

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 503**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 47/42 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2011 PCT/US2011/043599**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12006635**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2011 E 11738539 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2591006**

54 Título: **Moléculas de cadena simple procesables y polipéptidos producidos usándolas**

30 Prioridad:

25.03.2011 US 201161467880 P

11.02.2011 US 201161442029 P

31.05.2011 US 201161491762 P

11.02.2011 US 201161442150 P

11.02.2011 US 201161442055 P

09.07.2010 US 363183 P

09.07.2010 US 363186 P

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

31.01.2020

73 Titular/es:

**BIOVERATIV THERAPEUTICS INC. (100.0%)
225 Second Avenue
Waltham MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**SALAS, JOE y
PETERS, ROBERT**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 739 503 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

Moléculas de cadena simple procesables y polipéptidos producidos usándolas

Antecedentes de la invención

5 La región Fc de una inmunoglobulina media funciones efectoras que se han dividido en dos categorías. En la primera están las funciones que se producen independientemente de la unión a antígeno; estas funciones confieren persistencia en la circulación y la capacidad de transferencia a través de barreras celulares mediante transcitosis (véase, Ward y Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94, 1995, Capon et al. *Nature* 1989). La semivida en la circulación de la subclase IgG de inmunoglobulinas se regula mediante la afinidad de la región Fc por el receptor Fc neonatal para FcRn (Ghetie et al. *Nature Biotechnol.* 15:637-640, 1997; Kim et al., *Eur. J. Immunol.* 24:542-548, 1994; Dall'Acqua et al. (*J. Immunol.* 169:5171-5180, 2002). La segunda categoría general de funciones efectoras incluye aquellas que operan después de que una inmunoglobulina se une a un antígeno. En el caso de IgG, estas funciones implican la participación de la cascada de complemento o células que portan el receptor Fc gamma (FcγR). La unión de la región Fc con un FcγR provoca ciertos efectos inmunitarios, por ejemplo, la endocitosis de complejos inmunitarios, engullición y destrucción de partículas o microorganismos recubiertos con inmunoglobulina (también denominada fagocitosis dependiente de anticuerpo, o ADCP), aclaramiento de complejos inmunitarios, lisis de células diana recubiertas con inmunoglobulina por parte de linfocitos citolíticos (denominada citotoxicidad mediada por células, dependiente de anticuerpