionalmente mediante secuenciación del N-terminal.

Actividad de coagulación del FVIIa:

15 Para evaluar la actividad de coagulación de FVII-(CTP)<sub>2</sub>, se realiza un ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). La muestra de plasma deficiente de FVII se sustituye con rFVIIa (NovoSeven®) o rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>. Se mezclan 300 µl de plasma humano deficiente de FVII con 100 µl de FVIIa o rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> a las concentraciones específicas, o plasma humano mezclado normal que se diluye adicionalmente. Después de una incubación de 60 segundos a 37 °C, se añaden el factor tisular (TF), CaCl<sub>2</sub> y fosfolípidos a la mezcla. Se determina el tiempo de 20 coagulación en segundos. La potencia se evalúa mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta de rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> con una preparación de referencia que consiste en rhFVIIa o plasma mezclado normal humano. Una unidad de FVIIa se define como la cantidad de FVIIa que iguala la actividad de 1 ml de plasma humano normal. La actividad de coagulación por aPTT del rFVII y rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> se mide en un coagulómetro (Instrumentation Laboratory). La actividad de coagulación por aPTT de rFVIIa y rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> es similar.

25 Estudios farmacocinéticos en ratas:

Para caracterizar la influencia de la adición de CTP al rFVIIa sobre su potencial de longevidad, se realiza un estudio farmacocinético comparativo en ratas. NovoSeven® (rFVIIa) y rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> en TBS se inyectaron IV a 6 ratas SD. 30 Los niveles de FVIIa en el tiempo se detectan mediante el uso de un estuche de ELISA para FVIIa. El tiempo de vida media y el AUC se calculan para cada proteína. La comparación de estos parámetros de aclaramiento revela que las medidas del tiempo de vida media *in vivo*, la recuperación y el AUC del rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> son superiores a las de NovoSeven®.

35 Modelo de eficacia de FVIIa-CTP *in vivo* (modelo de hemofilia en ratón deficiente de FVIII):

Para evaluar el modelo de actividad *in vivo*, se obtienen ratones con inactivación del FVIII, y se establece una colonia de reproducción. 10 µg de hFVIIa recombinante comercial (NovoSeven®) o rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> se inyectaron en la vena de la cola de un ratón con inactivación del FVIII anestesiado (22-28 g). La cantidad de proteína inyectada es 40 igual a la concentración requerida de FVIII en el plasma normal (5 µg/ml). Las muestras de sangre se toman de la cola comprimida a los tubos capilares heparinizados en puntos de tiempo específicos. Las muestras de plasma se evalúan en cuanto a los niveles de FVIIa mediante ELISA, y la eficacia se mide mediante un ensayo de coagulación de PTT.

En este estudio, se genera una construcción de fusión del FVII con CTP. Esta proteína recombinante es la base para 45 un tratamiento que proporciona un tiempo de vida media prolongado y retención de la potencia terapéutica.

Estos resultados sugieren que rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> tiene una eficacia terapéutica similar al rFVIIa en pacientes de hemofilia. Además, esta tecnología requiere una dosificación menos frecuente. Parece que una única inyección de rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> es suficiente para controlar los episodios de hemorragia y reducir la cantidad de inyecciones que se 50 necesitan durante una intervención quirúrgica. Esta proteína recombinante puede usarse como un tratamiento profiláctico a largo plazo.

Ejemplo 5

55 Evaluación comparativa de FVII-CTP<sub>3</sub>, FVII-CTP<sub>4</sub>, y FVII-CTP<sub>5</sub> purificados

5.1 Objetivo del estudio

60 Evaluación comparativa de los parámetros farmacocinéticos y la actividad de coagulación de FVII-CTP<sub>4</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> frente a FVII-CTP<sub>3</sub>.

5.2 Producción de las cosechas de FVII-CTP<sub>4</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub>

65 El ADNc del FVII fusionado en el extremo C-terminal a cuatro o cinco secuencias de CTP en tándem se expresó en células Dg44 mediante el uso del sistema de expresión Excellgene en presencia de vitamina K3 a 20 µg/L (Sigma, Mennadion). La cosecha se recogió (300 ml), se filtró y congeló.

5.3 Producción de la cosecha de FVII-CTP<sub>3</sub>

FVII-CTP<sub>3</sub> se expresó en el laboratorio en sistema de expresión en mamíferos, células CHO, mediante el uso del vector pCI-DHFR. La mezcla estable transfectada #71 se cultivó en matraces de agitación, en presencia de vitamina K3 a 25 ng/L (Sigma). Las cosechas se recolectaron y filtraron.

Todas las cosechas de FVII-CTP (3, 4 y 5 CTP) se concentraron y dializaron contra TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) mediante el uso de Pellicon XL MWCO 10 kDa.

5.4 Determinación del nivel del antígeno FVII

El nivel del antígeno FVII se determinó mediante el uso de un estuche de ELISA para FVII humano (Zymotest HyPhen) (tabla 31). La concentración de proteínas calculada es el promedio de dos ejecuciones independientes.

Tabla 31: Nivel del antígeno FVII

	FVII-CTP <sub>3</sub>	FVII-CTP <sub>4</sub>	FVII-CTP <sub>5</sub>
<b>Pr. (ng/ml)</b>	224357.3	87884.1	589423
<b>SD</b>	44789.5	3248.7	5309
<b>%CV</b>	20.0	3.7	9

5.5 Inmunotransferencia de FVII-CTP

Las cosechas de FVII-CTP<sub>3</sub>, FVII-CTP<sub>4</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> se cargaron en gel de Tris-glicina al 12 % (*expedon*) mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante inmunotransferencia Western con el uso del Ac policlonal anti-CTP (Adar Biotech Production) o Ac anti-Gla (American Diagnostica).

El FVII fusionado a tres, cuatro y cinco CTP migró a 80, 90 y 100 KDa, respectivamente. Como se esperaba, las cosechas de FVII-CTP<sub>4</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> de Excellgene contienen bajo contenido de gamma carboxilación en comparación con la cosecha de FVII-CTP<sub>3</sub> que se produjo en Prolor ya que el proceso de producción no se optimizó (figura 21).

5.6 Evaluación comparativa de la potencia de FVII *in vitro*

Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de FVII-CTP<sub>3</sub>, FVII-CTP<sub>4</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> purificadas en HA (fracción altamente gamma carboxilada) frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). Todas las muestras se diluyeron en serie, y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia que consistió en plasma normal humano. FVII-CTP<sub>3</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> demostraron menor actividad cromogénica que el plasma normal mezclado (figura 22). FVII-CTP<sub>4</sub> demostró mayor actividad como se refleja por las relaciones de EC50, en comparación con FVII-CTP<sub>3</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> (tabla 32).

Tabla 32: Actividad de coagulación de FVII *in vitro*

Muestra	EC50 (ng/ml)	Relación de EC50 muestra/plasma
<b>Plasma</b>	0.05	
<b>FVII 3CTP</b>	0.12	2.72
<b>FVII 4CTP</b>	0.03	0.71
<b>FVII 5CTP</b>	0.06	1.35

5.7 Actividad de coagulación del FVII *in vitro*:

El ensayo de actividad del Factor VII (FVII), que se realizó en Sheba Medical Center, Centro Nacional de Coagulación de Israel, es un ensayo basado en la protrombina (PT) mediante el uso de plasma inmuno-adsorbido deficiente en el Factor VII (Siemens). El reactivo del PT es innovin, y el ensayo se realiza en el instrumento CA 1500 Sysmex®. El intervalo normal del FVII está dentro de 55-145 %.

5

Tabla 33: Actividad cromogénica de FVII *in vitro*

Muestra	% de actividad de FVII	Concentración en la muestra analizada (µg/ml)	Concentración (µg/ml)
<b>FVII 3CTP</b>	36	0.5	224.2
	18	0.25	
	6	0.125	
<b>FVII 4 CTP</b>	334	0.5	87.9
	176	0.25	
	93	6.25	
<b>FVII 5 CTP</b>	38	0.5	58.9
	19	0.25	
	10	0.125	

10 Dado que el nivel normal de FVII circulante en el cuerpo es alrededor de 0,5 µg/ml, las cosechas de FVII-CTP<sub>3</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> muestran reducciones de 3 veces en su actividad de coagulación frente al plasma mezclado normal humano; este resultado se correlaciona con la actividad cromogénica obtenida (tabla 33).

15 La cosecha de FVII-CTP<sub>4</sub> muestra un aumento de 3 veces en su actividad de coagulación potencial frente al plasma mezclado normal humano como se observa en el ensayo de actividad cromogénica (tabla 33). El porcentaje de actividad de FVII-CTP<sub>4</sub> es mucho mayor en comparación con el porcentaje de actividad de FVII-CTP<sub>3</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub>. Las limitaciones metodológicas del método de ELISA pueden limitar la precisión de los cálculos del nivel de Ag de FVII-CTP<sub>4</sub>.

20 5.8 Estudio farmacocinético

25 Se realizaron dos estudios farmacocinéticos para determinar los parámetros farmacocinéticos (PK) de FVII-CTP<sub>3</sub>, FVII-CTP<sub>4</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub>. Durante el primer estudio, FVII-CTP<sub>3</sub>, FVII-CTP<sub>4</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> (Grupos A, B y C, respectivamente) se administraron en una única inyección intravenosa a las ratas Sprague Dawley (seis ratas por tratamiento) en una dosis de 250 µg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 3 ratas alternativamente a las 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72 y 96 horas después de la dosificación (tabla 34). El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Tabla 34: Diseño del estudio farmacocinético – Cosecha concentrada

Grupo de tratamiento	Elemento de prueba	Núm. animales/grupo/punto de tiempo	Vía de dosificación	Nivel de dosis (µg por animal)	Vol. inyectado (µl)	Conc. (µg/ml)	Puntos de tiempo (horas después de la dosificación)
A	FVII-CTP*3	6	IV	50	200	250	0 (Antes de la dosis) 0.083, 0.5, 2, 5, 8, 24,48,72,96
B	FVII-CTP*4	6	IV	50	200	250	0 (Antes de la dosis) 0.083, 0.5, 2, 5, 8, 24,48,72,96
C	FVII-CTP*5	6	IV	50	200	250	0 (Antes de la dosis) 0.083, 0.5, 2, 5, 8, 24,48,72,96

30

La concentración de FVII en las muestras de plasma se cuantificó mediante el uso de estuches de Elisa para FVII humano (Zymutest FVII-Biophen). El perfil farmacocinético se calculó y es la media de 3 animales en cada punto de tiempo. Los valores del tiempo de vida media terminal se calcularon mediante el uso del programa informático PK Solutions 2.0. La tabla 35 más adelante resume las concentraciones calculadas de FVII en los diferentes puntos de tiempo de muestreo. El perfil PK (Figuras 23-24) y un resumen de los parámetros PK (tabla 36) también se presentan más adelante. FVII-CTP<sub>5</sub> demostró un perfil superior en comparación con FVII-CTP<sub>3</sub> y FVII-CTP<sub>4</sub> (tabla 36).

Tabla 35: Primer estudio farmacocinético – Concentraciones de FVII

Tiempo (horas)	PROM-FVII-3-CTP (ng/ml)	SD	PROM-FVII-4-CTP (ng/ml)	SD	PROM-FVII-5-CTP (ng/ml)	SD
0.083	4214	583	3600	427	4888	504
0.5	3386	892	5213	1682	5384	2549
2	1138	219	3603	1338	3082	289
5	1390	374	2726	1127	2480	561
8	333	167	1349	44	2316	633
24	133	12	476	98	788	34
48	38	3	165	24	384	61
72	12	2	91	62	167	31
96	26	1	42	8	93	49

Tabla 36: Análisis farmacocinético

	FVII 3-CTP	FVII-4-CTP	FVII-5CTP
Tiempo de vida media (0.083-8 hr) (horas)	2.5	4.9	6.6
Tiempo de vida media (8-72 hr) (hr)	13.3	16.6	17.7
AUC (ng-hr/ml)(8-72hr)	18374.6	51224.4	72954.2
Vd (ml/kg)(8-72hr)	203.7	91.9	67.7
CL(ml/hr/kg) (8-72hr)	10.6	3.8	2.7

La adición de cuatro o cinco CTP prolongó significativamente el tiempo de vida media del FVII en comparación con 3 CTP en 2 y 3 veces, respectivamente (tabla 36). Esta superioridad fue más significativa en la parte inicial del estudio (0,083-8 horas), lo que sugiere una mejor recuperación potencial de la proteína y reducción del aclaramiento extravascular. El AUC después de la administración de FVII-CTP<sub>4</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> aumentó en 3 y 4 veces, respectivamente, frente a FVII-CTP<sub>3</sub>. El aclaramiento también se redujo cuando se añadieron 4 y 5 CTP al FVII (tabla 36).

Como se observó en el estudio, la adición de cuatro y cinco CTP prolongó significativamente el tiempo de vida media del FVII en comparación con 3 CTP, tanto del tiempo de vida media inicial como terminal. Los valores del tiempo de vida media en el primer y segundo estudios son diferentes debido a un enfoque diferente del análisis que se realizó por la dosis y la duración del estudio, sin embargo se mantuvo la tendencia general. El AUC después de la administración de FVII-CTP<sub>4</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> aumentó en 2,5 y 7 veces, respectivamente, frente a FVII-CTP<sub>3</sub>.

#### 5.9 Conclusiones:

En este estudio, se evaluaron los parámetros PK y la actividad de coagulación potencial de FVII-CTP<sub>3</sub>, FVII-CTP<sub>4</sub>, y FVII-CTP<sub>5</sub>. La fusión de 4 y 5 CTP al FVII proporcionó un superior y mejor tiempo de vida media, exposición y reducción del aclaramiento en comparación con FVII-CTP<sub>3</sub> a la vez que se mantuvo una similar actividad cromogénica y de coagulación *in vitro*. Estos resultados se observaron a diferentes concentraciones de proteína y fueron consistentes para la proteína de la cosecha y la purificada. Al evaluar el efecto general de la fusión de CTP

en el extremo C terminal al FVII, la fusión de 1-5 CTP aumentó considerablemente el tiempo de vida media y el AUC de FVII de una manera proporcional a los CTP, lo que sugiere que a medida que aumenta la porción CTP de la molécula, la longevidad y la estabilidad del FVII mejoran significativamente a la vez que mantiene su actividad de coagulación inicial *in vitro*, como se resume en la tabla 37 a continuación.

5

Tabla 37:

Evaluación comparativa	Aumento del por ciento de T <sub>1/2</sub>	Aumento del por ciento de AUC
<b>FVII vs. FVII-CTP<sub>2</sub></b>	268	200
<b>FVII-CTP<sub>2</sub> vs. FVII-CTP<sub>3</sub></b>	67	57.8
<b>FVII-CTP<sub>3</sub> vs. FVII-CTP<sub>4</sub></b>	24	178
<b>FVII-CTP<sub>4</sub> vs. FVII-CTP<sub>5</sub></b>	6	42

Como se informó previamente, el tiempo de vida media del FVII se correlaciona con el tiempo de vida media de la forma activada del FVII (FVIIa) en humanos y animales. Por lo tanto, se prevé que se obtendrá una mejora similar en el tiempo de vida media para las versiones activadas después de la fusión de CTP.

10

Ejemplo 6

Estudios de factibilidad del FVII-CTP<sub>3</sub> en ratones hemofílicos deficientes de FVIII

15

Se realizaron los estudios descritos anteriormente que prueban el perfil PK y la actividad de coagulación de las cosechas de FVII-CTP, FVII-CTP<sub>2</sub> y FVII-CTP<sub>3</sub> frente a un FVII comercial. FVII-CTP<sub>3</sub> mostró un mejor perfil PK a la vez que mantuvo su actividad de coagulación frente a las cosechas de FVII-CTP y FVII-CTP<sub>2</sub> o rhFVII. Para caracterizar adicionalmente las propiedades de FVII-CTP<sub>3</sub> *in vitro* e *in vivo*, se generó una mini mezcla estable que expresaba y secretaba la proteína, y se desarrollaron procesos de purificación y activación.

20

En este estudio, las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de FVIIa-CTP<sub>3</sub> se analizaron en ratones deficientes de FVIII. Se evaluó el perfil PK de la proteína. Se estableció un perfil PK basado en la actividad específica de FVIIa y en comparación con el producto comercial NovoSeven®. Además, se analizaron las capacidades hemostáticas a largo plazo *in vivo* de FVIIa-CTP<sub>3</sub> para inducir la coagulación en ratones deficientes de FVIII después de un corte de la vena de la cola (estudio de supervivencia).

25

Objetivos del estudio:

30

Evaluar los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de FVIIa-CTP<sub>3</sub> frente al rhFVIIa comercial (NovoSeven®) en ratones deficientes de FVIII después de una única administración IV a una dosis de actividad similar.

35

Determinar la capacidad *in vivo* del FVIIa-CTP<sub>3</sub> para mantener la homeostasis en ratones deficientes de FVIII mediante una única administración IV de FVIIa-CTP<sub>3</sub> y NovoSeven® a una dosis de la actividad similar seguido por un reto de corte de la vena de la cola (estudio de supervivencia).

Producción de la cosecha de FVII-CTP<sub>3</sub>:

40

FVII-CTP<sub>3</sub> se expresó en el laboratorio en células Dg44 mediante el uso de un vector pCI-DHFR. La mezcla estable transfectada #71 se cultivó en matraces de agitación, en presencia de vitamina K3 a 25 ng/L (Sigma). La suspensión celular se cultivó y cosechó después que la viabilidad disminuyó a 60-80 %. La cosecha se filtró y congeló a -70 °C. Determinación del nivel del antígeno FVII de cosecha:

45

El nivel del antígeno FVII se determinó mediante el uso de un estuche de ELISA para FVII humano (Zymotest HyPhen) (tabla 38). El nivel del antígeno se calculó por cada lote de cosecha mezclado.

Tabla 38: Nivel del antígeno FVII-CTP<sub>3</sub>

	Nivel del antígeno FVII		Estudio de supervivencia cosecha 38
	Estudio de PK-PD		
	cosecha 31A	cosecha 31B	
<b>Pr. (µg/ml)</b>	16.0	15.9	16.6
<b>STD</b>	1.5	0.0	0.8
<b>%CV</b>	9.1	0.1	4.9

50

Proceso de purificación de FVII-CTP<sub>3</sub> (figura 25)

Descripción del proceso

5 Después de un corto estudio de purificación, se realizó el siguiente proceso de purificación mediante el uso de 2 columnas. La proteína enriquecida  $\gamma$ -carboxilada FVII-CTP<sub>3</sub> se purificó en columna de afinidad VII-Select (GE) e hidroxapatita cerámica tipo 1 (HA), 40  $\mu$ m (Bio Rad). La autoactivación se indujo mediante incubación de FVII-CTP<sub>3</sub> purificado en presencia de CaCl<sub>2</sub> durante la noche a 2-8 °C. El proceso de purificación está en su etapa final de desarrollo y se está optimizando, por lo tanto parte de las etapas de purificación no son idénticas en los dos lotes.

10 Ultrafiltración/diafiltración (UFDf) mediante el uso del casete de fibra hueca de 10 KDa o Pellicon

La cosecha clarificada se descongeló a 4 °C durante el fin de semana (2-3 días).

15 En el lote 31, la cosecha clarificada (12 litros) se concentró 4 veces (en dos ejecuciones sucesivas) mediante el uso de un cartucho de fibra hueca (GE Healthcare catálogo núm. UFP-10-C-4X2MA) con un valor de corte del peso molecular de 10 KDa. La cosecha concentrada se diafiltró contra 1-2 volúmenes de TBS (Tris 50 mM NaCl 150 mM pH 7,4).

20 En el lote 38, la cosecha clarificada (8,5 litros) se concentró 4 veces mediante el uso de un casete Pellicon 2 (Millipore) con un valor de corte del peso molecular de 10 KDa. La cosecha concentrada se cargó directamente en una columna VII-Select.

25 Ambas ultrafiltraciones se realizaron en hielo con tampones fríos. Las muestras UFDf se filtraron por 0,22  $\mu$ m antes de la carga.

Captura en la columna FVII-Select

30 La cosecha por UFDf o concentrada se cargó en la columna VII-Select (XK16/20, CV 18 ml), equilibrada previamente con TBS pH 7,4. La columna se lavó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5M, pH 7,5, y FVII-CTP<sub>3</sub> se eluyó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M 50 % (v/v), propilenglicol pH 7,5. El proceso se realizó en dos ciclos sucesivos con la utilización de la misma columna.

35 Separación basada en la gamma carboxilación en una columna de hidroxapatita cerámica

El producto eluido se diluyó 1:10 con fosfato de sodio 10 mM, pH 6,8 y se cargó en columnas de hidroxapatita cerámica (XK16/20, CV 24 ml). La columna se lavó con fosfato de sodio 59 mM, pH 6,8 y la fracción rica  $\gamma$ -carboxilada del Factor VII se eluyó con fosfato de sodio 500 mM, pH 6,8. Este proceso se realizó en dos ciclos sucesivos en la misma columna. En cada lote, los eluatos de los dos ciclos se combinaron y concentraron a 1,7-2 mg/ml y se diafiltraron con Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM pH 8,2 para reducir el volumen y preparar el material para la etapa de activación.

Activación de FVII

45 El FVII-CTP<sub>3</sub> purificado se diluyó a 1 mg/ml y se incubó en Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 8,2 a 2-8 °C durante 24 horas. La activación se terminó mediante intercambio del tampón (UFDf) al tampón de formulación preliminar (citrato 20 mM, NaCl 240 mM, glicina 13,3 mM, pH 6,9).

Propiedades analíticas de FVII-CTP<sub>3</sub> y FVIIa-CTP<sub>3</sub>:

50 SDS-PAGE y transferencias Western

El FVII-CTP<sub>3</sub> purificado, y FVIIa-CTP<sub>3</sub> se cargaron en gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis del SDS-PAGE Coomassie se realizó mediante tinción del gel con el reactivo azul brillante de Coomassie (5 o 10  $\mu$ g de proteína/carril). Se realizó un análisis por transferencia Western (1  $\mu$ g de proteína/ carril) mediante el uso del Ac policlonal anti-FVII humano (R&D systems; AF2338), anticuerpo monoclonal anti-gamma carboxilación humana (American Diagnostics catálogo #499, 3570), y Ac policlonal anti-CTP. En condiciones reducidas, el FVII-CTP<sub>3</sub> migró a 75 KDa, y FVIIa-CTP<sub>3</sub> migró como dos bandas principales: una cadena pesada a 50 kDa, y una cadena ligera a 25 kDa, representado en la figura 26 como las bandas 2 y 3, respectivamente.

El procedimiento de purificación enriqueció significativamente la porción FVII-CTP<sub>3</sub> a la vez que redujo las impurezas. El rendimiento del proceso de purificación fue de 25-30 % de FVII (de acuerdo con ELISA). La mayor parte de la proteína perdida durante la purificación tenía baja actividad cromogénica del FVII o no tenía actividad. Basado en SDS-PAGE teñido con Coomassie, el FVIIa-CTP<sub>3</sub> reducido contiene más bandas que las predichas. Una banda que migra a alrededor de ~75 kDa representa el FVII no-activado (figura 26, Banda 1). Esta banda consiste

en dos bandas con diferencias menores de PM, que podrían reflejar diferente contenido de  $\gamma$ -carboxilación. Se observaron bandas adicionales con PM menor que 20 kDa. Previamente se informó que estos son productos de degradación de la cadena pesada.

5 Actividad cromogénica de FVII-CTP<sub>3</sub>:

Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de la cosecha de FVII-CTP<sub>3</sub>, las fracciones durante el proceso, y FVII-CTP<sub>3</sub> purificado frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). La cosecha de FVII-CTP<sub>3</sub> y la proteína se diluyeron en serie y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia de plasma normal humano. Después de la purificación de FVII-CTP<sub>3</sub>, la actividad cromogénica mejoró significativamente, y las fracciones no activas se separaron principalmente mediante columna HA (figura 27). Se observó una fuerte correlación entre la actividad cromogénica de FVII y la detección de FVII con anticuerpos monoclonales anti-Gla en la transferencia Western. La potencia de la actividad cromogénica de FVII como se refleja por el valor de EC50 en la cosecha se afecta por ambas fracciones de FVII carboxiladas y no carboxiladas. Después de la purificación y el enriquecimiento de la fracción  $\gamma$ -carboxilada de FVII-CTP<sub>3</sub>, la actividad mejoró, lo que demuestra la contribución importante de la  $\gamma$ -carboxilación para la actividad de FVII (figura 27). Este parámetro es crucial para una adecuada actividad de FVII *in vivo* y se abordará adicionalmente en un programa de desarrollo de clones.

20 Determinación de proteínas por A280

El coeficiente de extinción teórico de FVIIa-CTP<sub>3</sub> y NovoSeven® se calculó mediante el uso del algoritmo ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>). El cálculo se basa en la secuencia de aminoácidos. Los coeficientes de extinción calculados para FVII-CTP<sub>3</sub> y NovoSeven® son 1,186 y 1,406, respectivamente. Estos valores representan la absorbancia de 1 g/L a 280 nm.

La diferencia de los coeficientes de extinción entre las dos proteínas se deriva solamente del aumento en el peso molecular de FVIIa-CTP<sub>3</sub> en comparación con NovoSeven®, dado que el CTP carece de residuos aromáticos y de cisteína, por lo tanto no contribuye a la absorbancia.

La determinación de proteínas por A280 se usa para FVII final, y para las muestras purificadas durante el proceso, que inició desde la elución de la columna VII-Select.

35 Determinación del nivel del antígeno FVIIa

El nivel del antígeno FVIIa se determinó mediante el uso del estuche de ELISA para FVIIa humano (IMUBIND, American Diagnostica). El nivel del antígeno se calculó por cada lote. Sin embargo, esta herramienta no fue útil para la determinación de la dosis para la inyección, ya que no representa la cantidad de producto activo.

40 Ensayo de coagulación de FVIIa- Staclot® VIIa-rTF

FVIIa se deriva de una escisión intracatenaria del FVII monocatenario. El factor tisular nativo (TF) es un cofactor de FVIIa. Después de la unión a TF, el FVII media la activación del Factor X a Xa, mientras que él mismo se transforma a FVIIa. El factor tisular soluble es la parte extracelular del factor tisular nativo. Éste ya no puede activar el FVII por autoactivación, pero el FVIIa unido al factor tisular puede activar FX a FXa.

El factor tisular soluble recombinante (rsTF) usado en este ensayo utiliza la especificidad al FVIIa para construir una prueba de coagulación con FVIIa. El rsTF, en presencia de FVIIa, calcio y fosfolípidos conduce a la coagulación del plasma, sin activar FVII a FVIIa.

El tiempo de coagulación observado en este sistema tiene una relación inversa con el contenido de FVIIa en la muestra analizada, sin interferencia de la presencia de FVII en la muestra.

El ensayo se realizó por Omri Laboratories (Nes-Ziona, Israel). La actividad de FVIIa se evaluó para ambos NovoSeven® después de la reconstitución y FVIIa-CTP<sub>3</sub> antes de cada estudio. La actividad de NovoSeven® no se correlacionó con la actividad anticipada como se informó en el frasco, pero la discrepancia puede deberse a un enfoque diferente en la evaluación de la actividad. La tabla 39 resume la actividad de coagulación del FVIIa por volumen sin considerar la concentración de proteínas.

Tabla 39: Actividad de coagulación del FVIIa de los productos por lote

	Estudio PK			Estudio de supervivencia		
	FVIIa-3*CTP 31)	(FVIIa ®)	NovoSeven ®)	FVIIa-3*CTP 38)	(FVIIa ®)	NovoSeven ®)

	Estudio PK			Estudio de supervivencia		
	FVIIa-3*CTP 31)	(FVIIa	NovoSeven ®	FVIIa-3*CTP 38)	(FVIIa	NovoSeven ®
<b>Actividad (U/ml)</b>	1,3E+06		2,5E+05	1,3E+06		7,4E+05

Actividad específica de FVIIa-CTP<sub>3</sub>

5 La actividad específica del FVIIa (que se calcula como la actividad/ml dividida por la concentración de proteínas) se calculó basada en A280 y se presenta en la tabla 40. Cuando se compara la actividad específica de las dos moléculas, que difieren en PM, debe realizarse la compensación para normalizar la actividad (es decir debido a la diferencia de peso molecular, la cantidad de sitios activos en 1 mg de NovoSeven® es 1,185 veces mayor que en FVIIa-CTP<sub>3</sub>). El cálculo del factor de conversión se presenta en la siguiente ecuación:

$$AE_{normalizada} = \frac{AE(FVIIa-CTP_3)}{PM.(FVII_{nativo})} \times PM(FVII_{CTP_3}) =$$

$$= \frac{AE(FVIIa-CTP_3)}{45079.1Da} \times 53419.5Da = AE(FVIIa-CTP_3) * 1.185$$

10

Tabla 40: Actividad específica de FVIIa-CTP<sub>3</sub> en comparación con NovoSeven®

Muestra	A280 promedio	STDV (n=9)	% CV	Coeficiente de Extinción	conc. de prot. (mg/ml)	U/ml	Actividad específica		Disminución en veces de NovoSeven®
							U/mg proteína	U/mg FVIIa	
<b>NovoSeven®</b>	1,274	0,031	2,398	1,406	0,906	8,36E+05	9,23E+05	9,23E+05	1,0
<b>FVIIa-CTP<sub>3</sub></b>	4,396	0,092	2,094	1,186	3,706	7,23E+05	1,95E+05	2,31E+05	4,0

Estudio PK-PD de FVIIa-CTP<sub>3</sub>:

15

Descripción del estudio

20 FVIIa-CTP<sub>3</sub> y rhFVIIa (NovoSeven®, NS) se administraron en una única inyección intravenosa a los ratones C57B deficientes de FVIII a una dosis de 6,4E6 U/kg de peso corporal (160,000 U/animal). Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 4 ratones alternativamente a las 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, y 72 horas después de la dosificación (tabla 41). El plasma citratado (0,32 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. Se evaluó la actividad de coagulación del nivel de FVIIa, y se realizó un análisis PK detallado. El estudio se realizó por Omri Laboratories (Nes-Ziona, Israel).

25

Tabla 41: Descripción del estudio

Grupos tratados	Elemento de prueba	Núm. de animales/grupo /punto de tiempo	Vía de dosificación	Cantidad de unidades/animal	Vol. inyectado (µl)	Puntos de tiempo (horas después de la dosis)
A	rhFVIIa	4	IV	1,6e5	200	0 (Antes de la dosis) 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72
B	FVIIa - CTP <sub>3</sub>	4	IV	1,6e5	200	0 (Antes de la dosis) 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72

Perfil PK de FVIIa-CTP<sub>3</sub> en ratones deficientes de FVIII

30 Se cuantificó la actividad de FVIIa en muestras de sangre mediante el uso de un estuche para VIIa-rTF Staclot® (Stago, Parsippany, NJ). El perfil farmacocinético se calculó para cada proteína y representa la media de 4 animales

en cada punto de tiempo. La figura 28 presenta el perfil PK de FVIIa a lo largo del experimento. La recuperación de FVIIa se presenta en la tabla 42. En la tabla 43 se presenta un resumen de los parámetros PK.

5 La tabla 41 resume los valores de la actividad de coagulación después de la administración de NovoSeven® o FVIIa-CTP<sub>3</sub>. FVIIa-CTP<sub>3</sub> y NovoSeven® alcanzaron la actividad máxima media hora después de la dosificación. El valor más alto de la actividad de NovoSeven® alcanzó solo el 43 % del valor máximo de actividad de FVIIa-CTP<sub>3</sub>. La actividad de coagulación de FVIIa-CTP<sub>3</sub> se mantuvo durante un periodo de tiempo más prolongado, lo que demuestra una actividad prolongada. La actividad de coagulación para los ratones tratados con NovoSeven® no se detectó en los puntos de tiempo más tardíos que 12 horas, mientras que los ratones tratados con FVIIa-CTP<sub>3</sub> mantuvieron una actividad medible a las 48 horas después de la dosificación (tabla 41 y Figura 28).

15 La adición de tres copias de CTP en tándem al FVIIa elevó la recuperación en 100 % (tabla 42), según se midió por la actividad más alta después de la dosificación y en comparación con la actividad anticipada basada en el análisis *in vitro*, y aumentó el tiempo de vida media y el tiempo medio de residencia (MRT) 5 veces. El tiempo de exposición (AUC) se incrementó 3 veces (tabla 43).

Tabla 41: Actividad de coagulación de FVIIa después de una única inyección IV

Tiempo después de la administración (horas)	Prom. actividad de coagulación de FVIIa (U/ml)	
	FVIIa-CTP <sub>3</sub>	NovoSeven®
0.16	6.8E+07	3.2E+07
0.5	9.7E+07	4.3E+07
2	2.1E+07	3.9E+06
4	7.7E+06	7.3E+05
8	2.7E+06	4.2E+04
12	3.7E+05	6.2E+03
24	2.4E+04	BLQ
34	4.6E+03	BLQ
48	1.5E+03	BLQ

20

Tabla 42: Recuperación de FVIIa-CTP<sub>3</sub>

Tratados. Grupos	Elemento de prueba	Cantidad de unidades/animal	Dosis administrada práctica (U/ml)	* C <sub>máx</sub> anticipada (U/ml sangre)	C <sub>máx</sub> (U/ml)	% Recobrado
A	rFVIIa	1,60E+05	1,20E+06	1,40E+05	4,25E+04	30
B	FVIIa CTP <sub>3</sub>	1,60E+05	1,29E+06	1,50E+05	9,74E+04	64,6

\* C<sub>máx</sub> anticipada se deriva de la dosis administrada dividida por el volumen de sangre

Tabla 43: Parámetro PK de FVIIa-CTP<sub>3</sub> vs. NovoSeven®

Parámetros PK	NovoSeven®	FVIIa-CTP <sub>3</sub>
Tiempo de vida media-α (0.5-12hr)	0.94	1.57
Tiempo de vida media-β (12-48hr)	NA	4.62
AUC (mU*hr/ml)	5.80E+07	1.80E+08
Vd/Kg (ml/Kg)	1408	2375
CL/Kg (ml/hr/Kg)	1034	356
MRT (hr)	1.3	6.7

25

Ensayo de generación de trombina (TGA)

30 La generación de trombina es una parte fundamental de la cascada de coagulación y como tal un estimado de cuán bien un individuo particular puede generar trombina puede correlacionarse con un riesgo de hemorragia o trombosis. Las variables medidas comúnmente cuando se analiza la generación de trombina incluyen: el tiempo de retraso, el tiempo hasta la generación máxima de trombina, el máximo, el potencial de trombina endógena [ETP] (es decir, el área bajo la curva y la cola), el curso de tiempo del trombograma ("TG"). Después de un tiempo de retraso, se

observa un aumento de trombina. Sin embargo, la coagulación se produce al final del tiempo de retraso, cuando más del 95 % de toda la trombina todavía no se ha formado. El ensayo de generación de trombina se realizó en Omri Laboratories, mediante el uso de reactivos Thrombinoscope suplementado con plasma hemofílico humano. El TGA refleja la capacidad de coagulación en el plasma de ratones, derivada de la inyección de NovoSeven® y FVIIa-CTP<sub>3</sub>. La figura 29 presenta los valores de los parámetros de TGA para el plasma de ratones después de la administración de FVIIa-CTP<sub>3</sub> o NovoSeven®. Después de la administración de FVIIa-CTP<sub>3</sub>, los tres parámetros (velocidad de generación de trombina, cantidad máxima de trombina generada y KIIa) demuestran una ventaja del tratamiento con FVII-CTP<sub>3</sub> sobre NovoSeven®. Esto reafirma adicionalmente la noción de la superioridad de la acción prolongada potencial del FVII-CTP<sub>3</sub> en comparación con NovoSeven®.

Estudio de corte de la vena de la cola (TVT) y FVIIa-CTP<sub>3</sub>:

Descripción del estudio

Los datos obtenidos de la prueba PK/PD para FVIIa-CTP<sub>3</sub> proporcionó información sobre la funcionalidad del FVIIa-CTP<sub>3</sub>, y demostró que FVIIa-CTP<sub>3</sub> tiene una ventaja farmacocinética cuando se compara con NovoSeven®. Sin embargo, la capacidad de la proteína para inducir un coágulo *in vivo*, después de un evento traumático todavía no se ha demostrado. Para evaluar la capacidad de FVIIa-CTP<sub>3</sub> para detener la hemorragia, el mismo modelo de ratones deficientes de FVIII se empleó para un reto de sangrado.

Los ratones deficientes de FVIII se administraron con una única inyección intravenosa de FVIIa-CTP<sub>3</sub> o NovoSeven®. Los ratones se dosificaron con el fármaco en cantidades que proporcionan una actividad de FVIIa equivalente (1,6E05 unidades, 200 µl), calculada de acuerdo con la potencia de cada fármaco evaluado en el ensayo de actividad de coagulación para FVIIa (tabla 44). Las dosis administradas fueron 9 mg/kg de NovoSeven®, y 40 mg/kg de FVII-CTP<sub>3</sub> debido a la actividad reducida de FVIIa-CTP<sub>3</sub>. Un grupo control se inyectó con 200 µl de vehículo.

La vena de la cola se cortó 2,7 cm desde la punta de la cola a los 15 min (inyección 1), 24 horas (inyección 2) o 48 horas (inyección 3) después de la administración, y la supervivencia de los ratones se registró durante 24 horas.

Tabla 44: Evaluación de las muestras inyectadas

Inyección número	NovoSeven®			FVIIa-CTP <sub>3</sub>			
	conc. de proteínas (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	conc. de proteínas (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Actividad específica (normalizada)
1	0,91	8,0E+05	8,8E+05	3,63	6,6E+05	1,8E+05	2,2E+05
2	0,92	8,3E+05	9,0E+05	3,81	7,8E+05	2,0E+05	2,4E+05
3	0,89	8,8E+05	9,9E+05	3,68	7,3E+05	2,0E+05	2,3E+05

La concentración de proteínas se determinó por A280.

Resultados

Los datos de los grupos control inyectados con vehículo para las tres inyecciones (5 animales x 3 inyecciones), se resumieron y se presentan en la figura 30. Se observó 30 % de supervivencia a las 24 horas después del corte de la vena de la cola.

Los ratones tratados con NovoSeven® y FVIIa-CTP<sub>3</sub> demostraron adecuada actividad hemostática después del corte de la vena de la cola realizado 15 min después de la administración de FVIIa. Se observó un 100 % de la tasa de supervivencia en los animales tratados con FVIIa-CTP<sub>3</sub> y NovoSeven® (figura 30).

La reducción de la velocidad de aclaramiento de FVII-CTP<sub>3</sub> que se demostró en el estudio PK/PD se aprecia más claramente después de un corte de la vena de la cola realizado 24 horas después de la administración. Se observa una disminución en la tasa de supervivencia de NovoSeven®. Similar al grupo control, se observa 50 % de muerte dentro de las 10 horas. Mientras tanto, el 90 % de los ratones tratados con FVIIa-CTP<sub>3</sub> sobrevivieron (figura 30). Este resultado enfatiza la eficacia a largo plazo del tratamiento con FVIIa-CTP<sub>3</sub>.

48 horas después de la administración, se demostró una disminución en la tasa de supervivencia en los grupos tratados con FVIIa-CTP<sub>3</sub> o NovoSeven® (figura 30C). Se observó una ligera mejora en los ratones con FVIIa-CTP<sub>3</sub>, pero la diferencia no alcanzó significación estadística.

Discusión:

La fusión de CTP a proteínas recombinantes aumenta el tiempo de vida media en circulación de las proteínas a la vez que mantiene una actividad comparable. A la vez que el mecanismo detrás de la reducción del aclaramiento de la proteína por encima de un valor umbral de 70 KDa se entiende bien con respecto al aclaramiento renal, se logra una protección adicional después de la fusión de CTP. Se considera que la fusión de CTP barre alrededor del escudo proteico y lo protege de la escisión proteolítica, para aumentar su peso molecular radial debido a la carga altamente negativa y para reducir su afinidad con los receptores hepáticos de eliminación.

El presente estudio tuvo como objetivo proporcionar información específica sobre el impacto de la fusión de CTP al FVII sobre el tiempo de vida media y el aclaramiento de la proteína y además aborda el paradigma de su actividad específica después de esta modificación. Los ratones deficientes de FVIII se administraron con una única inyección IV de FVIIa-CTP<sub>3</sub> o FVIIa recombinante comercial (NovoSeven®) en dosis similar (basada en la unidad) y se realizó un análisis basado en la actividad PK. FVIIa-CTP<sub>3</sub> demostró una longevidad superior como se refleja por el aumento de 5 y 3,5 veces en su tiempo de vida media y AUC, respectivamente. La actividad específica (U/mg) de FVIIa-CTP según se calculó por el estuche para la actividad Staclot® dividido por la concentración de proteínas medida por A280 se demostró que fue 4-5 veces menor que la actividad específica de NovoSeven®.

Para contribuir a la comprensión de cómo el CTP afecta los efectos hemostáticos de FVIIa *in vivo*, se investigó la capacidad de FVIIa-CTP<sub>3</sub> para reducir una hemorragia. En el modelo de hemorragia por corte de la vena de la cola en el modelo de ratones hemofílicos, la administración de rFVIIa puede mejorar la tasa de supervivencia de los animales retados y evitar su sangrado hasta la muerte. En el estudio descrito en la presente, los animales se administraron con FVIIa-CTP<sub>3</sub> o NovoSeven®. Ambas moléculas fueron capaces de mantener la homeostasis cuando el corte se realizó 0,25 horas después de la dosificación. Se demostró una duración significativamente prolongada de la actividad para el grupo tratado con FVIIa-CTP<sub>3</sub> cuando el corte de la cola se realizó 24 horas después de la dosificación. La tasa de supervivencia del grupo tratado con vehículo fue mayor que la anticipada y mayor que la obtenida en estudios anteriores (50 % frente a 20 % en estudios anteriores, datos no mostrados). El por ciento de supervivencia de los animales tratados también se evalúa en puntos de tiempo más tempranos, que incluyen a las 36 horas después de la dosificación.

En conclusión, se demostró que FVIIa-CTP<sub>3</sub> tiene una duración aumentada de la actividad en los ratones hemofílicos lo que se traduce en una duración más prolongada del efecto hemostático en comparación con NovoSeven®. Los datos reunidos sugieren que la fusión de CTP a FVII es una tecnología con el potencial de mejorar significativamente el tratamiento profiláctico en pacientes con hemofilia.

Ejemplo 7: Evaluación comparativa del perfil de FVII-CTP<sub>3</sub> purificado frente a FVII-CTP<sub>5</sub> después de una inyección única IV o SC a ratas SD

Objetivo del estudio

Se llevaron a cabo dos estudios:

El objetivo del primer estudio fue determinar los parámetros farmacocinéticos de rFVII-CTP3 frente a rFVII-CTP5 después de la purificación en columna FVII select y HA en ratas macho Sprague Dawley, después de una única administración intravenosa de 50 µg/animal.

En el segundo estudio, los parámetros farmacocinéticos de rFVII-CTP3-HA frente a rFVII-CTP5-HA se examinaron en ratas macho Sprague Dawley después de una única administración intravenosa o subcutánea de 100 µg/animal.

Resultados

Determinación del nivel del antígeno FVII-CTP 3 y FVII-CTP 5

El nivel del antígeno FVII se determinó mediante el uso del estuche de ELISA para FVII humano (Zymotest HyPhen) (Véase la tabla 45). T

Tabla 45. Resumen de la concentración de proteínas calculada, que es el promedio de tres ejecuciones independientes.

	FVII 3 CTP		FVII 5 CTP	
	<u>FVIIS 46</u> <u>el.Conc. Dial</u>	<u>FVII HA 46</u> <u>el.Conc. Dial</u>	<u>FVIIS el.Conc. Dial</u>	<u>FVII HA 5 100 %</u> <u>BConc. Dial</u>
PROM (ng/ml)	3,78E+06	1,59E+06	1,88E+06	7,92E+05

	FVII 3 CTP		FVII 5 CTP	
	<u>FVIIS 46</u> <u>el.Conc. Dial</u>	<u>FVII HA 46</u> <u>el.Conc. Dial</u>	<u>FVIIS el.Conc. Dial</u>	<u>FVII HA 5 100 %</u> <u>BConc. Dial</u>
SD	1,30E+06	6,03E+05	7,15E+05	3,57E+05
CV (%)	3,43E+01	3,80E+01	3,80E+01	4,51E+01

Análisis por transferencia Western de las muestras examinadas

5 Las muestras de FVII-CTP<sub>3,5</sub> se cargaron en 4-12 % de bisTrisgel (*NuPage, Invitrogene*) mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante inmunotransferencia Western con el uso del Ac policlonal anti-FVII (R&D systems), Ac policlonal anti-CTP (Adar biotech production) o Ac anti Gla (American diagnostica). En resumen, el FVII fusionado a tres y cinco CTP migró a 80 y 100 KDa, respectivamente (véase la figura 31).

10 Evaluación comparativa de la potencia de FVII *in vitro*

El ensayo de actividad de FVII, que se realizó en Sheba Medical Center, el Centro Nacional de Coagulación, es un ensayo basado en PT con el uso de plasma inmunoabsorbido deficiente en factor VII (Siemens). El reactivo de PT es innovin y el ensayo se realiza en el instrumento Sysmex CA 1500. El intervalo normal del FVII está dentro de 55-145 %. Las actividades de las muestras se resumen en la tabla 46.

Tabla 46: Actividad de las muestras

Muestra	Concentración (mg/ml) de acuerdo con (NANODROP)	Concentración en la muestra analizada (µg/ml)	Resultados (%)	Promedio-% de plasma
FVII-5CTP FVIIS el. Conc. Dial	2,19	2	87	16 %
		1	30	
		0,5	10	
FVII-5CTP HA 5 100 %B conc. Dial	1	2	97	21 %
		1	36	
		0,5	13	
FVIIS 46 el. Conc. Dial	3,17	2	100	18 %
		1	35	
		0,5	12	
FVII HA 46 el. Conc. Dial (1)	1,5	2	92	20 %
		1	33	
		0,5	10	

20 El nivel normal de FVII circulante en el cuerpo es alrededor de 0,5 µg/ml. Ambos, FVII-CTP<sub>3</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> muestran reducciones de aproximadamente 5 veces en su actividad de coagulación frente al plasma mezclado normal humano.

Estudio farmacocinético

25 Se realizaron dos estudios farmacocinéticos para determinar el perfil y los parámetros farmacocinéticos (PK) de FVII-CTP<sub>3</sub> y FVII-CTP<sub>5</sub> (después de la columna select para FVII y HA para FVII). En el primer estudio, FVII-CTP<sub>3</sub>, y FVII-CTP<sub>5</sub> después de la purificación de FVII por select/ HA se administraron en una única inyección intravenosa a las ratas Sprague Dawley (seis ratas por sustancia) en una dosis de 50 µg/rata.

30 Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 3 ratas alternativamente a las 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 hasta su análisis.

35 En el segundo estudio, solo se analizaron las muestras después de la columna HA. Estas muestras se administraron en una única inyección intravenosa o subcutánea a las ratas Sprague Dawley (seis ratas por sustancia) mediante el

uso de una dosis de 100 µg/rata. Las muestras de sangre se recolectaron en los mismos puntos de tiempo y condiciones como en el primer estudio anterior.

Tabla 47. Diseño del primer estudio (FVII select frente a FVII HA).

Grupos tratados	Elemento de prueba	Núm. de animales/grupo/	Vía de dosificación	Nivel de dosis (µg por animal)	Vol. inyectado (µl)	Conc. (µg/ml)	Puntos de tiempo (horas después de la dosis)
A	FVII-CTP*3 lote 46 HA	6	IV	50	200	250	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
B	FVII-CTP*3 lote 46 FVIIS	6	IV	50	200	250	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
C	FVII-CTP*5lote 5 HA	6	IV	50	200	250	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
D	FVII-CTP*5 lote 5 FVIIS	6	IV	50	200	250	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120

5

Tabla 18. Diseño del segundo estudio (IV frente a SC)

Grupos tratados	Elemento de prueba	Núm. de animales/grupo/	Vía de dosificación	Nivel de dosis (µg por animal)	Vol. inyectado (µl)	Conc. (µg/ml)	Puntos de tiempo (horas de dosis)
A	FVII-CTP*3 lote 46 HA	6	IV	100	200	500	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24,48,72, 96,120
B	FVII-CTP*3 lote 46 HA	6	SC	100	200	500	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24,48,72, 96,120
C	FVII-CTP*5lote 5 HA	6	IV	100	200	500	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24,48,72, 96,120
D	FVII-CTP*5 lote 5 HA	6	SC	100	200	500	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24,48,72, 96,120

Las diferencias principales entre estos dos estudios son las dosificaciones y la vía de administración. En el primer estudio, las ratas se inyectaron IV con 50 µg/rata, mientras en el segundo estudio, las ratas se inyectaron IV o SC con 100 µg/rata (total 500) µg/kg; peso de las ratas 200 g). El aumento en la dosificación se debe al cambio en el tipo de administración; la administración SC requiere mayores cantidades para lograr efectos similares a la administración IV.

10 Análisis del estudio de PK

15 La concentración de FVII en las muestras de plasma se cuantificó mediante el uso de estuches de Elisa para FVII humano (zymutest FVII-Biophen). Los perfiles farmacocinéticos se calcularon y reflejan la media para 3 animales en cada punto de tiempo. Los valores del tiempo de vida media terminal se calcularon mediante el uso del programa informático PK solutions 2.0. La tabla más adelante resume las concentraciones calculadas de FVII en los diferentes

puntos de tiempo de muestreo. El perfil PK y un resumen de los parámetros PK se presentan en una tabla más adelante.

Tabla 49. Primer estudio farmacocinético (FVII select frente a FVII HA) -concentraciones de FVII (ng/ml).

Tiempo (hora)	FVII CTP*3 Lote 46 HA	FVII CTP*3 Lote 46 FVII S	FVII CTP*5 Lote 5 HA	FVII CTP*5 Lote 5 FVII S
0,083	1816,3	1633,9	2064,3	1853,5
0,5	1523,7	1409,9	1351,4	1418,0
2	1284,9	1041,7	1389,7	834,4
5	607,9	531,6	722,7	737,2
8	524,2	430,0	712,2	614,6
24	115,5	132,9	272,5	201,8
48	21,1	31,6	62,3	90,4
72	9,5	15,8	29,1	31,8
96	BLQ	5,8	7,0	16,9
120	BLQ	BLQ	8,5	13,4

Tabla 50. Segundo estudio farmacocinético (IV frente a SC) -concentraciones de FVII (ng/ml).

Tiempo (hora)	FVII CTP*3 Lote 46 HA-IV	FVII CTP*5 Lote 5 HA-IV	FVII CTP*3 Lote 46 HA-SC	FVII CTP*5 Lote 5 HA-SC
0,083	6452,6	6153,3	5,0	BLQ
0,5	3930,7	3660,6	14,5	14,6
2	1992,3	2176,2	113,6	96,2
5	1598,9	2087,3	106,6	70,5
8	781,6	1075,6	188,9	129,7
24	268,5	627,2	155,0	239,2
48	51,9	143,3	43,0	88,6
72	8,8	39,0	7,0	36,7
96	BLQ	10,8	BLQ	10,4
120	BLQ	8,2	BLQ	8,7

Tabla 51. Análisis PK- primer estudio farmacocinético (FVII S frente a HA).

	FVII CTP*3 Lote 46 HA	FVII CTP*3 Lote 46 FVII S	FVII CTP*5 Lote 5 HA	FVII CTP*5 Lote 5 FVII S
Tiempo de vida media (0,083-8 horas) (horas)	4,3	4,0	5,51	5,59
Tiempo de vida media (8-72\96\120 horas) (horas)	11,1	12,1	16,46	20,29
Tiempo de vida media (8-72) (horas)	11,1	13,4	13,62	15,64
AUC(O-t)(área obs)(8-72/96/120 horas)	14566,9	13686,4	21812,7	19307,9
AUC (∞) área(8-72/96/120 horas)	14718,2	13788,1	22013,9	19701
Vd(área)/kg (ml/kg)(8-2/96/120 horas)	271,1	316,1	269,7	371,5
CL(área)/kg(ml/horas/kg) (8-72/96/120 horas)	17,0	18,1	11,356	12,69

La adición de cinco CTP prolongó el tiempo de vida media de FVII en comparación con 3 CTP. Ambas formas de 5 CTP (es decir FVIIS y FVII HA) se detectaron en los mayores puntos de tiempo (96 y 120 horas), mientras que FVII-3 CTP HA y FVIIS -3 CTP se detectaron hasta las 72 horas y 96 horas, respectivamente. Basados en este hecho, el tiempo de vida media de FVII-5 CTP es más prolongado que las variantes de 3CTP (véase la figura 32). La comparación del tiempo de vida media de todos los materiales examinados (3 y 5 CTP) en los mismos puntos de tiempo (8-72 horas) mostró que los tiempos de vida media son similares, aunque los de 5 CTP son considerablemente más prolongados (figura 32).

Tabla 52: Análisis PK - segundo estudio farmacocinético (IV frente a SC).

	<b>FVII CTP*3 Lote 46 HA-IV</b>	<b>FVII CTP*5 Lote 5 HA-IV</b>	<b>FVII CTP*3 Lote 46 HA-SC</b>	<b>FVII CTP*5 Lote H 5 HA-SC</b>	<b>Biodisponibilidad CTP*3</b>	<b>Biodisponibilidad CTP*5</b>
Tiempo de vida media (0,083-8 horas) (horas)	3,0	3,9	-1,8	-3,18		
Tiempo de vida media (8-72\96\120 horas) (horas)	9,9	14,6	13,14	22,94		
Tiempo de vida media (8-72) (horas)	9,9	13,0	13,14	29,47		
AUC(O-t)(área obs)(8-72\96\120 horas)	28866,8	43761,0	6600	9822,7	22,9	22,4
AUC (∞) área(8-72\96\120 horas)	28993,0	43934,4	6733	10110,8	23,22	23,01
Vd(área)/kg (ml/kg) (8-72\96\120 horas)	246,4	240,5	1407,6	1636,8		
CL(área)/kg (ml/horas/kg) (8-72\96\120 horas)	17,2	11,4	74,261	49,452		

De nuevo, como se observó en el primer estudio, la adición de 5 CTP prolongó el tiempo de vida media de FVII en comparación con la adición de 3 CTP, en el tiempo de vida media inicial y terminal y en ambas formas de administración (IV y SC, véase la figura 33). Como se esperaba, después de la administración SC, FVII se detectó primero en la sangre a un punto de tiempo más tardío en comparación a cuando se administró IV.

En lo anterior, se resumieron dos estudios PK. El propósito principal del primer estudio fue verificar la diferencia entre FVII-3CTP y FVII-5 CTP después de 2 columnas diferentes: FVII select y FVII HA. En nuestros estudios anteriores, se verificaron las proteínas de cosecha frente a las purificadas y se encontró que la diferencia entre las versiones 3 y 5 CTP del FVII fue mayor cuando se inyectó la cosecha a las ratas.

No hubo diferencia significativa entre los resultados de FVII 3\5 CTP después de ambas columnas, por tanto se decidió inyectar FVII HA 3\5 CTP en el segundo estudio.

Ejemplo 8: Estudio de supervivencia con FVIIa-CTP<sub>3</sub> (MOD-5014) en ratones decientes de FVIII después de una inyección subcutánea

Objetivo del estudio

Evaluar la eficacia de NovoSeven®, MOD-5014 (FVIIa-CTP<sub>3</sub>) y MOD-5019 (FVIIa-CTP<sub>5</sub>) en un estudio con corte de la vena de la cola, después de una administración subcutánea.

5 Propiedades analíticas de FVIIa-CTP<sub>3</sub>(MOD-5014) y FVIIa-CTP<sub>5</sub>(MOD 5019):

Determinación de proteínas por A280

10 El coeficiente de extinción teórico de NovoSeven® se calculó mediante el uso del algoritmo ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>). El cálculo se basa en la secuencia de aminoácidos. El coeficiente de extinción calculado para NovoSeven® es 1,406, y para MOD-5019 es 1,075 (los valores representan la absorbancia de 1 g/l a 280 nm). El coeficiente de extinción de MOD-5014 se determinó mediante un análisis de aminoácidos en Mscan. El coeficiente de extinción para MOD-5014 es 1,27.

15 Ensayo de coagulación de FVIIa - STACLOT VIIa-rTF

FVIIa se deriva de una escisión intracatenaria del FVII monocatenario. El factor tisular nativo (TF) es un cofactor de FVIIa, tras la unión al TF, el FVII media la activación del Factor X a Xa, mientras que él mismo se transforma a FVIIa. El factor tisular soluble es la parte extracelular del factor tisular nativo. Éste ya no puede activar el FVII por autoactivación, pero el FVIIa unido al factor tisular puede activar FX a FXa.

20 El factor tisular recombinante soluble (rsTF) usado en este ensayo utiliza la especificidad al FVIIa para construir una prueba de coagulación del FVIIa. El factor tisular recombinante soluble (rsTF), en presencia de FVIIa, calcio y fosfolípidos, produce coagulación del plasma sin activar FVII a FVIIa.

25 El tiempo de coagulación observado en este sistema tiene una relación inversa con el contenido de FVIIa en la muestra analizada, sin interferencia de la presencia de FVII en la muestra.

30 La actividad de FVIIa se evaluó para NovoSeven® reconstituido, y para MOD-5014 y MOD-5019 antes de cada estudio.

35 La actividad específica de FVIIa (que se calcula como la actividad/ ml dividida por la concentración de proteínas) se calculó basado en A280 y se presenta en la tabla 53. Cuando se compara la actividad específica de las dos moléculas, que difieren en el peso molecular, debe realizarse la compensación para normalizar la actividad (es decir debido a la diferencia de peso molecular, la cantidad de sitios activos en 1 mg de NovoSeven® es 1,185 veces mayor que en MOD-5014 y 1,307 veces mayor que en MOD-5019). Por tanto, el cálculo del factor de conversión se presenta en la siguiente fórmula:

$$AE_{normalizada} = \frac{AE(FVIIa-CTP_3)}{PM.(FVII_{nativo})} \times PM(FVII_{CTP_3}) =$$

$$= \frac{AE(FVIIa-CTP_3)}{45079.10a} \times 53419.50a = AE(FVIIa-CTP_3) * 1.185$$

40

Tabla 53- Actividad específica de MOD-5014 en comparación con NovoSeven®

Muestra	Conc. de proteínas Por A280 (mg/ml)	Actividad específica (U/mg FVIIa)	Disminución en veces de ®NovoSeven
®NovoSeven	0,93	52 487	1,0
MOD-5014 lote 73	1,4	25 490	2,05
MOD-5019 lote 9	3,0	11 698	4,48

Descripción del estudio

45 La medición más significativa es la capacidad de la proteína para inducir un coágulo *in vivo*, después de un evento traumático. Para evaluar la capacidad de MOD-5014 para detener una hemorragia, se empleó el mismo modelo de ratones deficientes de FVIII para un reto de sangrado.

50 Los ratones deficientes de FVIII se administraron con una única inyección subcutánea de MOD-5014, MOD-5019 o NovoSeven®. Los grupos A y B se dosificaron con NovoSeven® y MOD-5014 respectivamente, en cantidades equivalentes a la actividad de FVIIa. El grupo C se dosificó con MOD-5019 en una cantidad equivalente a la proteína FVIIa como MOD-5014, para evaluar el factor crítico (actividad o cantidad de proteína). Las dosis administradas

fueron 4,2 mg/kg de NovoSeven®, y 8,6 mg/kg de MOD-5014 y MOD-5019. La vena de la cola se cortó 2,7cm desde la punta de la cola, 12 horas después de la administración, y la supervivencia de los ratones se registró durante 24 horas.

5

Tabla 54 – Designación de los grupos

T							
Grupo	Fecha de la inyección	Elemento de prueba	Dosis administrada		Volumen inyectado (µl)	Núm. de ratones por grupo	Tiempo de sangrado, horas después de la dosificación
			mg de FVII /Kg	mU/Kg			
A	13.1.13	®NovoSeven	4,23	221 876	100	10	12
B	15.1.13	MOD-5014, lote 73	8,59	218 750	160	10	12
C	27.1.13	MOD-5019, lote 9	8,59	100 496	160	10	12

Resultados

Los datos del experimento se resumen en la tabla 55 y en la figura 34.

10

Tabla 55. Resultados del estudio de TVT

Tiempo	Núm. de ratones sobrevivientes			% de supervivencia			
	Después de TVT (h)	NovoSeven®	MOD-5014	MOD-5019	NovoSeven®	MOD-5014	MOD-5019
0		9	10	10	100	100	100
1		9	10	10	100	100	100
2		9	10	10	100	100	100
3		8	10	8	89	100	80
4		6	9	8	67	90	80
5		5	9	7	56	90	70
6		4	8	5	44	80	50
7		3	8	5	33	80	50
8		2	7	5	22	70	50
9		1	6	5	11	60	50
10		1	5	5	11	50	50
11		1	3	5	11	30	50
12		1	3	5	11	30	50
24		1	3	4	11	30	40

15

24 horas después de TVT, solo 11 % de los ratones inyectados con NovoSeven® habían sobrevivido. El 30 % de MOD-5014 y el 40 % de MOD-5019 habían sobrevivido hasta este punto de tiempo. MOD-5014 y MOD-5019 inyectados por vía subcutánea muestran mejor supervivencia de los ratones en comparación con NovoSeven®. Sin embargo, los resultados no son óptimos ya que más del 50 % de los animales murieron durante el experimento.

20

El factor VIIa, como otros factores de coagulación, se inyecta normalmente por vía intravenosa, para que esté disponible directamente en el torrente sanguíneo. Sin embargo, la presente invención muestra que las composiciones proporcionadas en la presente sorprendentemente se absorben más eficazmente en el torrente sanguíneo después de la administración SC. La posibilidad de administrar el FVIIa por vía subcutánea constituye una ventaja ya que puede usarse para aplicaciones profilácticas. Además es mucho más fácil que los pacientes se

inyecten ellos mismos las inyecciones subcutáneas, y son una ventaja cuando los pacientes son muy jóvenes y sus venas son pequeñas y difíciles de encontrar.

Por tanto, la aplicación subcutánea puede usarse para un tratamiento profiláctico,

Ejemplo 9: Estudio de PK-PD comparativo de MOD-5014 recombinante vs. NOVOSEVEN® después de una administración subcutánea en ratas SD

Objetivos del estudio

Determinar los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de MOD-5014 frente a rFVIIa comercial en ratas SD después de una única administración SC.

Comparar dos experimentos independientes (05010 y 05034) que contienen los productos MOD-5014 originados a partir de dos clones diferentes (clon núm. 28 frente al 61) según sus parámetros farmacocinéticos.

Métodos experimentales

Animales

24 ratas SD machos arribaron de Harlan Laboratories Israel, Ltd, al menos 4 días antes de iniciar las inyecciones. Los animales eran adultos jóvenes saludables, de -200 gr al inicio del estudio. La variación del peso corporal de los animales en el momento de iniciar el tratamiento no debía exceder  $\pm 20\%$  de la media del peso de cada sexo. El estado de salud de los animales usados en este estudio se examinó a su llegada. Solo los animales con buen estado de salud se adaptan a las condiciones del laboratorio y se usan en el estudio.

Ensayo de coagulación de FVIIa - STACLOT VIIa-Rtf

El factor tisular recombinante soluble (rsTF) usado en este ensayo utiliza la especificidad al FVIIa para construir una prueba de coagulación de FVIIa. rsTF, en la presencia de FVIIa, calcio y fosfolípidos produce coagulación del plasma, sin activar FVII a FVIIa.

El tiempo de coagulación observado en este sistema tiene una relación inversa con el contenido de FVIIa en la muestra analizada, sin interferencia de la presencia de FVII en la muestra.

Se evaluó la actividad de FVIIa para NovoSeven® después de la reconstitución y para MOD-5014 antes de cada estudio. La actividad específica de FVIIa se calculó basada en A280. Cuando se compara la actividad específica de las dos moléculas, que difieren en PM, debe realizarse la compensación para normalizar la actividad (es decir debido a la diferencia de peso molecular, la cantidad de sitios activos en 1 mg de NovoSeven® es 1,185 veces mayor que en MOD-5014).

Programa informático PK solver

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon mediante el uso del programa informático PK solver. La curva de administración IV se analizó como bolo CA de dos compartimentos, y la administración SC como análisis trapezoidal lineal Log - NCA Extravasular. Se calcularon las especificaciones del tiempo de vida media, el AUC, el aclaramiento y la distribución de volumen y los parámetros de salida se estudiaron en comparación entre los grupos de los experimentos.

Materiales experimentales

Experimento núm. 05010:

A. NovoSeven® RT: (Lote # AU61553 preparado el 31.7.12\*) Concentración de FVIIa por A280: 0,86 mg/ml. Ensayo de actividad de FVIIa Staclot: 56 867 U/mg. Dosis inyectada: 946  $\mu$ g/kg. \*Mezcla de alícuotas de NovoSeven®, todas del mismo lote núm.

B. Clon 28: MOD-5014 RS12-001: 0,77 mg/ml\*\* basado en A280. Ensayo de actividad de FVIIa Staclot: 34 162 U/mg. Dosis inyectada: 850  $\mu$ g FVIIa/kg.

Experimento núm. 05034:

A. NovoSeven® RT: (Lote #AU61347 preparado el 1.1.13) Concentración de FVIIa por A280: 0,82 mg/ml, diluida a 0,4 mg/ml con tampón NS estéril. Ensayo de actividad de FVIIa Staclot: 55 688 U/mg. Dosis inyectada: 360  $\mu$ g/kg y 20 047,7 U/kg.

B. Clon 61: MOD-5014 Lote 75: 1,9 mg/ml\*\* basado en A280, diluida a 0,89 mg/ml con tampón de formulación. Dosis inyectada: 20 047,7 U/kg. Actividad de coagulación del FVIIa: 25 002\* U/mg basado en el ensayo de actividad de FVIIa Staclot.

C. Clon 61: MOD-5014 Lote 81A: 2,36 mg/ml basada en A280 (filtrado en la mañana del día del estudio y se volvió a medir a 280 nm), diluida a 0,4 mg/ml con tampón de formulación. Dosis inyectada: 360 µg FVIIa/kg. Actividad de coagulación del FVIIa: 24943U/mg basada en el ensayo de actividad de FVIIa Staclot.

5 D. Clon 61: MOD-5014 Lote 81A: 2,36 mg/ml basada en A280, diluida a 0,89 mg/ml con tampón de formulación. Dosis inyectada: 20 047,7 U/kg. Actividad de coagulación del FVIIa: 24 943 U/mg basada en el ensayo de actividad de FVIIa Staclot.

Descripción de los estudios

10 Experimento núm. 05010

15 MOD-5014 y NovoSeven® se administraron en una única inyección intravenosa o subcutánea a las ratas SD en una dosis de 0,9 mg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron a partir del seno orbital del ojo de 3 ratas alternativamente a las 0,5, 4, 8, 12, 24, 34, 48 y 58 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,32 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. El estudio se realizó en "Science in Action", Nes-Ziona. Se evaluó el nivel de actividad de coagulación del FVIIa y se realizó un análisis PK detallado en Prolor-Biotech.

Tabla 55: Diseño del estudio 05010

Grupos tratados	Elemento de prueba	Núm. animales/grupo	Núm. animales/grupo/punto de tiempo	Vía de dosificación	Género	Nivel de dosis (µg/kg)	Vol. inyectado (µl)	Puntos de tiempo (horas después de la dosificación)
A	rFVIIa (Novo Seven®)	6	3	IV	M	946	220	0, 0.5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58
B	rFVIIa RS12-001 (clon 28)	6	3	IV	M	850	220	0, 0.5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58
C	rFVIIa (Novo Seven®)	6	3	SC	M	946	220	0, 0.5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58
D	rFVIIa RS12-001 (clon 28)	6	3	SC	M	850	220	0, 0.5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58

20 Experimento núm. 05034

25 MOD-5014 y NovoSeven® se administraron en una única inyección subcutánea a las ratas SD en una dosis de 0,9 mg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron del seno orbital del ojo de 3 ratas alternativamente a las 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48 y 72 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,32 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. El estudio se realizó en "Science in Action", Nes-Ziona.

30 Se evaluó el nivel de actividad de coagulación del FVIIa y se realizó un análisis PK detallado en Prolor-Biotech.

Tabla 56: Diseño del estudio 05034

Tratados. Grupos	Elemento de prueba	Núm. de animales/grupo /punto de tiempo ***	Vía de dosificación	Género	Nivel de dosis por animal (µg/kg)	Nivel de dosis por animal (U/kg)	Vol. inyectado (µl)	Puntos de tiempo (horas después de la dosis)
A	FVIIa (NovoSeven®)	3	SC	M	360	20047.7	207	0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48,72
B	FVIIa 75 (clon 61)	3	SC	M	801,8 4	20047.7	207	0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72
C	FVIIa 81A (clon 61)	3	SC	M	360	8979,4 8	207	0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72
D	FVIIa 81A (clon 61)	3	SC	M	803,7 4	20047.7	207	0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72

Resultados

5 La actividad del FVIIa en las muestras de sangre se cuantificó mediante el uso del estuche STACLOT VIIa-rTF (Stago). El perfil farmacocinético se calculó para cada proteína y es la media de 3 animales en cada punto de tiempo.

Experimento núm. 05010

10 Después de la reducción de fondo: 15 mU/ml.

15 La figura 35 presenta el perfil PK de FVIIa después de la administración IV y SC de NovoSeven® o MOD-5014. En la tabla 57 se presenta un resumen de los valores de actividad del FVIIa para cada punto de tiempo. La administración IV y SC tienen un patrón PK diferente (véase la figura 35; después de la reducción de fondo: 15 mU/ml). La Cmáx después de la inyección IV es mayor que la obtenida después de la inyección SC, debido a la presencia del fármaco en la sangre inmediatamente después de la administración (medida a las 0,5 hora, tabla 57 y tabla 58). Sin embargo, después de la administración SC las moléculas del fármaco se transfieren a la matriz intracelular y los tejidos, por lo tanto la Cmáx puede medirse solo después de 2 horas de la inyección. La recuperación total del fármaco después de la administración SC es menor que el valor de Cmáx después de la inyección IV.

20 8 horas después de la inyección, NovoSeven® manifestó un patrón PK igual cuando se inyectó IV o SC, (después de la reducción de fondo: 15 mU/ml, figura 35). Además, no se detectó actividad de coagulación para los ratones tratados con NovoSeven® en los puntos de tiempo después de las 12 horas, mientras que los ratones tratados con MOD-5014 retuvieron la actividad medible a las 58 horas después de la dosificación (tabla 57; después de la

25 reducción de fondo: 15 mU/ml; figura 35).

Tabla 57. Actividad de coagulación del FVIIa de MOD-5014 frente a NovoSeven® después de la administración IV o SC

Tiempo (h)	NovoSeven® IV (A)		MOD-5014 IV (B)		NovoSeven® SC (C)		MOD-5014 SC (D)	
	mU/ml	% CV	mU/ml	% C V	mU/ml	% C V	mU/ml	% C V
0,5	304651,7	18,7	232818,3	5,0	11491,7	2,4	3691,7	19,0
4	40068,3	7,8	62085,0	9,5	21385,0	22,6	12018. 3	15,8
8	5276,7	2,5	25931,7	6,1	5525,0	32,5	6445,0	2,2
12	255,0	13,8	5633,3	9,3	297,7	41,4	924,7	24,1
24	1,3	7,1	251,3	11,8	1,3	89,2	249,3	60,3

Tiempo (h)	NovoSeven® IV (A)		MOD-5014 IV (B)		NovoSeven® SC (C)		MOD-5014 SC (D)	
	mU/ml	% CV	mU/ml	% C V	mU/ml	% C V	mU/ml	% C V
34	0,0		78,3	4,5	0,0		63,7	85,5
48			29,0	9,9	0,0		35,0	47,2
58			10,3	4,6	0,0		13,7	33,5

Después de la reducción de fondo: 15 mU/ml.

Tabla 58: Parámetros PK de MOD-5014 vs. NovoSeven® después de la administración IV o SC

A. IV		
Parámetros PK	NovoSeven® RT (A)	MOD-5014 (RS 12-001) (B)
Tiempo de vida media- $\alpha$ (0,5-4 horas)	0,24	1,04
Tiempo de vida media- $\beta$ (4-58 horas)	1,31	3,17
AUC 0-inf mU/ml*h	702467,95	820778,67
Vss [U/Kg/(mU/ml)]	0,13	0,13
CL [(U/Kg)/(mU/ml)/h]	0,08	0,04
MRT (horas)	1,74	3,62
B. SC		
Parámetros PK	NovoSeven® RT (B)	MOD-5014 (RS 12-001) (C)
Tiempo de vida media (horas)	1,40	7,78
Cmáx (mU/ml)	21385,00	12018,33
AUC 0-inf (mU/ml*h)	115099,72	84158,87
MRT 0-inf (horas)	4,32	7,04
Vz/F (U/Kg)/(mU/ml)	0,95	3,88
Cl/F (U/Kg)/(mU/ml)/h	0,47	0,35

5

Experimento núm. 05034

La figura 36 presenta el perfil PK de FVIIa después de la administración SC de NovoSeven® o MOD-5017. Dos lotes diferentes del clon núm. 61 (#75 y #81) se examinaron a la misma concentración o las mismas unidades de actividad, en comparación con NovoSeven®. En la tabla 59 se presenta un resumen de los valores de actividad del FVIIa para cada punto de tiempo.

Los resultados indican un patrón PK similar después de la administración SC correspondiente a los experimentos anteriores. Además, no se detectó actividad de coagulación para los ratones tratados con NovoSeven® en los puntos de tiempo después de las 12 horas, mientras que los ratones tratados con MOD-5014 retuvieron una actividad medible a las 24 horas después de la dosificación (tabla 59 y figura 36; y después de la reducción de fondo: 56 mU/ml (8, 12 horas) o 32 mU/ml (0,5, 2, 6, 14 horas)).

El clon núm. 61 lote #81 (D) Cmáx (1,301 mU/ml) fue menor que los valores de Cmáx del clon núm. 61 lote #75 (B) y NovoSeven® (A) (3,521 mU/ml y 5,908 mU/ml respectivamente), aunque todos se inyectaron con la misma actividad unitaria (tabla 6). Sin embargo, el lote #75 (B) y #81 (D) tienen las mismas unidades de actividad (559 mU/ml y 478 mU/ml respectivamente) medidas 8 horas después de la inyección (figura 36 y tabla 59; y después de la reducción de fondo: 56 mU/ml (8, 12 horas) o 32 mU/ml (0,5, 2, 6, 14 horas)).

Tabla 59: Actividad de coagulación del FVIIa de MOD-5014 (Clon 61 #75, #81) frente a NovoSeven® después de una única administración SC.

Tiempo (h)	NovoSeven® (A)	MOD-5014 Clon 61 Lote 75 (B) - igual U/kg	MOD-5014 Clon 61 Lote 81A (C) - igual conc.FVIIa $\mu$ g/kg	MOD-5014 Clon 61 Lote 81A (D) - igual U/kg

	mU/ml	% CV	mU/ml	% CV	mU/ml	% CV	mU/ml	% C V
0,5	3271 ,3	46,5	350,3	26,6	101,3	24,1	208,7	51,2
2	5908 ,0	18,1	3521,3	70,9	1294,7	7,0	1301,3	31,6
6	1411 ,7	23,6	1349,7	45,6	425,3	27,6	663,0	13,4
8	1029 ,0	12,4	559,3	52,7	152,7	19,5	478,0	25,4
12	121. 3	9,9	563,0	17,4	148,7	36,3	712,7	16,2
24	1,0	25,0	117,0	41,9	21,3	36,4	99,0	36,7

Después de la reducción de fondo: 56 mU/ml (8,12 horas) o 32 mU/ml (0,5, 2, 6, 14 horas).

Tabla 60: Parámetros PK de MOD-5014 (Clon 61 #75, #81) frente a NovoSeven® después de una única administración SC.

Pk	Parámetros de NovoSeven® RT (A)	MOD-5014 Clon 61 Lote 75 (B)- igual U/kg	MOD-5014 Clon 61 Lote 81A (C)- igual conc.FVIIa µg/kg	MOD-5014 Clon 61 Lote 81A (D)- igual U/kg
Tiempo de vida media (horas)	1,67	5,70	4,62	6,41
Cmáx (mU/ml)	5908,00	3521,33	1294,67	1301,33
AUC <sup>0-inf</sup> (mU/ml*h)	24688,18	20456,96	6260,23	13098,16
MRT 0-inf (horas)	3,73	7,86	6,40	10,59
Vz/F (U/Kg)/(mU/ml)	1,96	8,06	9,55	14,15
Cl/F (U/Kg)/(mU/ml)/h	0,81	0,98	1,43	1,53

Este informe resume dos estudios PK; 05010 y 05034. Nuestro objetivo fue proporcionar información específica sobre el impacto de la fusión de CTP a FVII en el tiempo de vida media y el aclaramiento de la proteína en una administración subcutánea y abordar el paradigma de su actividad específica después de esta modificación. En estos estudios, las ratas SD se administraron con una única inyección SC de MOD-5014 originado de dos clones, y dos lotes diferentes, en comparación con el FVIIa recombinante comercial (NovoSeven®). Los componentes se inyectaron a una concentración similar de FVIIa (µg/Kg) o al mismo nivel de actividad (U/Kg) y se realizó el análisis basado en la actividad PK.

El propósito principal del primer estudio fue verificar los diferentes parámetros PK después de una administración IV y SC. Basados en este estudio podemos concluir que existe una diferencia entre el patrón PK medido después de una administración IV o SC. A un  $t^{1/2}$  de 7,78 horas medido después de la inyección SC de MOD-5014, y solo 4,2 horas después de la inyección IV. Los valores de AUC fueron los mismos (tabla 58).

El segundo estudio sin embargo, estuvo destinado a las diferencias entre dos lotes de MOD-5014 clon núm. 61, que se inyectaron con la misma concentración de FVIIa o en igual unidad de actividad, en comparación con NovoSeven®. En este estudio demostramos que el clon 61 lote #75 manifestó mejores parámetros PK que el lote #81. El lote #81, que se inyectó al mismo nivel de actividad unitaria, tuvo menor Cmáx por un motivo desconocido. Además, se midió la misma Cmáx cuando se inyectó el clon 61 lote #81 en dos dosis diferentes (por la concentración de FVIIa o por la actividad unitaria), en lugar de 2,5 veces entre los dos valores de actividad. Después del análisis de ambos estudios en conjunto, podemos concluir que el clon 28 manifestó un parámetro de  $t^{1/2}$  prolongado que el clon 61 #75 (el mejor lote) después de la inyección SC (7,78 horas y 5,7 horas respectivamente, tabla 60). Podemos concluir además que las muestras en puntos de tiempo diferentes crean un patrón PK diferente, que conduce a una variación en las curvas PK. Los patrones de las curvas pueden enseñarnos más sobre el comportamiento del fármaco en la sangre. Por lo tanto, decidimos determinar los puntos de tiempo similares a los detectados por Baxter (0, 0,5, 2, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72 horas). Además, la concentración de FVIIa en el experimento 05010 fue demasiado alta, y se revisó en el siguiente experimento SC (05034). Para futuros estudios PK, decidimos inyectar el componente a 360 µg de FVIIa/kg para una dosis.

En conjunto, podemos aprender más sobre nuestro producto MOD-5014 después de una administración SC para

# ES 2 665 319 T3

determinar el clon y lote de más calidad y decidir el mejor método para la cantidad de inyecciones de MOD-5014- por la concentración de FVIIa o por las unidades de actividad.

5 Aunque algunas características de la invención se han ilustrado y descrito en la presente, los expertos en la técnica podrán realizar muchas modificaciones, sustituciones, cambios, y equivalentes.  
Listado de secuencias

<110> PROLOR BIOTECH INC.  
FIMA, UDI EYAL

10 HART, GILI  
<120> FACTORES DE COAGULACIÓN DE ACCIÓN PROLONGADA Y MÉTODOS PARA PRODUCIR LOS  
MISMOS

15 <130> P-9520-PC5

<150> 13/372,540  
<151> 2012-02-14

20 <160> 45

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser  
1 5 10 15

30 Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu  
20 25 30

<210> 2  
<211> 28  
<212> PRT  
35 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg  
1 5 10 15

40 Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
20 25

<210> 3  
<211> 12  
<212> **PRT**  
45 <213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro  
1 5 10

50 <210> 4  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

55 <400> 4



ES 2 665 319 T3

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val  
20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro  
35 40 45

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

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile  
65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly  
85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro  
100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile  
115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr  
130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala  
145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile  
165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val  
180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu  
195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile  
210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg  
225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly





ES 2 665 319 T3

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln  
 275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg  
 290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser  
 305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser  
 340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala  
 355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly  
 370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val  
 385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr  
 405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu  
 420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Cys Gly Arg  
 435 440 445

<210> 11  
 <211> 1356  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 11

ctcgaggaca tggctccca ggccctcagg ctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60

tgctggctg cagtcttctg aaccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120

cgcgccaacg cgttctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180

gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgaggagag gacgaagctg 240

ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300

tcttgcaagg accagctcca gtctatata tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360

aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggtgtgtgag 420

ES 2 665 319 T3

cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480  
 ctgctggcag acggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540  
 attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc ccaaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600  
 cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660  
 gggaccctga tcaacacat ctgggtgtc tccgcggccc actgtttoga caaaatcaag 720  
 aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780  
 gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840  
 aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtagg tcctcaactga ccatgtgggtg 900  
 ccctctgcc tgccogaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttogt gcgcttctca 960  
 ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020  
 ctcaacgtgc cccggctgat gaccagggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080  
 tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140  
 tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccaactacc ggggcacgtg gtacctgacg 1200  
 ggcatcgtca gctggggcca gggctgcgca accgtgggccc actttggggg gtacaccagg 1260  
 gtctcccagt acatcgagtg gctgcaaaag ctcatgcgct cagagccaag cccaggagtc 1320  
 ctctcgagag cccatttcc ctgaggatgc ggccgc 1356

- 5 <210> 12
- <211> 1442
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Factor VII modificado con CTP

<400> 12  
 ctcgaggaca tggctccca ggcctcagg ctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60  
 tgcctggctg cagtcttctg aaccagggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120  
 cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagagggg gtgcaaggag 180  
 gagcagtgt ccttcgagga ggcggggag atcttcaagg acgaggagag gacgaagctg 240  
 ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300  
 tcctgcaagg accagctcca gtcctatata tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360  
 aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420  
 cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480  
 ctgctggcag acggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540  
 attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc ccaaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600

ES 2 665 319 T3

```

cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg      660
gggaccctga tcaacacccat ctgggtgggc tccgcgccc actgtttoga caaaatcaag      720
aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat      780
gagcagagcc ggcggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc      840
aaccacgaca tcgcgtgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg      900
cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca      960
ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc     1020
ctcaacgtgc cccggctgat gaccaggac tgctgcagc agtcacggaa ggtgggagac     1080
tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc     1140
tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc accactacc ggggcacgtg gtacctgacc     1200
ggcatcgtga gctggggcca gggtgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg     1260
gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg     1320
ctgctgagag ccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc     1380
cctagcagac tgctggggc cagcgacacc cccatcctgc cccagtgagg atccgcgccc     1440
gc                                                                           1442

```

<210> 13

<211> 472

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Factor VII modificado con CTP

<400> 13

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1           5           10           15

```

```

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
           20           25           30

```

```

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
           35           40           45

```

```

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

```

```

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65           70           75           80

```

```

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
           85           90           95

```

ES 2 665 319 T3

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro  
 100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile  
 115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr  
 130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala  
 145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile  
 165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val  
 180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu  
 195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile  
 210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg  
 225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly  
 245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr  
 260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln  
 275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg  
 290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser  
 305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser

ES 2 665 319 T3

	340		345		350															
Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala					
		355					360					365								
Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly					
	370					375					380									
Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val					
385					390					395					400					
Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr					
			405						410					415						
Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu					
			420					425					430							
Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser					
		435					440					445								
Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Ser	Pro	Ser	Arg	Leu	Pro	Gly	Pro					
	450					455					460									
Ser	Asp	Thr	Pro	Ile	Leu	Pro	Gln													
465					470															

<210> 14

<211> 1535

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Factor VII modificado con CTP

10 <400> 14

ctcgaggaca	tggtctccca	ggccctcagg	ctcctctgcc	ttctgcttgg	gcttcagggc	60
tgcctggctg	cagtcttctg	aaccaggag	gaagcccacg	gcgtcctgca	ccggcgccgg	120
cgcgccaacg	cgttcctgga	ggagctgcgg	ccgggctccc	tggagagga	gtgcaaggag	180
gagcagtgct	ccttcgagga	ggcccgggag	atcttcaagg	acgaggagag	gacgaagctg	240
ttctggattt	cttacagtga	tggggaccag	tgtgcctcaa	gtccatgcca	gaatgggggc	300
tcctgcaagg	accagctcca	gtcctatata	tgcttctgcc	tcctgcctt	cgagggccgg	360
aactgtgaga	cgcacaagga	tgaccagctg	atctgtgtga	acgagaacgg	cggtgtgag	420
cagtactgca	gtgaccacac	gggcaccaag	cgctcctgtc	ggtgccacga	ggggtactct	480
ctgctggcag	acggggtgtc	ctgcacaccc	acagttgaat	atccatgtgg	aaaaatacct	540
attctagaaa	aaagaaatgc	cagcaaaccc	caaggccgaa	ttgtgggggg	caaggtgtgc	600

ES 2 665 319 T3

```

cccaaagggg agtgtccatg gcaggctctg ttggtggtga atggagctca gttgtgtggg      660
gggaccctga tcaacaccat ctgggtgggc tccgcgccc actgtttcga caaaatcaag      720
aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacgggat      780
gagcagagcc ggcgggtggc gcaggctcctc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc      840
aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg      900
cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca      960
ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc     1020
ctcaacgtgc cccgctgat gaccaggac tgctgcagc agtcacggaa ggtgggagac     1080
tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc     1140
tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc     1200
ggcatcgtga gctggggcca gggtgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtaccaccagg     1260
gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg     1320
ctgctgagag ccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc     1380
cctagcagac tgctggggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag ctctctaag     1440
gccctctctc catccctgcc atccccctcc cggtgccag gccctctga caccctatc     1500
ctgcctcagt gatgaaggtc tggatccgcg gccgc      1535

```

<210> 15  
 <211> 500  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Factor VII modificado con CTP

10

<400> 15

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val  
 20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro  
 35 40 45

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

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile  
 65 70 75 80

ES 2 665 319 T3

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly  
85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro  
100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile  
115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr  
130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala  
145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile  
165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val  
180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu  
195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile  
210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg  
225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly  
245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr  
260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln  
275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg  
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser  
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met  
325 330 335

ES 2 665 319 T3

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser  
 340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala  
 355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly  
 370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val  
 385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr  
 405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu  
 420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser  
 435 440 445

Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro  
 450 455 460

Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro  
 465 470 475 480

Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro  
 485 490 495

Ile Leu Pro Gln  
 500

<210> 16  
 <211> 1404  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgatc atggcagaat caccaggcct catcaccatt 60

gccttttagg atatctactc agtgctgaat gtacagtttt tcttgatcat gaaaacgcca 120

acaaaattct gaatcggcca aagaggtata attcaggtaa attggaagag tttgttcaag 180

ggaaccttga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt tgaagaagca cgagaagttt 240

ttgaaaacac tgaagaaca actgaatttt ggaagcagta tgttgatgga gatcagtggt 300

10 agtccaatcc atgtttaaat ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc tatgaatggt 360

ES 2 665 319 T3

```

gggtgtccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga tgtaacatgt aacattaaga      420
atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa caaggtgggtt tgctcctgta      480
ctgagggata tgcacttgca gaaaaccaga agtcctgtga accagcagtg ccatttccat      540
gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agctcaccog tgctgagact gtttttctctg      600
atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccatttt ggataacatc actcaaagca      660
cccaatcatt taatgacttc actcgagttg ttggtggaga agatgccaaa ccaggtcaat      720
tcccttgcca ggttgttttg aatggtaaag ttgatgcatt ctgtggaggc tctatcgta      780
atgaaaaatg gattgtaact gctgccact gtgttgaaac tgggtgtaaa attacagttg      840
tcgcaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga gcaaaagcga aatgtgattc      900
gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa gtacaacatc gacattgcc      960
ttctggaact ggacgaacc ttagtgctaa acagctacgt tacacctatt tgcattgctg     1020
acaaggaata cacgaacatc ttcctcaaat ttggatctgg ctatgtaagt ggctggggaa     1080
gagtcttcca caaagggaga tcagcttag ttctccagta ccttagagtt ccacttgttg     1140
accgagccac atgtcttoga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg ttctgtgctg     1200
gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc catgttactg     1260
aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg ggggtgaagag tgtgcaatga     1320
aaggcaaata tggaatatat accaaggtat cccggtatgt caactggatt aaggaaaaaa     1380
caaagctcac ttgaacgogg ccgc                                             1404

```

<210> 17  
 <211> 461  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17

```

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

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

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

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

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

```

ES 2 665 319 T3

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

ES 2 665 319 T3

	325		330		335
Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr	340		345		350
Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val	355		360		365
Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg	370		375		380
Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His	385		390		395
					400
Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val		405		410	415
Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly		420		425	430
Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser		435		440	445
Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr		450		455	460

<210> 18

<211> 1502

5 <212> **ADN**

<213> **Secuencia artificial**

<220>

10 <223> Factor IX modificado con CTP

<400> 18

gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgata atggcagaat caccaggcct catcaccatc	60
tgccttttag gatatactact cagtgtctgaa tgtacagttt ttcttgatca tgaaaacgcc	120
aacaaaattc tgaatcggcc aaagaggtat aattcaggta aattggaaga gtttgttcaa	180
gggaaccttg agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt ttgaagaagc acgagaagtt	240
tttgaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaagcagt atgttgatgg agatcagtgt	300
gagtccaatc catgtttaaa tggcggcagt tgcaaggatg acattaattc ctatgaatgt	360
tgggtgtccct ttggatttga aggaaagaac tgtgaattag atgtaacatg taacattaag	420
aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtgctgata acaagggtgt ttgctcctgt	480
actgagggat atcgacttgc agaaaaccag aagtcctgtg aaccagcagt gccatttcca	540
tgtggaagag tttctgtttc acaaacttct aagctcaccg gtgctgagac tgtttttcct	600

ES 2 665 319 T3

```

gatgtggact atgtaaattc tactgaagct gaaaccattt tggataacat cactcaaagc      660
accaatcat ttaatgactt cactcgagtt gttggtggag aagatgcca accaggtcaa      720
ttcccttggc aggttgtttt gaatggtaaa gttgatgcat tctgtggagg ctctatcggt      780
aatgaaaaat ggattgtaac tgctgcccac tgtgttgaaa ctggtgttaa aattacagtt      840
gtcgcaggtg aacataatat tgaggagaca gaacatacag agcaaaagcg aatgtgatt      900
cgaattattc ctcaccacaa ctacaatgca gctattaata agtacaacca tgacattgcc      960
cttctggaac tggacgaacc cttagtgcta aacagctacg ttacacctat ttgcattgct     1020
gacaaggaat acacgaacat cttcctcaaa tttggatctg gctatgtaag tggctgggga     1080
agagtcttcc acaaaggag atcagcttta gttcttcagt accttagagt tccacttgtt     1140
gaccgagcca catgtcttcg atctacaaag ttcaccatct ataacaacat gttctgtgct     1200
ggcttccatg aaggaggtag agattcatgt caaggagata gtgggggacc ccatgttact     1260
gaagtggaag ggaccagttt cttaactgga attattagct ggggtgaaga gtgtgcaatg     1320
aaaggcaaat atggaatata taccaaggta tcccggtagt tcaactggat taaggaaaaa     1380
acaaagctca ctagctccag cagcaaggcc cctccccga gcctgcctc cccaagcagg     1440
ctgctctggc cctccgacac accaatcctg ccacagtgat gaaggtctgg atccgcggcc     1500
gc

```

<210> 19

<211> 489

5 <212> PRT

<213> **Secuencia artificial**

<220>

10 <223> Factor IX modificado con CTP

<400> 19

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

ES 2 665 319 T3

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

ES 2 665 319 T3

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr  
 340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val  
 355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg  
 370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His  
 385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val  
 405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly  
 420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser  
 435 440 445

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

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly  
 465 470 475 480

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
 485

<210> 20

<211> 1585

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Factor IX modificado con CTP

10 <400> 20

```

gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgatc atggcagaat caccaggcct catcaccatc      60
tgccttttag gatatctact cagtgctgaa tgtacagttt ttcttgatca tgaaaacgcc      120
aacaaaattc tgaatcggcc aaagaggtat aattcaggta aattggaaga gtttgttcaa      180
gggaaccttg agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt ttgaagaagc acgagaagtt      240
tttgaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaagcagt atgttgatgg agatcagtgt      300
gagtccaatc catgtttaaa tggcggcagt tgcaaggatg acattaattc ctatgaatgt      360
    
```

```

tgggtgccct ttggatttga aggaaagaac tgtgaattag atgtaacatg taacattaag      420
aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtgctgata acaaggtggt ttgctcctgt      480
actgagggat atcgacttgc agaaaaccag aagtcctgtg aaccagcagt gccatttcca      540
tgtggaagag tttctgtttc acaaacttct aagctcaccg gtgctgagac tgtttttcct      600
gatgtggact atgtaaattc tactgaagct gaaaccattt tggataacat cactcaaagc      660
accaatcat ttaatgactt cactcgagtt gttggtggag aagatgcca accaggtcaa      720
ttcccttggc aggttgtttt gaatggtaaa gttgatgcat tctgtggagg ctctatcgtt      780
aatgaaaaat ggattgtaac tgctgccac tgtgttgaac ctgggtgtaa aattacagtt      840
gtcgcaggtg aacataatat tgaggagaca gaacatacag agcaaaagcg aatgtgatt      900
cgaattattc ctcaccacaa ctacaatgca gctattaata agtacaacca tgacattgcc      960
cttctggaac tggacgaacc cttagtgtca aacagctacg ttacacctat ttgcattgct     1020
acaaggaata cacgaacatc ttctcaaatt ttggatctgg ctatgtaagt ggctggggaa     1080
gagtcctcca caaagggaga tcagctttag ttcttcagta ccttagagtt ccactgttg      1140
accgagccac atgtcttoga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg ttctgtgctg      1200
gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc catgttactg      1260
aagtggaagg gaccagtttc ttaactgga ttattagctg ggggtgaagag tgtgcaatga      1320
aaggcaaata tggaatatat accaaggtat ccoggtatgt caactggatt aaggaaaaaa     1380
caaagctcac tagctccagc agcaaggccc ctccccgag cctgccctcc ccaagcaggc     1440
tgcctgggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag ctctctaaag gccctcctc     1500
cctccctgcc atccccctcc cggctgctg gccctctga cccccctatc ctgcctcagt     1560
gatgaaggtc tggatccgcg gccgc                                             1585

```

5 <210> 21  
 <211> 517  
 <212> PRT  
 <213> **Secuencia artificial**

10 <220>  
 <223> Factor IX modificado con CTP

<400> 21

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

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

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

15

ES 2 665 319 T3

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

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

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

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

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

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

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly  
145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe  
165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala  
180 185 190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu  
195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe  
210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp  
225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile  
245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly  
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu  
275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn



ES 2 665 319 T3

tctagagtgc	acccccgcat	ggagctgagg	ccctggttgc	tatgggtggt	agcagcaaca	60
ggaaccttgg	tcctgctagc	agctgatgct	cagggccaga	aggtcttcac	caacacgtgg	120
gctgtgcgca	tccttgagg	cccagcggtg	gccaacagtg	tggcacggaa	gcatgggttc	180
ctcaacctgg	gccagatctt	cggggactat	taccacttct	ggcatcgagg	agtgacgaag	240
cggctccctgt	cgcctcaccg	cccgccggc	agccggctgc	agagggagcc	tcaagtacag	300
tggctggaac	agcaggtggc	aaagcgacgg	actaaacggg	acgtgtacca	ggagcccaca	360
gaccccaagt	ttcctcagca	gtggtacctg	tctggtgtca	ctcagcggga	cctgaatgtg	420
aaggcggcct	gggcgcaggg	ctacacaggg	cacggcattg	tggtctccat	tctggacgat	480
ggcatcgaga	agaaccaccc	ggacttggca	ggcaattatg	atcctggggc	cagttttgat	540
gtcaatgacc	aggaccctga	ccccagcct	cggtacacac	agatgaatga	caacaggcac	600
ggcacacggt	gtgcggggga	agtggctgcg	gtggccaaca	acggtgtctg	tggtgtaggt	660
gtggcctaca	acgcccgcat	tggaggggtg	cgcatgctgg	atggcgaggt	gacagatgca	720
gtggaggcac	gctcgctggg	cctgaacccc	aaccacatcc	acatctacag	tgccagctgg	780
ggccccgagg	atgacggcaa	gacagtggat	gggccagccc	gcctcgccga	ggaggccttc	840
ttccgtgggg	ttagccaggg	ccgagggggg	ctgggctcca	tctttgtctg	ggcctcgggg	900
aacggggggc	ggaaacatga	cagctgcaac	tgcgacggct	acaccaacag	tatctacacg	960
ctgtccatca	gcagcgccac	gcagtttggc	aacgtgccgt	ggtacagcga	ggcctgctcg	1020
tccacactgg	ccacgaccta	cagcagtggc	aaccagaatg	agaagcagat	cgtgacgact	1080
gacttgcggc	agaagtgcac	ggagtctcac	acgggcacct	cagcctctgc	ccccttagca	1140
gccggcatca	ttgctctcac	cctggaggcc	aataagaacc	tcacatggcg	ggacatgcaa	1200
cacctggtgg	tacagacctc	gaagccagcc	cacctcaatg	ccaacgactg	ggccaccaat	1260
ggtgtggggc	gaaagtgag	ccactcatat	ggctacgggc	ttttggacgc	aggcgccatg	1320
gtggccctgg	cccagaattg	gaccacagtg	gccccccagc	ggaagtgcac	catcgacatc	1380
ctcaccgagc	ccaagacat	cgggaaacgg	ctcgaggtgc	ggaagaccgt	gaccgcgtgc	1440
ctgggcgagc	ccaaccacat	cactcggctg	gagcacgctc	aggcgcggct	caccctgtcc	1500
tataatcgcc	gtggcgacct	ggccatccac	ctggtcagcc	ccatgggcac	ccgctccacc	1560
ctgctggcag	ccaggccaca	tgactactcc	gcagatgggt	ttaatgactg	ggccttcacg	1620
acaactcatt	cctgggatga	ggatccctct	ggcgagtggg	tcctagagat	tgaaaacacc	1680
agcgaagcca	acaactatgg	gacgctgacc	aagttcacc	tcgtactcta	tggcaccgcc	1740
cctgaggggc	tgcccgtacc	tccagaaagc	agtggctgca	agaccctcac	gtccagtcag	1800
gcctgtgtgg	tgtgcgagga	aggcttctcc	ctgcaccaga	agagctgtgt	ccagcactgc	1860

ES 2 665 319 T3

cctccaggct tcgccccca agtcctcgat acgcactata gcaccgagaa tgacgtggag 1920  
 accatccggg ccagcgtctg cgccccctgc cagcctcat gtgccacatg ccaggggccc 1980  
 gccctgacag actgcctcag ctgccccagc cagcctcct tggaccctgt ggagcagact 2040  
 tgctcccggc aaagccagag cagccgagag tccccgccac agcagcagcc acctcggctg 2100  
 cccccggagg tggaggcggg gcaacggctg cgggcagggc tgctgcctc acacctgcct 2160  
 gaggtggtgg ccggcctcag ctgcgccttc atcgtgctgg tcttcgtcac tgtcttctg 2220  
 gtctgcagc tgcgtcttgg ctttagtttt cggggggtga aggtgtacac catggaccgt 2280  
 ggcctcatct cctacaaggg gctgccccct gaagcctggc aggaggagtg cccgtctgac 2340  
 tcagaagagg acgagggccc gggcgagagg accgccttta tcaaagacca gagcgcctc 2400  
 tgaacgcggc cgc 2413

<210> 23  
 <211> 794  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 23

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

ES 2 665 319 T3

His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His  
 145 150 155 160

Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn  
 165 170 175

Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn  
 180 185 190

Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn  
 195 200 205

Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val  
 210 215 220

Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu  
 225 230 235 240

Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro  
 245 250 255

Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu  
 260 265 270

Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile  
 275 280 285

Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn  
 290 295 300

Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala  
 305 310 315 320

Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr  
 325 330 335

Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val  
 340 345 350

Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser  
 355 360 365

Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala  
 370 375 380

Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr



ES 2 665 319 T3

Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu  
 645 650 655

Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu  
 660 665 670

Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln  
 675 680 685

Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu  
 690 695 700

Arg Ala Gly Leu Leu Pro Ser His Leu Pro Glu Val Val Ala Gly Leu  
 705 710 715 720

Ser Cys Ala Phe Ile Val Leu Val Phe Val Thr Val Phe Leu Val Leu  
 725 730 735

Gln Leu Arg Ser Gly Phe Ser Phe Arg Gly Val Lys Val Tyr Thr Met  
 740 745 750

Asp Arg Gly Leu Ile Ser Tyr Lys Gly Leu Pro Pro Glu Ala Trp Gln  
 755 760 765

Glu Glu Cys Pro Ser Asp Ser Glu Glu Asp Glu Gly Arg Gly Glu Arg  
 770 775 780

Thr Ala Phe Ile Lys Asp Gln Ser Ala Leu  
 785 790

<210> 24  
 <211> 1621  
 5 <212> **ADN**  
 <213> **Secuencia artificial**

<220>  
 <223> Factor VII modificado con CTP

10 <400> 24

ctcgaggaca tggctctcca ggcctcagg ctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc	60
tgctctggctg cagtcttctg aaccagagag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg	120
cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagagggg gtgcaaggag	180
gagcagtgct ccttcagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg	240
ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc	300
tctgcaagg accagctcca gtcctatata tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg	360
aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag	420

ES 2 665 319 T3

cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480  
 ctgctggcag acgggggtgc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540  
 attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc ccaaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600  
 cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttgggga atggagctca gttgtgtggg 660  
 gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaatcaag 720  
 aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780  
 gagcagagcc ggggggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840  
 aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtgggtg 900  
 ccctctgccc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960  
 ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020  
 ctcaacgtgc cccggctgat gaccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080  
 tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140  
 tgcaaggggg acagtggagg ccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200  
 ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260  
 gtgtcccagt acatcgatg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320  
 ctgctgagag cccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctcccctag cctgcccagc 1380  
 cctagcagac tgccctgggc cagtgcaccc cctatcctgc ctcagtcag ctccagcaag 1440  
 gccccacccc ctagcctgcc ttctcctct cggctgcctg gccccagca tactccaatt 1500  
 ctgccccagt cctccagcag taaggctccc cctccatctc tgccatcccc cagcagactg 1560  
 ccaggccctt ctgatacacc catcctccca cagtgatgag gatccgcggc cgcttaatta 1620  
 a 1621

<210> 25  
 <211> 528  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Factor VII modificado con CTP

<400> 25

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val  
 20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro  
 35 40 45

ES 2 665 319 T3

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

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile  
 65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly  
 85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro  
 100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile  
 115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr  
 130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala  
 145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile  
 165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val  
 180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu  
 195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile  
 210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg  
 225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly  
 245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr  
 260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln  
 275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg

ES 2 665 319 T3

290		295		300
Thr Phe Ser Glu Arg	Thr Leu Ala Phe Val	Arg Phe Ser Leu Val	Ser	
305	310	315	320	
Gly Trp Gly Gln Leu	Leu Asp Arg Gly Ala	Thr Ala Leu Glu Leu	Met	
	325	330	335	
Val Leu Asn Val Pro	Arg Leu Met Thr	Gln Asp Cys Leu	Gln Gln Ser	
	340	345	350	
Arg Lys Val Gly Asp	Ser Pro Asn Ile Thr	Glu Tyr Met Phe	Cys Ala	
	355	360	365	
Gly Tyr Ser Asp Gly	Ser Lys Asp Ser Cys	Lys Gly Asp Ser	Gly Gly	
	370	375	380	
Pro His Ala Thr His	Tyr Arg Gly Thr Trp	Tyr Leu Thr Gly	Ile Val	
385	390	395	400	
Ser Trp Gly Gln Gly	Cys Ala Thr Val	Gly His Phe Gly	Val Tyr Thr	
	405	410	415	
Arg Val Ser Gln Tyr	Ile Glu Trp Leu Gln	Lys Leu Met Arg	Ser Glu	
	420	425	430	
Pro Arg Pro Gly Val	Leu Leu Arg Ala Pro	Phe Pro Ser Ser	Ser Ser	
	435	440	445	
Lys Ala Pro Pro Pro	Ser Leu Pro Ser Pro	Ser Arg Leu Pro	Gly Pro	
	450	455	460	
Ser Asp Thr Pro Ile	Leu Pro Gln Ser Ser	Ser Ser Lys Ala	Pro Pro	
465	470	475	480	
Pro Ser Leu Pro Ser	Pro Ser Arg Leu Pro	Gly Pro Ser Asp	Thr Pro	
	485	490	495	
Ile Leu Pro Gln Ser	Ser Ser Ser Lys Ala	Pro Pro Pro Ser	Leu Pro	
	500	505	510	
Ser Pro Ser Arg Leu	Pro Gly Pro Ser Asp	Thr Pro Ile Leu	Pro Gln	
	515	520	525	

<210> 26  
 <211> 1607  
 <212> **ADN**

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Factor VII modificado con CTP

10 <400> 26

ES 2 665 319 T3

ctcgaggaca tggctctcca ggccctcagg ctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60  
 tgcttgctg cagtcttctg aaccaggag gaagcccacg gctcctgca cggcgcccg 120  
 cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgagg ccgggctccc tggagagggg gtgcaaggag 180  
 gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240  
 ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300  
 tcttgcaagg accagctcca gtcctatata tgcttctgcc tcctgcctt cgagggcccg 360  
 aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggtgtgag 420  
 cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480  
 ctgctggcag acgggggtgc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540  
 attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600  
 cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660  
 gggaccctga tcaacacat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaatcaag 720  
 aactggagga acctgatgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780  
 gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840  
 aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcaactga ccatgtggtg 900  
 cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggagc tggccttctg gcgcttctca 960  
 ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020  
 ctcaacgtgc ccgggctgat gaccaggac tgctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080  
 tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140  
 tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200  
 ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260  
 gtgtcccagt acatcgagt gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320  
 ctgctgagag ccccctccc cagcagcagc tccaaggccc ctcccctag cctgcccagc 1380  
 cctagcagac tgctggggc cagtgcacc cctatcctgc ctcagtccag ctccagcaag 1440  
 gccccacccc ctagcctgcc ttctcctct cggctgctg gcccagcga tactccaatt 1500  
 ctgcccagc cctccagcag taaggctccc cctccatctc tgccatccc cagcagactg 1560  
 ccaggccctt ctgatacacc catcctcca cagtgatgag gatccgc 1607

<210> 27  
 <211> 532  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Factor VII modificado con CTP

10

<400> 27

ES 2 665 319 T3

Leu Glu Asp Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Gln Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala  
 20 25 30  
 His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu  
 35 40 45  
 Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser  
 50 55 60  
 Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys  
 85 90 95  
 Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe  
 100 105 110  
 Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp  
 115 120 125  
 Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser  
 130 135 140  
 Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys  
 165 170 175  
 Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly  
 180 185 190  
 Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln  
 195 200 205  
 Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile  
 210 215 220

ES 2 665 319 T3

Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys  
 225 230 235 240  
  
 Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu  
 245 250 255  
  
 His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro  
 260 265 270  
  
 Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg  
 275 280 285  
  
 Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu  
 290 295 300  
  
 Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser  
 305 310 315 320  
  
 Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu  
 325 330 335  
  
 Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu  
 340 345 350  
  
 Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met  
 355 360 365  
  
 Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp  
 370 375 380  
  
 Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr  
 385 390 395 400  
  
 Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly  
 405 410 415  
  
 Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met  
 420 425 430  
  
 Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser  
 435 440 445  
  
 Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu  
 450 455 460  
  
 Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys  
 465 470 475 480

ES 2 665 319 T3

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser  
 485 490 495

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro  
 500 505 510

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile  
 515 520 525

Leu Pro Gln Gly  
 530

<210> 28  
 <211> 1775  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Factor VII modificado con CTP

<400> 28

```

ctcgaggaca tggctctcca ggccctcagg ctctcttgcc ttctgcttgg gcttcagggc      60
tgcoctggctg cagtcttcgt aaccacaggag gaagcccacg gcgtcctgca cggcgccgg      120
cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgagg ccgggtccc tggagagggg gtgcaaggag      180
gagcagtgtct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgaggagag gacgaagctg      240
ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc      300
tcttgcaagg accagctcca gtcctatata tgccttgcc tcctgcctt cgagggccgg      360
aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag      420
cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct      480
ctgctggcag acgggggtgc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct      540
attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc ccaaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc      600
cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg      660
gggaccctga tcaacacat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag      720
aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat      780
gagcagagcc ggggggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc      840
aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg      900
ccctctgccc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca      960
ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc     1020
ctcaacgtgc cccggctgat gaccacaggac tgctgcagc agtcacggaa ggtgggagac     1080
tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc     1140
    
```

ES 2 665 319 T3

tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200  
 ggcacatcgtga gctgggggcca gggctgcgcc accgtggggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260  
 gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320  
 ctgctgagag ccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc 1380  
 cctagcagac tgcttgggccc ctctgacacc cctatcctgc ctcagtccag ctctcttaag 1440  
 gctccaccac cttccctgcc tagcccttca agactgccag gccctagcga tacaccaatt 1500  
 ctgccccagt cctccagcag caaggctccc ccacctagcc tgccttctcc atcaaggctg 1560  
 cctggcccat ccgatacccc aatcttgctt cagagcagct cttagcaaggc acctcccccc 1620  
 agtctgccct ctccaagcag actccctggc ccttcagaca ctccaatcct cccacagtcc 1680  
 tctagctcta aagctccacc tcccagcctg cccagcccta gtagactccc cggaccttct 1740  
 gatacccccca tcttgcccca gtgatgagga tccgc 1775

<210> 29  
 5 <211> 589  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> Factor VII modificado con CTP

<400> 29

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

15

ES 2 665 319 T3

115								120										125
Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser			
130						135					140							
Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser			
145					150					155					160			
Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys			
				165					170					175				
Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly			
			180					185					190					
Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln			
		195					200					205						
Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile			
	210					215					220							
Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys			
225					230					235					240			
Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu			
				245					250					255				
His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro			
			260					265					270					
Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg			
		275					280					285						
Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu			
	290					295					300							
Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser			
305					310					315					320			
Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu			
				325					330					335				
Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu			
			340					345					350					
Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met			
		355					360					365						

ES 2 665 319 T3

Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp  
 370 375 380

Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr  
 385 390 395 400

Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly  
 405 410 415

Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met  
 420 425 430

Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser  
 435 440 445

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu  
 450 455 460

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys  
 465 470 475 480

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser  
 485 490 495

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro  
 500 505 510

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile  
 515 520 525

Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser  
 530 535 540

Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser  
 545 550 555 560

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu  
 565 570 575

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Gly Ser  
 580 585

<210> 30  
 <211> 1673  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Factor IX modificado con CTP

10 <400> 30

ES 2 665 319 T3

tctagagtcg accccgccat gcagcgcgtg aacatgatca tggcagaatc accaggcctc 60  
atcaccatct gccttttagg atatctactc agtgctgaat gtacagtttt tcttgatcat 120  
gaaaacgcc acaaaattct gaatcggcca aagaggtata attcaggtaa attggaagag 180  
tttgttcaag ggaaccttga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt tgaagaagca 240  
cgagaagttt ttgaaaacac tgaagaaca actgaatfff ggaagcagta tgttgatgga 300  
gatcagtgtg agtccaatcc atgtttaaat ggccggcagtt gcaaggatga cattaattcc 360  
tatgaatggt ggtgtccctt tggattttaa ggaaagaact gtgaattaga tghtaacatgt 420  
aacattaaga atggcagatg cgagcagttt tghtaaaaata gtgctgataa caaggtggtt 480  
tgctcctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga accagcagtg 540  
ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agctcaccog tgctgaggca 600  
gtttttcctg atgtggacta tghtaaattct actgaagctg aaaccatttt ggataacatc 660  
actcaaagca cccaatcatt taatgacttc actcgagttg ttggtggaga agatgccaaa 720  
ccaggtcaat tccttggca ggttgttttg aatggtaaag ttgatgcatt ctgtggaggc 780  
tctatcgta atgaaaaatg gattgtaact gctgccact gtgttgaaac tgggtgtaaa 840  
attacagttg tcgcaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga gcaaaagcga 900  
aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa gtacaacat 960  
gacattgcc ttctggaact ggacgaacc ttagtgttaa acagctacgt tacacctatt 1020  
tgcattgctg acaaggaata cacgaacatc ttctcaaat ttggatctgg ctatgtaagt 1080  
ggctggggaa gagtcttcca caaagggaga tcagcttag ttcttcagta ccttagagtt 1140  
ccacttggtg accgagccac atgtcttoga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg 1200  
ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc 1260  
catgttactg aagtggaag gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg ggtgaagag 1320  
tgtgcaatga aaggcaata tggaaatat accaaggtat cccggtatgt caactggatt 1380  
aaggaaaaaa caaagctcac tagctccagc agcaaggccc ctccccgag cctgcoctcc 1440  
ccaagcaggc tgctgggcc cagtgcacc cctatcctgc ctcagtcag ctccagcaag 1500  
gccccacccc ctagcctgcc ttctccttct oggctgctg gccccagoga tactccaatt 1560  
ctgccccagt cctccagcag taaggctccc cctccatctc tgccatcccc cagcagactg 1620  
ccaggccctt ctgatacacc catcctcca cagtgatgag gatccgccc cgc 1673

5 <210> 31  
<211> 545  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Factor IX modificado con CTP

<400> 31

ES 2 665 319 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly  
 145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe  
 165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala  
 180 185 190

Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu  
 195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe  
 210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp



ES 2 665 319 T3

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro  
 485 490 495

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr  
 500 505 510

Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu  
 515 520 525

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro  
 530 535 540

Gln  
 545

<210> 32  
 <211> 1757  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Factor IX modificado con CTP

10 <400> 32

```
tctagagtgc accccgccat gcagcgcgtg aacatgatca tggcagaatc accaggcctc      60
atcaccatct gccttttagg atatctactc agtgctgaat gtacagtttt tcttgatcat      120
gaaaacgcc acaaaattct gaatcggcca aagaggtata attcaggtaa attggaagag      180
tttgttcaag ggaaccttga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt tgaagaagca      240
cgagaagttt ttgaaaacac tgaagaaca actgaatfff ggaagcagta tgttgatgga      300
gatcagtggt agtccaatcc atgtttaaat ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc      360
tatgaatggt ggtgtccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga tgtaacatgt      420
aacattaaga atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa caaggtggtt      480
tgctcctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga accagcagtg      540
ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agtcaccccg tgctgaggca      600
gtttttcctg atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccatttt ggataacatc      660
actcaaagca cccaatcatt taatgacttc actcgagttg ttggtggaga agatgccaaa      720
ccaggtcaat tcccttgcca ggttgttttg aatggtaaag ttgatgcatt ctgtggaggc      780
tctatcgtta atgaaaaatg gattgtaact gctgcccact gtgttgaaac tgggtgtaaa      840
attacagttg tcgcaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga gcaaaagcga      900
aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa gtacaacctat      960
gacattgccc ttctggaact ggacgaacct ttagtgctaa acagctacgt tacacctatt     1020
```

ES 2 665 319 T3

tgcattgctg acaaggaata cacgaacatc ttctcaaat ttggatctgg ctatgtaagt 1080  
 ggctggggaa gagtcttcca caaagggaga tcagctttag ttcttcagta ccttagagtt 1140  
 ccacttggtg accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg 1200  
 ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc 1260  
 catgttactg aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg gggatgaagag 1320  
 tgtgcaatga aaggcaaata tggaatatat accaaggtat cccggtatgt caactggatt 1380  
 aaggaaaaaa caaagctcac tagctccagc agcaaggccc ctccccgag cctgccctcc 1440  
 ccaagcaggc tgcttgggcc ctctgacacc cctatcctgc ctcagtcag ctcctctaag 1500  
 gccccaccac cttccctgcc tagcccttca agactgccag gccctagcga tacaccaatt 1560  
 ctgccccagt cctccagcag caaggctccc ccacctagcc tgcttctcc atcaaggctg 1620  
 cctggcccat ccgatacccc aatthtgcct cagagcagct ctagcaaggc acctcccccc 1680  
 agtctgccct ctccaagcag actccctggc ccttcagaca ctcccattct gccacagtga 1740  
 tgaggatccg cggccgc 1757

5 <210> 33  
 <211> 583  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Factor IX modificado con CTP

<400> 33

Ser Arg Val Asp Pro Ala Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu  
 1 5 10 15

Ser Pro Gly Leu Ile Thr Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala  
 20 25 30

Glu Cys Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn  
 35 40 45

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

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

Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln  
 85 90 95

Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly  
 100 105 110

15

ES 2 665 319 T3

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

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

Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val  
 145 150 155 160

Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys  
 165 170 175

Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr  
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val  
 195 200 205

Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr  
 210 215 220

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys  
 225 230 235 240

Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala  
 245 250 255

Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala  
 260 265 270

His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His  
 275 280 285

Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg  
 290 295 300

Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His  
 305 310 315 320

Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr  
 325 330 335

Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu  
 340 345 350

Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys

ES 2 665 319 T3

355 360 365

Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp  
370 375 380

Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met  
385 390 395 400

Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp  
405 410 415

Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr  
420 425 430

Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly  
435 440 445

Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr  
450 455 460

Lys Leu Thr Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser  
465 470 475 480

Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser  
485 490 495

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu  
500 505 510

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys  
515 520 525

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser  
530 535 540

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro  
545 550 555 560

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile  
565 570 575

Leu Pro Gln Gly Ser Ala Ala  
580

<210> 34  
<211> 1840

5 <212> **ADN**  
<213> **Secuencia artificial**

<220>  
<223> Factor IX modificado con CTP

10 <400> 34

ES 2 665 319 T3

ctagagtoga ccccgccatg cagcgcgtga acatgatcat ggcagaatca ccaggcctca 60  
 tcaccatctg ccttttagga tatctactca gtgctgaatg tacagttttt cttgatcatg 120  
 aaaacgccaa caaaattctg aatcggccaa agaggtataa ttcaggtaaa ttggaagagt 180  
 ttgttcaagg gaaccttgag agagaatgta tggaagaaaa gtgtagtttt gaagaagcac 240  
 gagaagtttt tgaaaacact gaaagaacaa ctgaattttg gaagcagtat gttgatggag 300  
 atcagtgtga gtccaatcca tgtttaaatg gcggcagttg caaggatgac attaattcct 360  
 atgaatgttg gtgtcccttt ggatttgaag gaaagaactg tgaattagat gtaacatgta 420  
 acattaagaa tggcagatgc gagcagtttt gtaaaaatag tgctgataac aagtggtttt 480  
 gtcctgtac tgagggatat cgacttgcaag aaaaccagaa gtcctgtgaa ccagcagtgcc 540  
 catttccatg tggaagagtt tctgtttcac aaacttctaa gctcaccctg gctgaggcag 600  
 ttttctctga tgtggactat gtaaattcta ctgaagctga aaccattttg gataacatca 660  
 ctcaaagcac ccaatcattt aatgacttca ctcgagttgt tgggtggagaa gatgccaac 720  
 caggtcaatt cccttggcag gttgttttga atggtaaagt tgatgcattc tgtggaggct 780  
 ctatcgtaa tgaaaaatgg attgtaactg ctgcccactg tgttgaaact ggtgttaaaa 840  
 ttacagttgt cgcaggtgaa cataatattg aggagacaga acatacagag caaaagcgaa 900  
 atgtgattcg aattattcct caccacaact acaatgcagc tattaataag tacaacctg 960  
 acattgcctt tctggaactg gacgaaccct tagtgctaaa cagctacggt acacctattt 1020  
 gcattgctga caaggaatac acgaacatct tcctcaaatt tggatctggc tatgtaagtg 1080  
 gctggggaag agtcttccac aaagggagat cagctttagt tcttcagtac cttagagttc 1140  
 cacttgttga ccgagccaca tgtcttcgat ctacaaaagt caccatctat aacaacatgt 1200  
 tctgtgctgg cttccatgaa ggaggtagag attcatgtca aggagatagt gggggacccc 1260  
 atgttactga agtgaaggg accagtttct taactggaat tattagctgg ggtgaagagt 1320  
 gtgcaatgaa aggcaaatat ggaatatata ccaaggtatc ccggtatgtc aactggatta 1380  
 aggaaaaaac aaagctcact agctccagca gcaaggcccc tcccccgagc ctgccctccc 1440  
 caagcaggct gcctgggccc tctgacacct ctatcctgcc tcagtccagc tcctctaagg 1500  
 ctccaccacc ttccctgcct agcccttcaa gactgccagg ccctagcagat acaccaattc 1560  
 tgccccagtc ctccagcagc aaggctcccc cacctagcct gccttctcca tcaaggctgc 1620  
 ctggcccacc cgatacccca attttgctc agagcagctc tagcaaggca cctcccccca 1680  
 gtctgccctc tccaagcaga ctccctggcc cttcagacac tccaatctc ccacagtct 1740  
 ctagctctaa agctccacct cccagcctgc ccagccctag tagactcccc ggaccttctg 1800  
 atacccccat cttgccccag tgatgaggat ccgcgccgc 1840

- 5 <210> 35
- <211> 610
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 665 319 T3

<220>

<223> Factor IX modificado con CTP

<400> 35

5

Arg Val Asp Pro Ala Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser  
1 5 10 15

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

Cys Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg  
35 40 45

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

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

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

Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser  
100 105 110

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

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

Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys  
145 150 155 160

Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu  
165 170 175

Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser  
180 185 190

ES 2 665 319 T3

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

ES 2 665 319 T3

Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys  
 450 455 460

Leu Thr Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro  
 465 470 475 480

Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser  
 485 490 495

Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro  
 500 505 510

Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala  
 515 520 525

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp  
 530 535 540

Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser  
 545 550 555 560

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu  
 565 570 575

Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro  
 580 585 590

Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Gly Ser  
 595 600 605

Ala Ala  
 610

5 <210> 36  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador 101 para FIX-(CTP)2  
 <400> 36  
 gtttagtgaa ccgtcagaat 20

15 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador 103-R para FIX-(CTP)2  
 <400> 37  
 ttgaggaaga tggtcgtgta 20

25 <210> 38  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador 98 para FIX-(CTP)2  
  
 <400> 38  
 5    attacagttg tcgcaggtga        20  
  
 <210> 39  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 10   <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador 99-R para FIX-(CTP)2  
  
 15   <400> 39  
      gctggagcta gtgagctttg tttttcctt 30  
  
 <210> 40  
 <211> 25  
 20   <212> ADN  
      <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador 100 para FIX-(CTP)2  
  
 25   <400> 40  
      gctcactagc tccagcagca aggcc        25  
  
 <210> 41  
 30   <211> 23  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 35   <223> Cebador 27-R para FIX-(CTP)2  
  
      <400> 41  
      ttttcactgc attctagttg tgg 23  
  
 40   <210> 42  
      <211> 20  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia artificial  
  
 45   <220>  
      <223> Cebador 75  
  
      <400> 42  
      ctcccagttc aattacagct        20  
 50  
      <210> 43  
      <211> 27  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia artificial  
 55  
      <220>  
      <223> Cebador 122r  
  
      <400> 43  
 60   ggaaaaactg cctcagcacg ggtgagc        27  
  
      <210> 44  
      <211> 32  
      <212> ADN  
 65   <213> Secuencia artificial

# ES 2 665 319 T3

<220>

<223> Cebador 123

<400> 44

5 gtgctgaggc agttttcct gatgtggact at 32

<210> 45

<211> 18

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador 124r

15 <400> 45

caacacagtg ggcagcag 18

20

## REIVINDICACIONES

1. Un factor de coagulación modificado con péptido del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) que consiste en un factor de coagulación y tres CTP unidos al carboxilo terminal de dicho factor de coagulación, en donde dicho factor de coagulación modificado con CTP es:  
 un polipéptido del factor IX (FIX) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31 o de los aminoácidos 47-545 de la sec. con núm. de ident.: 31;  
 un polipéptido del factor VII (FVII) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 25 o de los aminoácidos 39-528 de la sec. con núm. de ident.: 25; o  
 un factor VIIa activado (FVIIa) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 39-528 de la sec. con núm. de ident.: 25.
2. El factor de coagulación modificado con CTP de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos un CTP está glicosilado.
3. El factor de coagulación modificado con CTP de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho factor de coagulación modificado con CTP es un polipéptido del FIX modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31 o de los aminoácidos 47-545 de la sec. con núm. de ident.: 31.
4. El factor de coagulación modificado con CTP de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho factor de coagulación modificado con CTP es un polipéptido del FVII modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 25 o de los aminoácidos 39-528 de la sec. con núm. de ident.: 25, o en donde el factor de coagulación modificado con CTP es un FVIIa modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 39-528 de la sec. con núm. de ident.: 25.
5. Un polinucleótido que codifica el factor de coagulación modificado con CTP de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4.
6. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la secuencia de ácido nucleico de dicho polinucleótido es como se expone en la sec. con núm. de ident.: 30.
7. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la secuencia de ácido nucleico de dicho polinucleótido es como se expone en la sec. con núm. de ident.: 24.
8. Una composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación modificado con CTP de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, o un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a la 7, y un portador farmacéuticamente aceptable.
9. Un factor de coagulación modificado con CTP de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, para usar como un medicamento.
10. Un factor de coagulación modificado con CTP de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, para usar en la prevención o el tratamiento de un trastorno de coagulación de la sangre o de formación de coágulos en un sujeto.
11. El factor de coagulación modificado con CTP o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el trastorno de coagulación de la sangre o de formación de coágulos es hemofilia.
12. El factor de coagulación modificado con CTP o la composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento de un trastorno de coagulación de la sangre o de formación de coágulos en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 mediante administración subcutánea.
13. El factor de coagulación modificado con CTP o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a la 12, en donde el sujeto es un niño.
14. Un método para prolongar el tiempo de vida media biológica de un factor de coagulación, el método comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FIX, o comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FVII o FVIIa, para producir así un factor de coagulación modificado con CTP como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, en donde el factor de coagulación tiene un tiempo de vida media biológica prolongado.
15. Un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) de un factor de coagulación, el método comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de

un polipéptido del FIX, o comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FVII o FVIIa, para producir así un factor de coagulación modificado con CTP como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, en donde el factor de coagulación tiene un área bajo la curva (AUC) mejorada.

- 5
16. Un método para reducir la frecuencia de dosificación de un factor de coagulación, el método comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FIX, o comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FVII o FVIIa, para producir así un factor de coagulación modificado con CTP como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, en donde el factor de coagulación tiene una reducción de la frecuencia de dosificación.
- 10
17. Un método para reducir la velocidad de aclaramiento de un factor de coagulación, el método comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FIX, o comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FVII o FVIIa, para producir así un factor de coagulación modificado con CTP como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, en donde el factor de coagulación tiene una velocidad de aclaramiento reducida.
- 15
18. Un método para producir el factor de coagulación modificado con CTP de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, el método comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FIX, o que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de un polipéptido del FVII o del FVIIa, para producir así el factor de coagulación modificado con CTP.
- 20
- 25

### Nivel del Ag Factor IX-ELISA (cosecha)

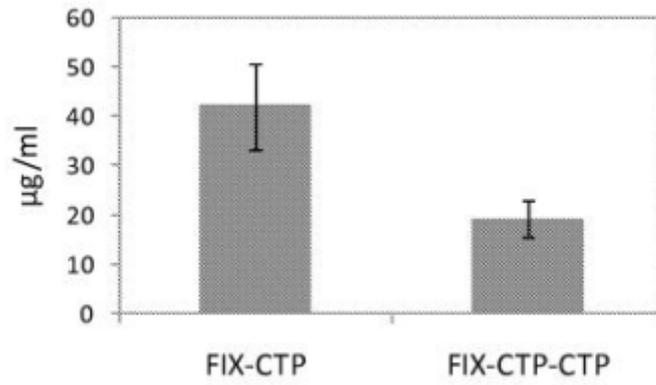
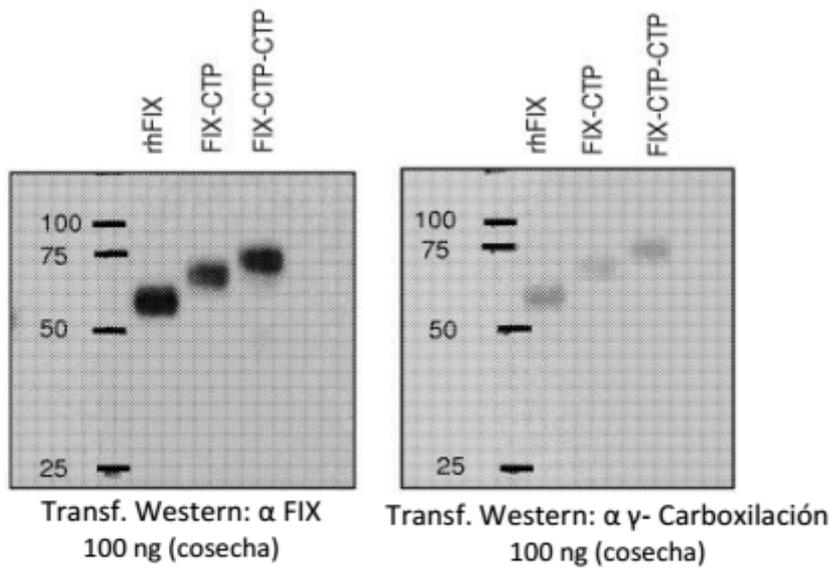


Figura 1A



Actividad cromogénica del Factor IX  
(cosechas)

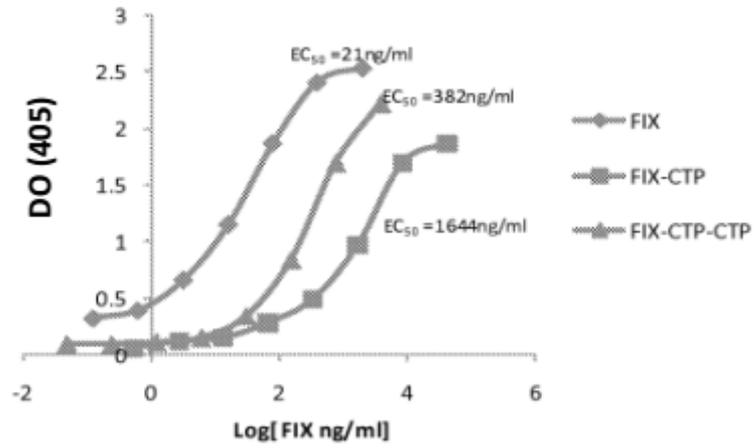
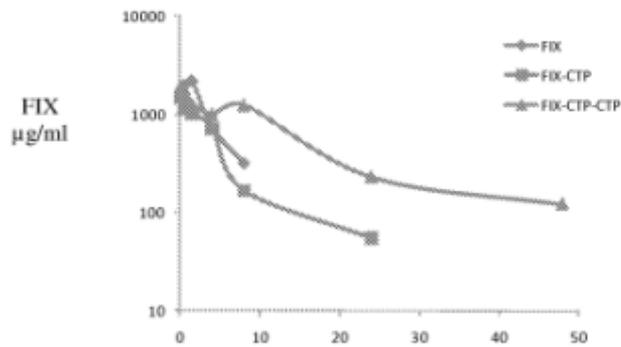


Figura 2

Perfil PK – FIX recombinante



Horas después de la dosificación  
Figura 3

Nivel del antígeno FIX

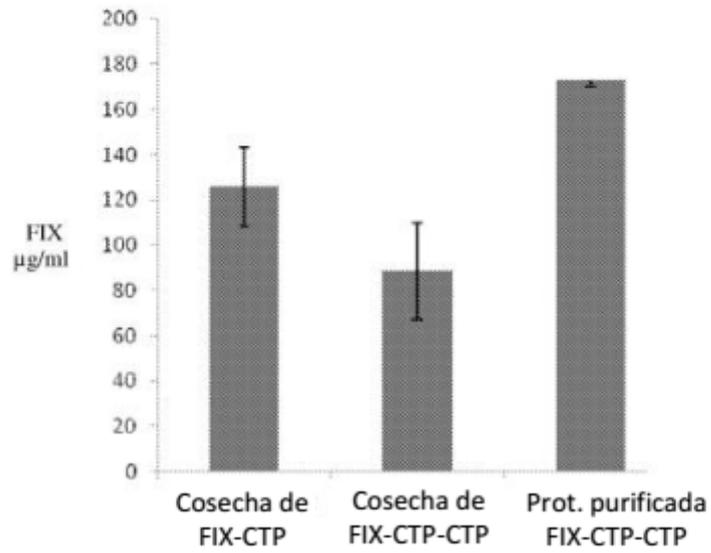
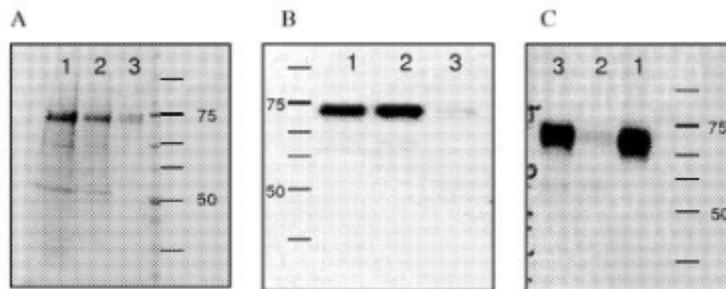


Figura 4



SDS-PAGE con Coomassie

Figura 5A

Transf. Western: anti FIX

1-Cosecha de FIX-(CTP)<sub>2</sub>  
 2-No unido  
 3-Elución conc. (MOD3012)

Figura 5B

Transf. Western: anti y carboxilación

Figura 5C

Actividad cromogénica del Factor IX

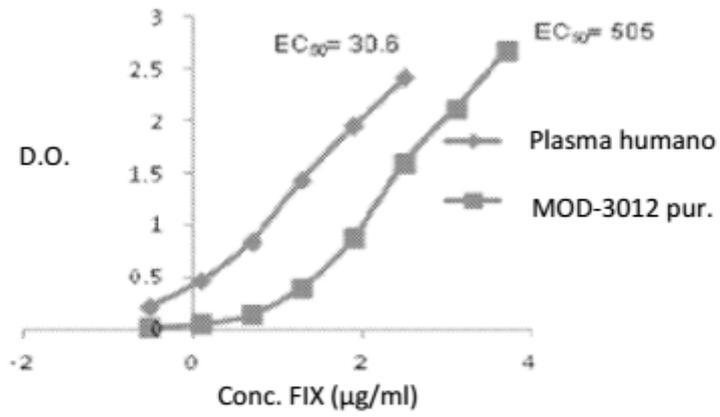


Figura 6

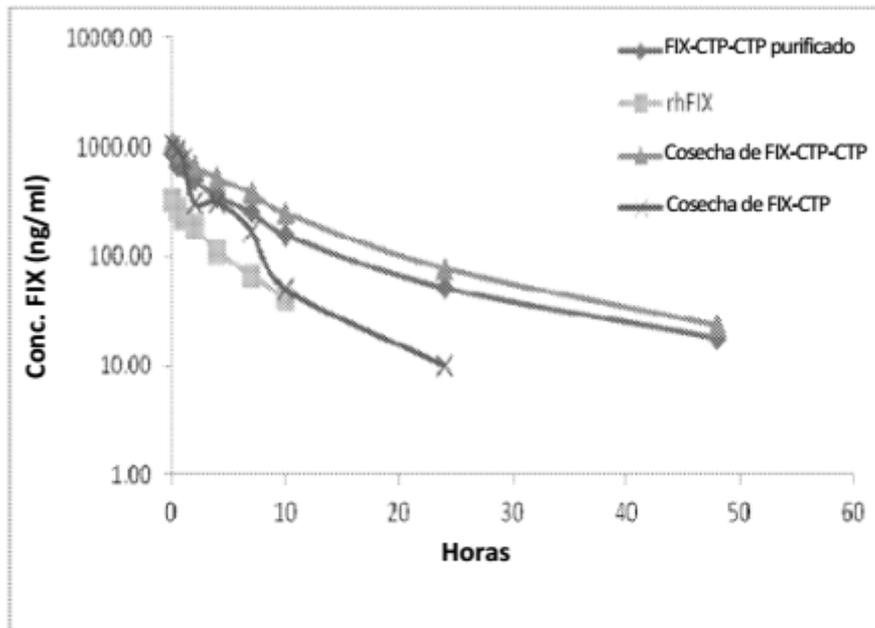


Figura 7

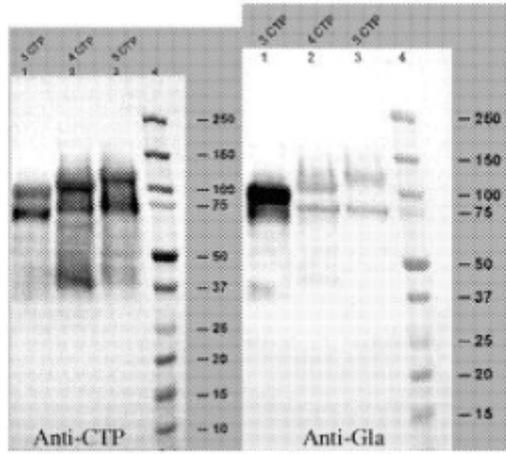


Figura 8A

Figura 8B

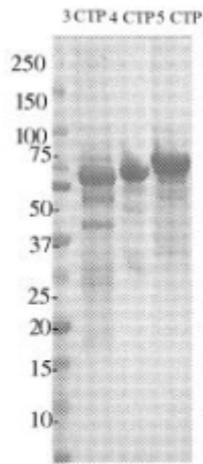


Figura 9

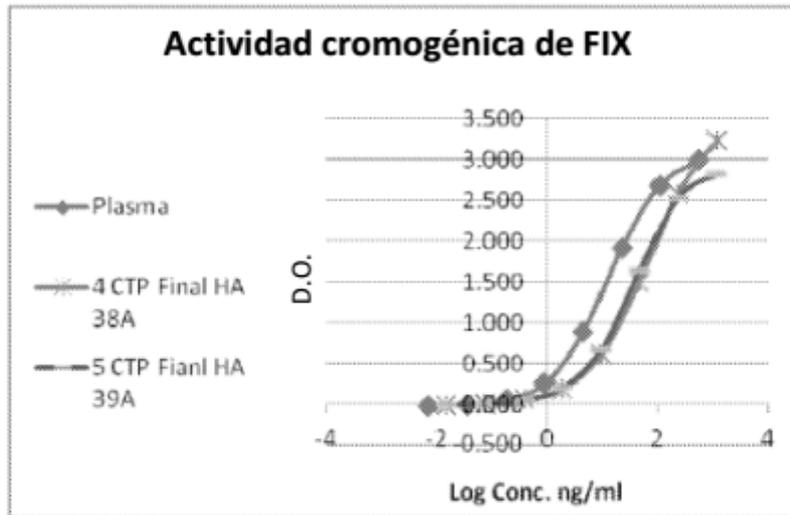


Figura 10

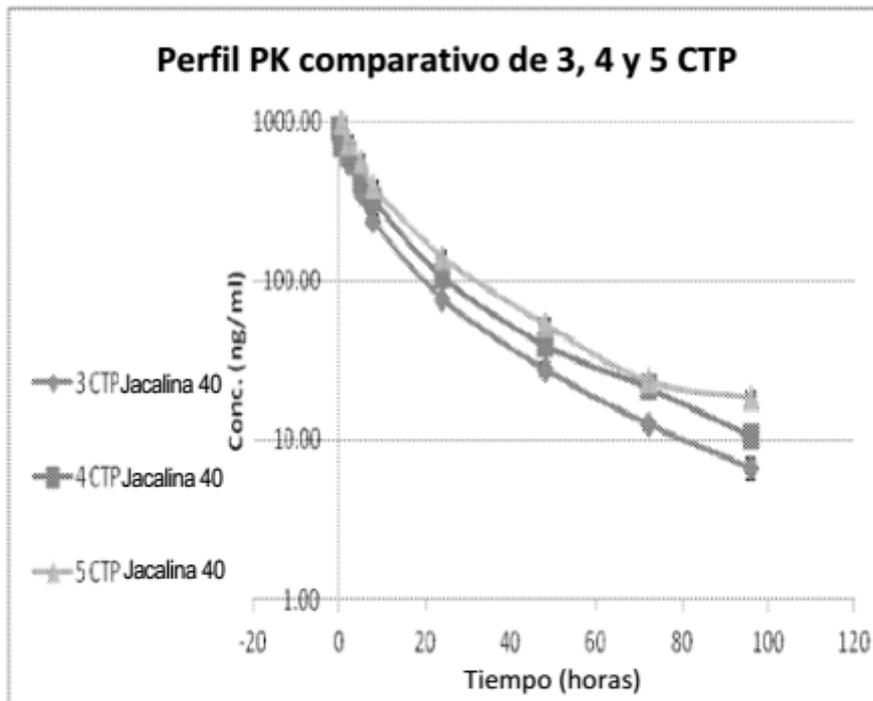


Figura 11

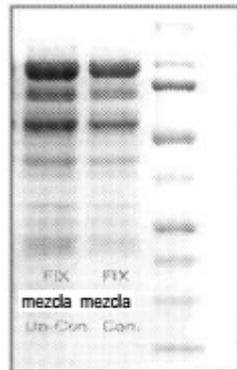


Figura 12A



Figura 12B

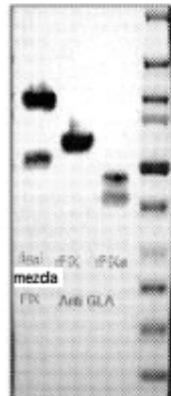


Figura 12C

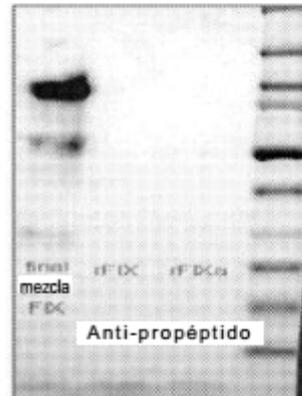


Figura 12D

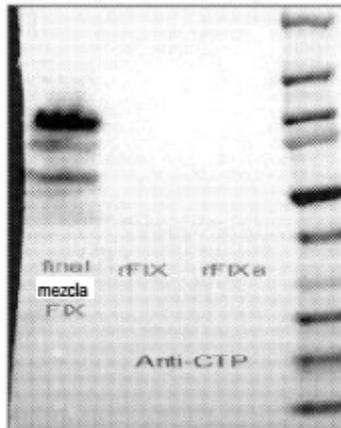


Figura 12E

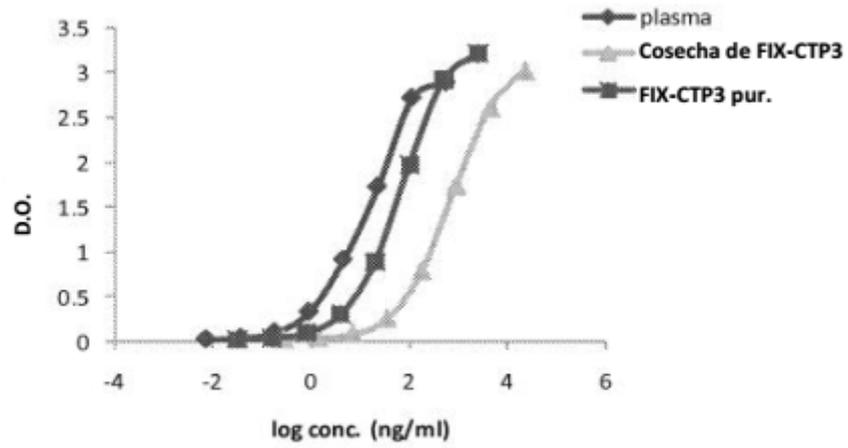


Figura 13

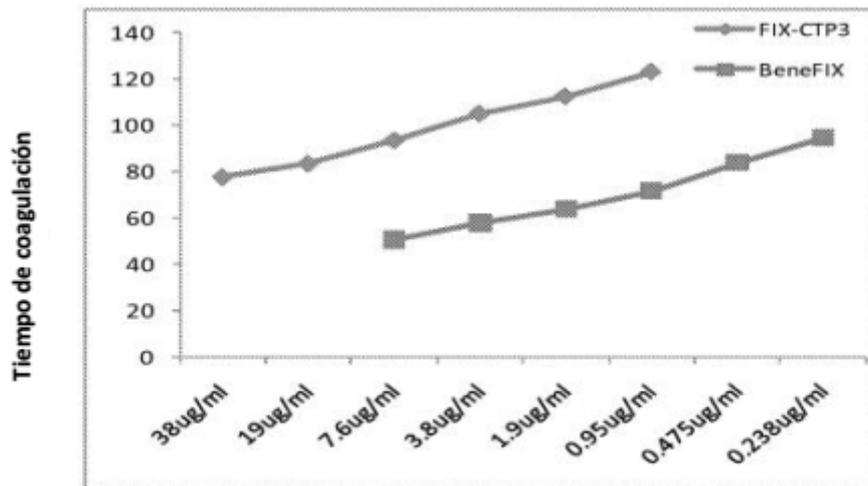


Figura 14

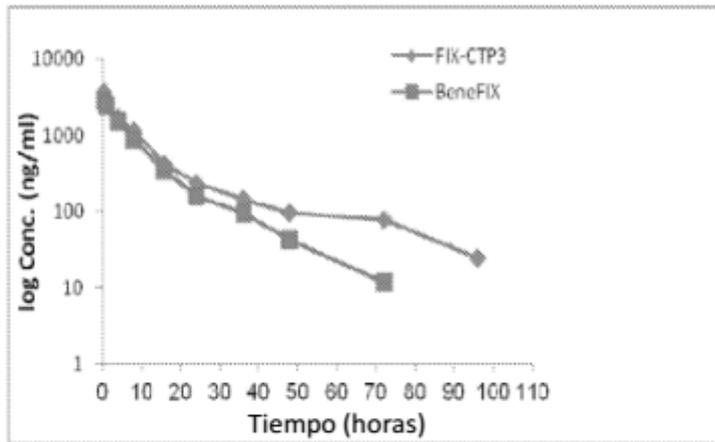


Figura 15

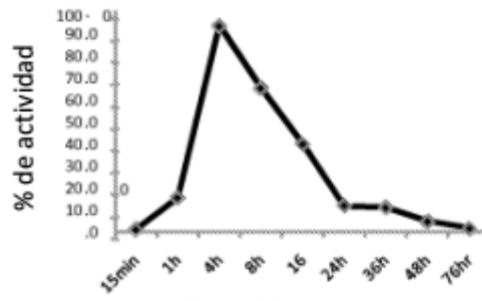


Figura 16A

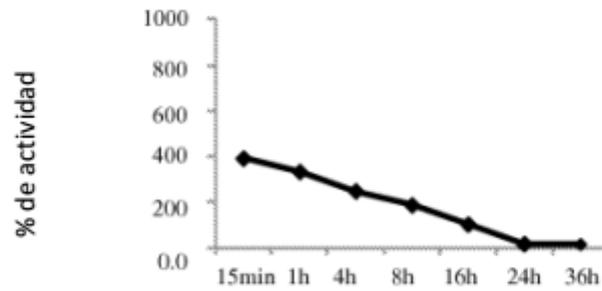


Figura 16B

**Primer reto de sangrado:  
Valor de DO de hemoglobina**

	FIX-CTP <sub>3</sub>	BeneFIX	FIXKO
#1	6.84	10.26	19.92
#2	0.72	10.14	13.32
#3	4.68	11.16	16.38
#4	NA	9.18	7.92
#5	7.86	7.77	9.72
#6	4.14	9.15	14.7

Figura 17A

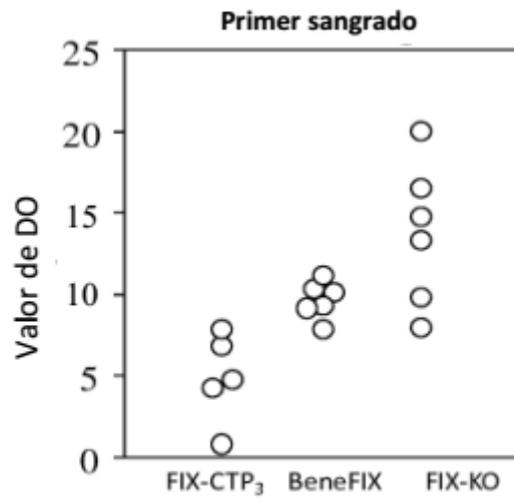


Figura 17B

Tiempo del primer sangrado (min)

	cohorte # 1	cohorte # 3	FIXKO
#1	10	10	10
#2	5.12	10	8.17
#3	10	10	10
#4		10	10
#5	10	7	10
#6	10	10	10

Figura 17C

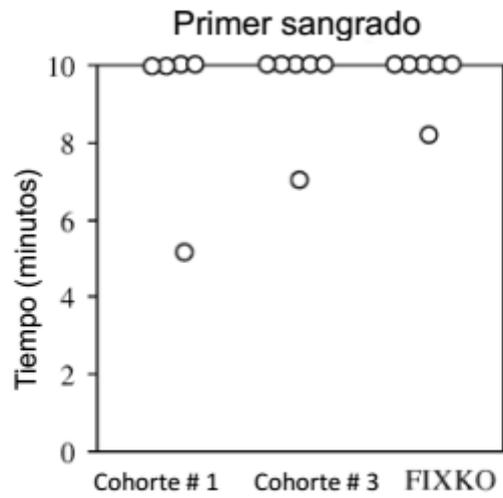


Figura 17D

Segundo sangrado: valor de DO

	FIX-CTP <sub>3</sub>	BeneFIX	FIXKO
#1	0.324	1.368	1.32
#2	0.358	0.516	0.43
#3	0.006	0.548	0.6
#4		0.027	1.26
#5	0.064	0.158	0.46
#6	0.045	0.992	0.384

Figura 18A

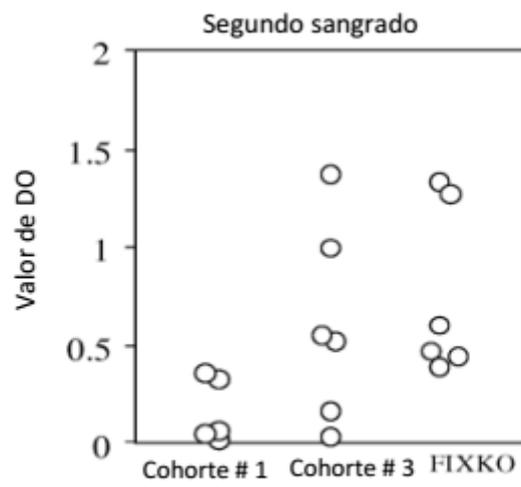


Figura 18B

Tiempo del segundo sangrado (min)

	Cohorte # 1	Cohorte # 3	FIXKO
#1	4.63	10	10
#2	2.5	10	8.7
#3	1.2	10	7.13
#4		5	10
#5	3.87	7.4	10
#6	1.83	10	6.5

Figura 18C

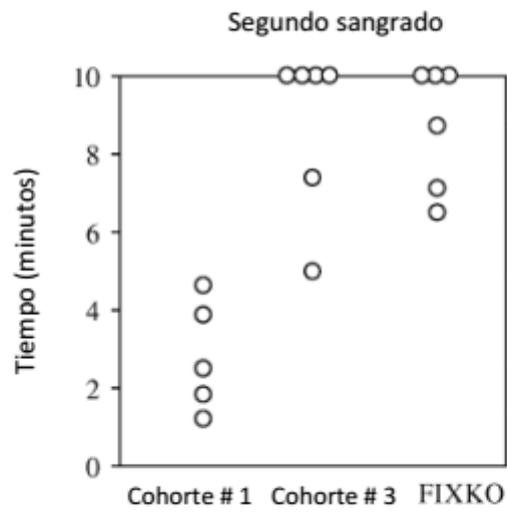


Figura 18D

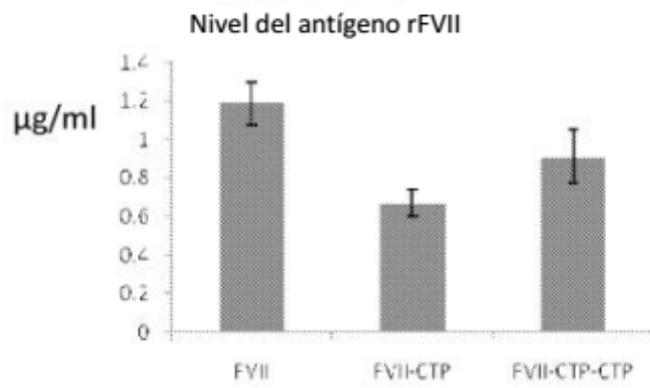
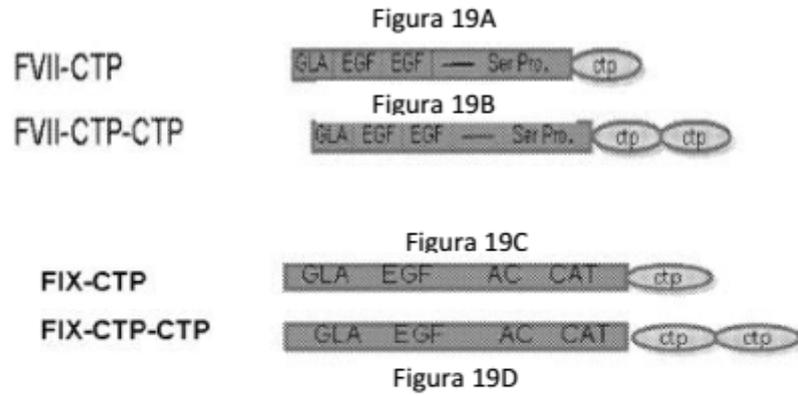


Figura 20A

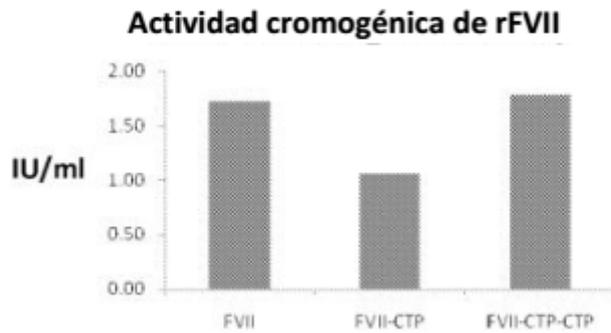


Figura 20B

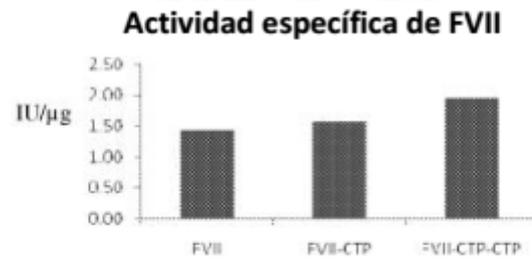


Figura 20C

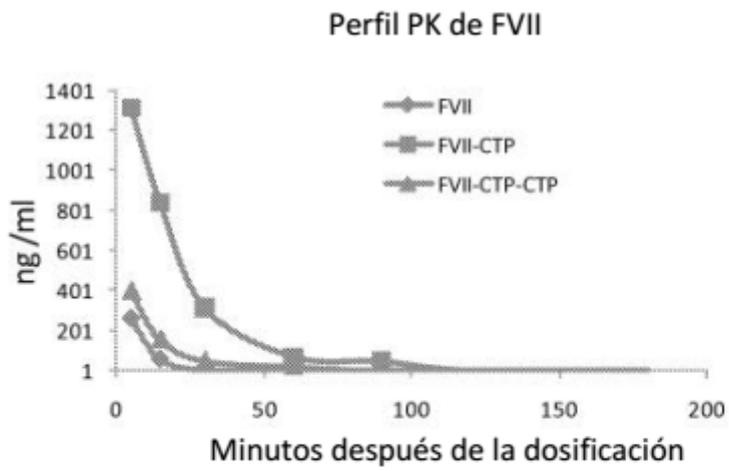


Figura 20D

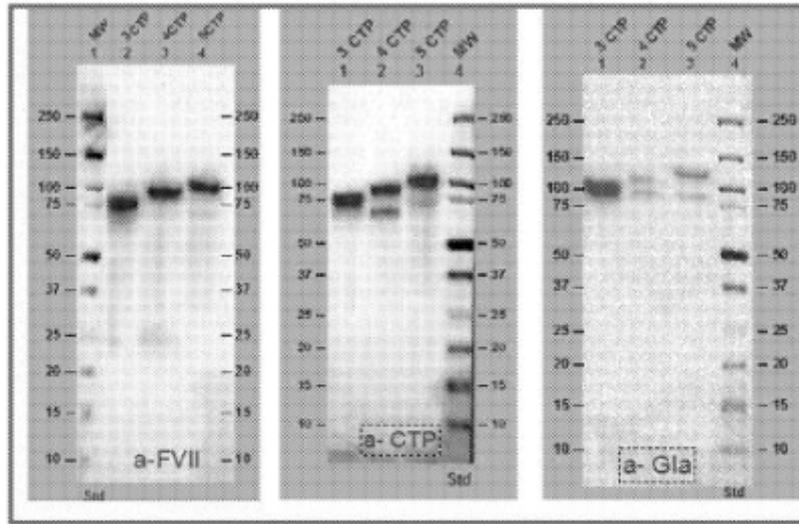


Figura 21A

Figura 21B

Figura 21C

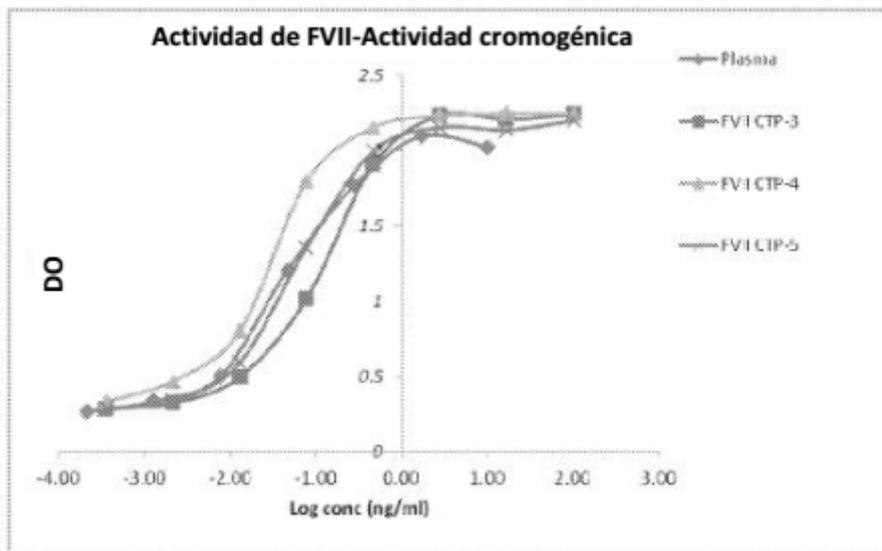


Figura 22

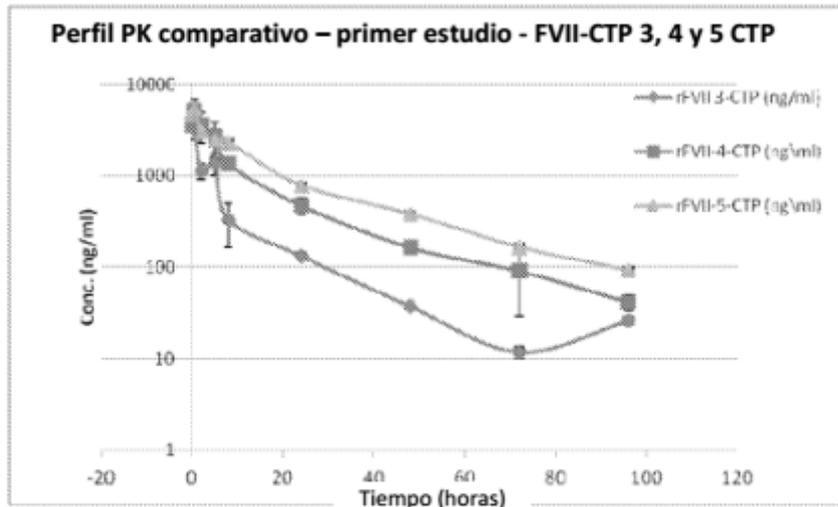


Figura 23

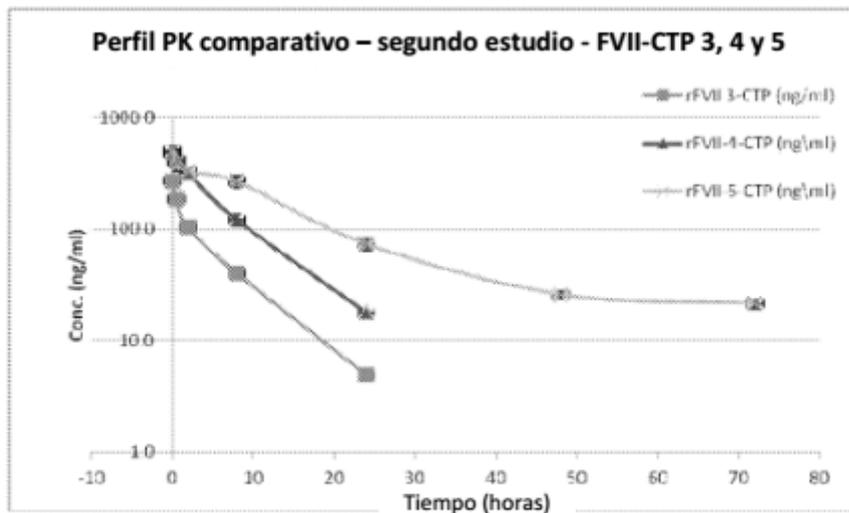


Figura 24

Figura 25A

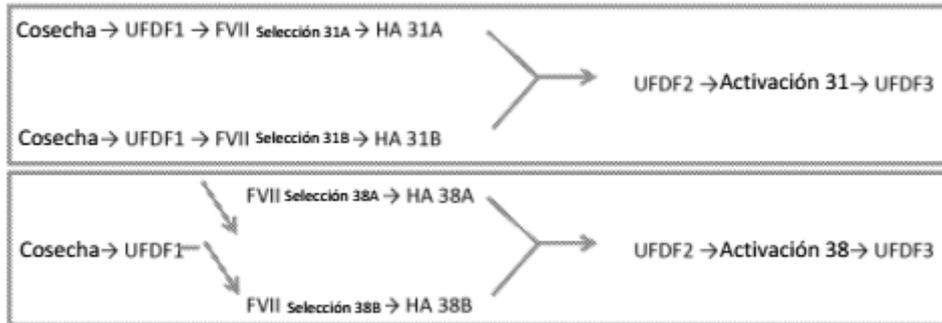


Figura 25B

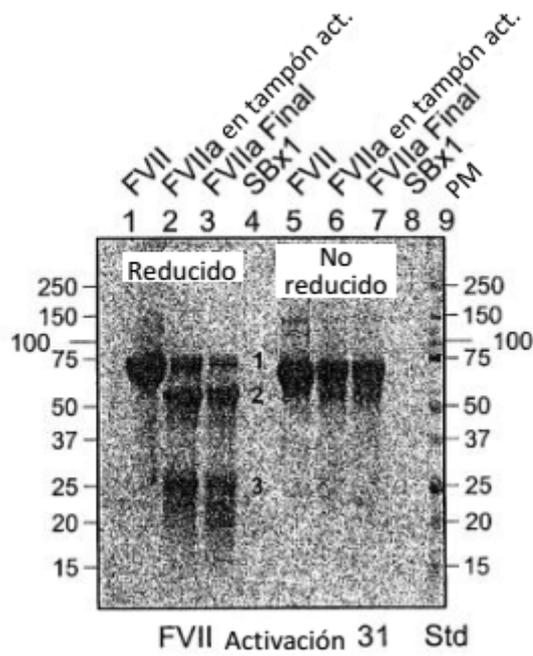


Figura 26A

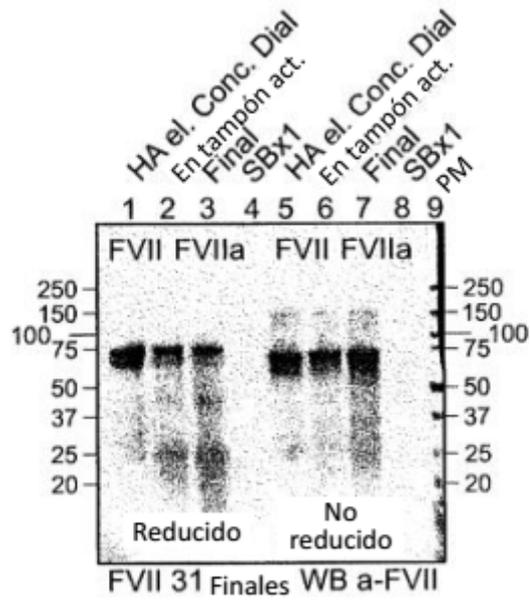


Figura 26B

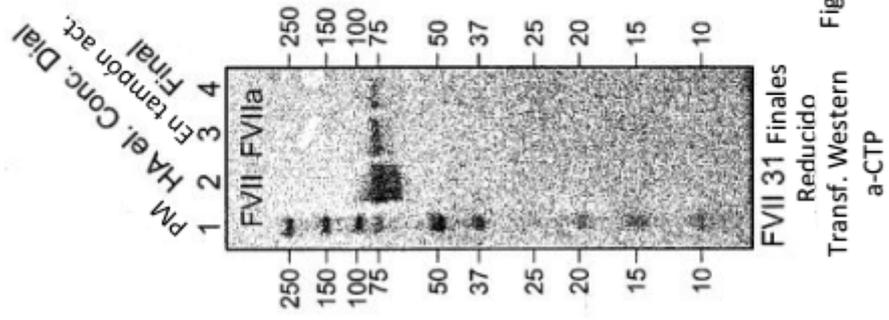


Figura 26D

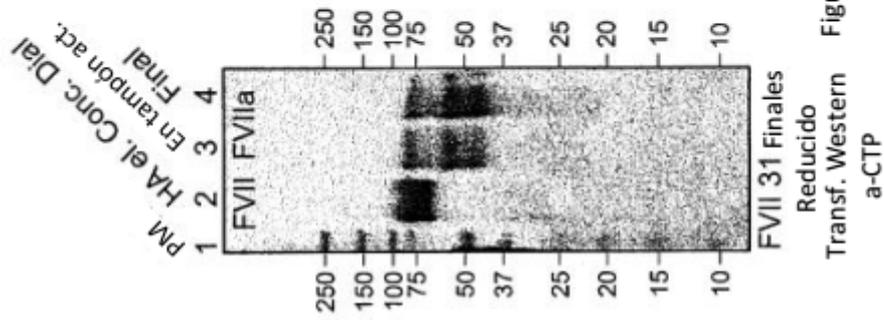


Figura 26C

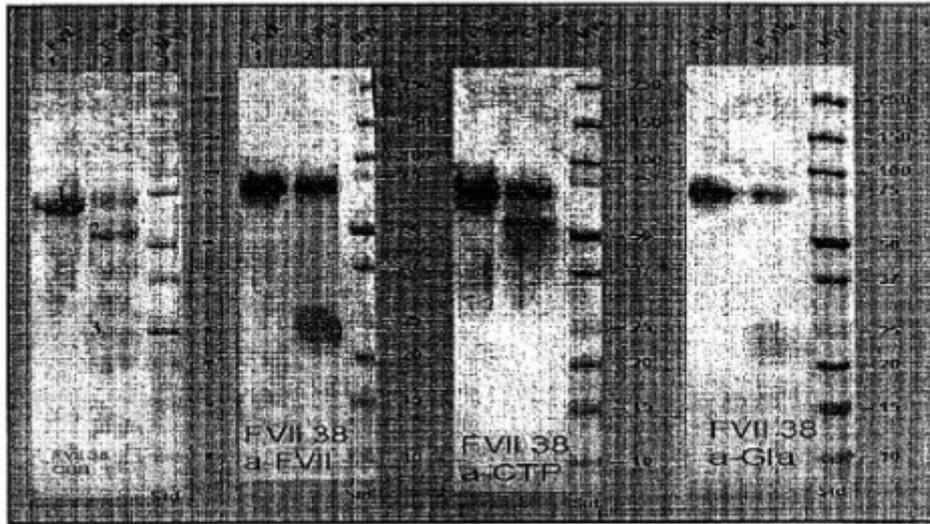


Figura 26E

Figura 26F

Figura 26G

Figura 26H

Figura 27

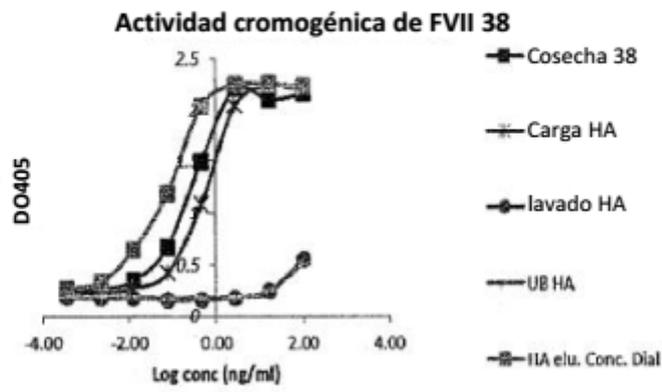


Figura 28

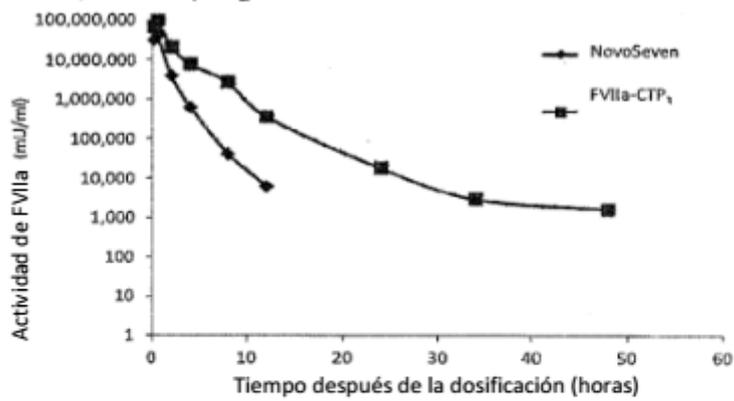


Figura 29A

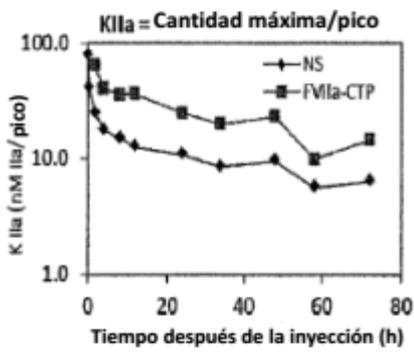
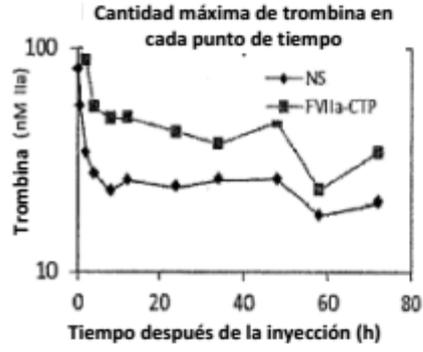


Figura 29B



Velocidad de generación de trombina (dY/dT)

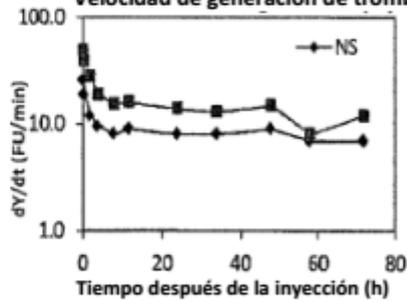


Figura 29C

Figura 30A

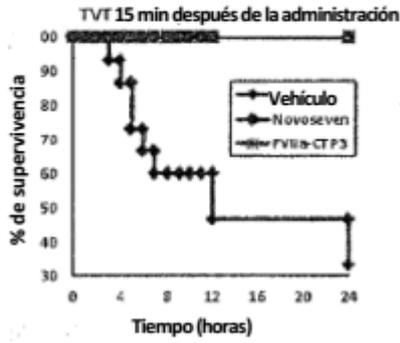


Figura 30B

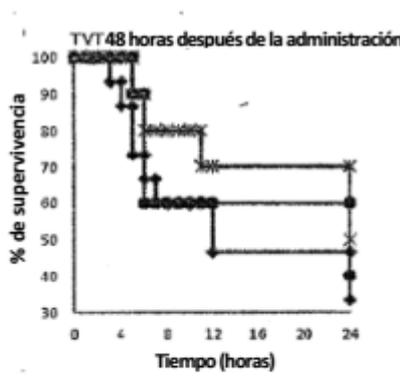


Figura 30C

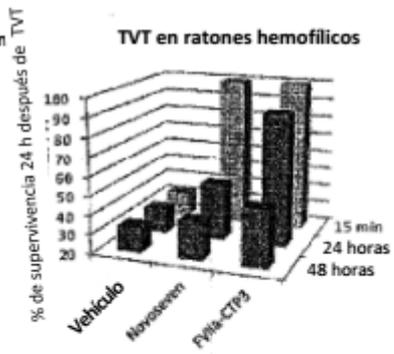


Figura 30D

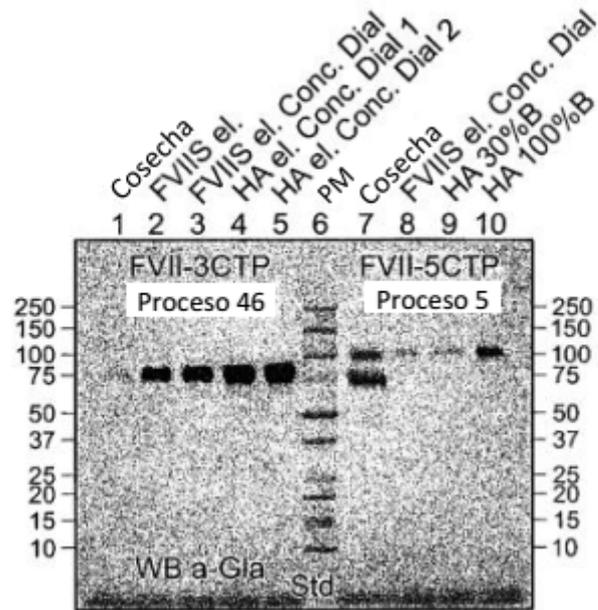


Figura 31A

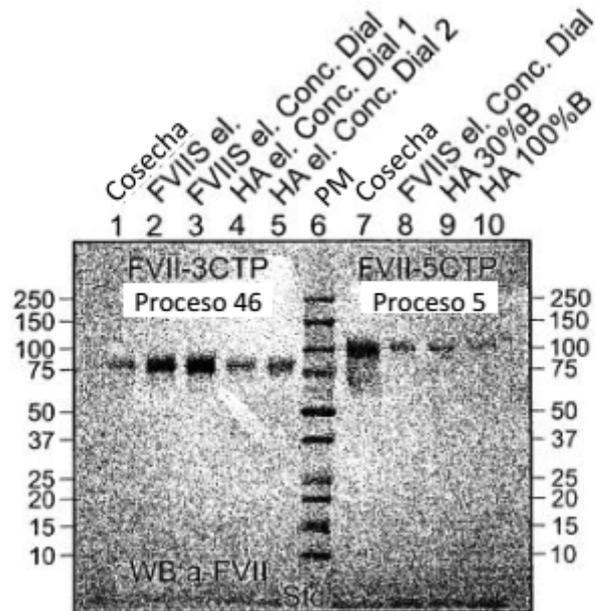


Figura 31B

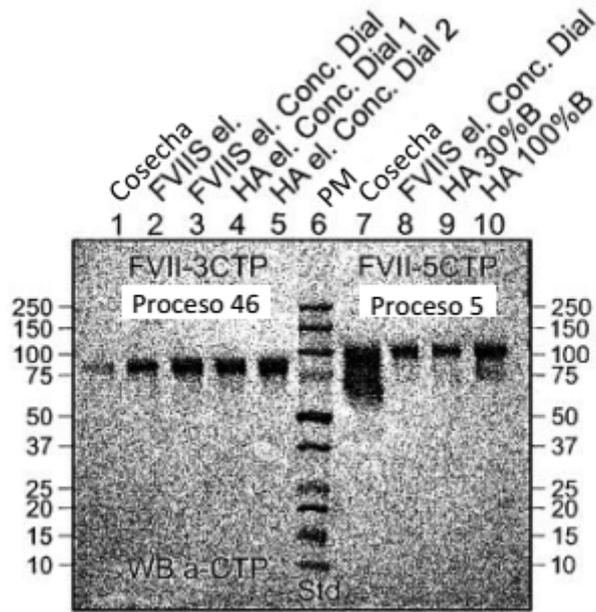


Figura 31C

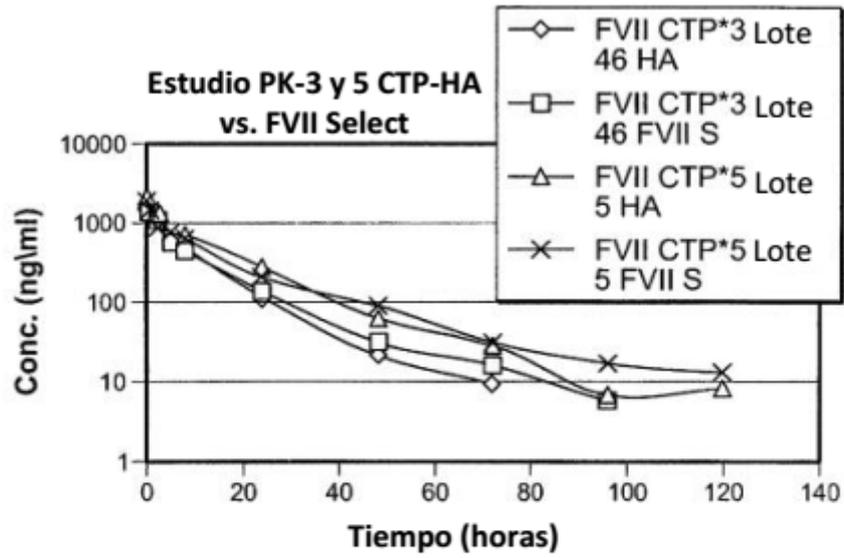


Figura 32

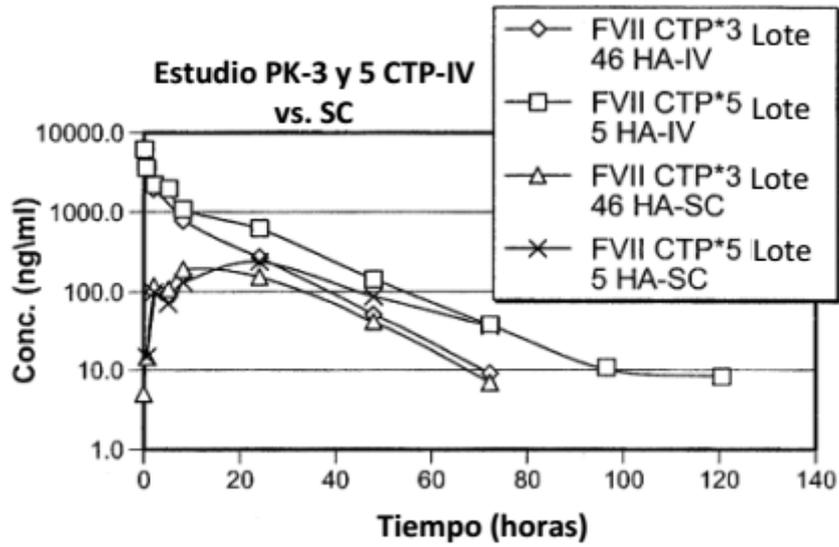


Figura 33

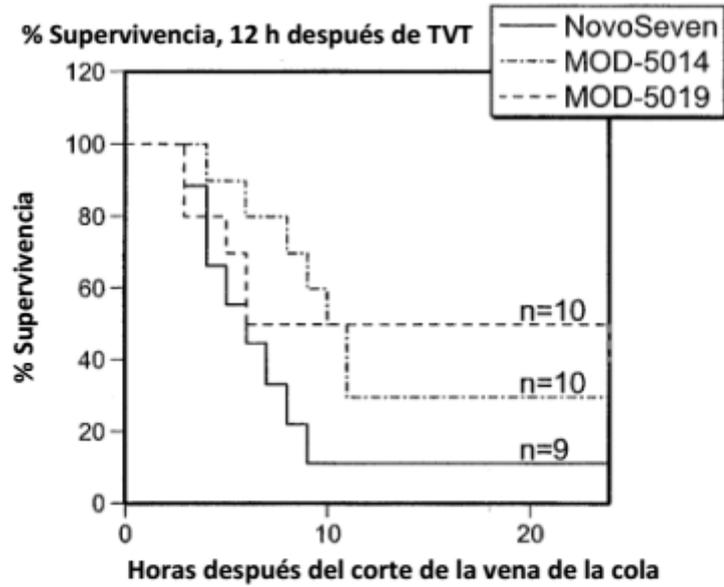


Figura 34

Figura 35A

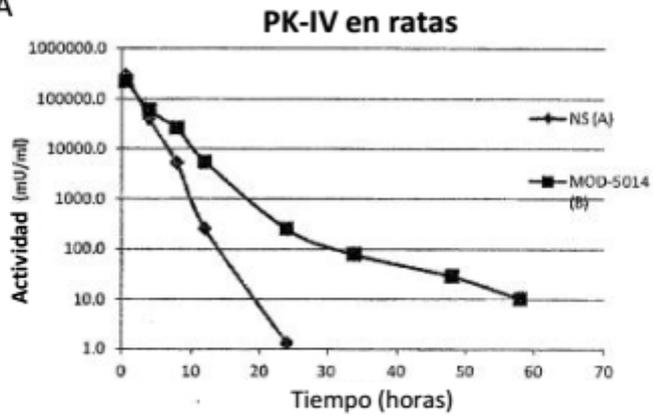
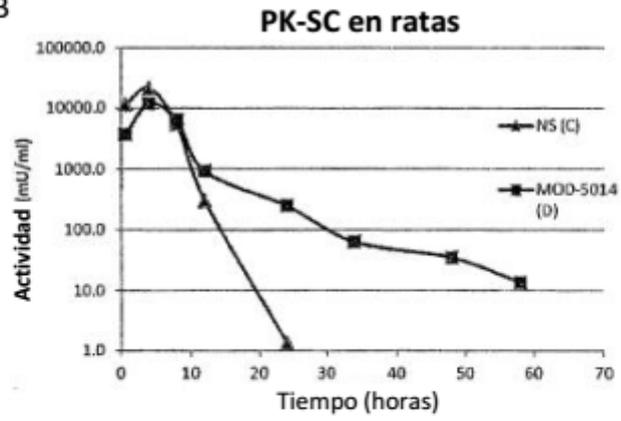


Figura 35B



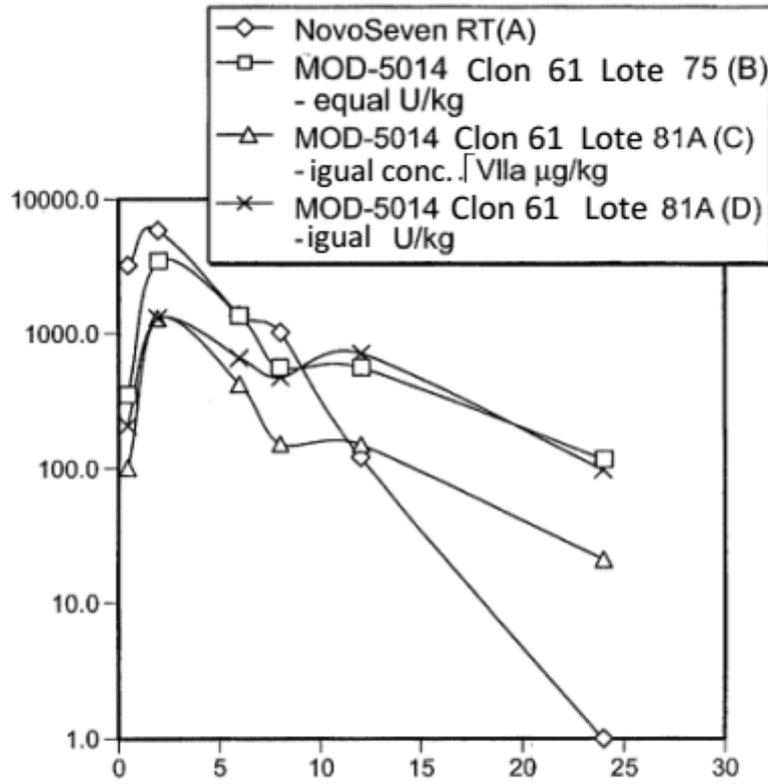


Figura 36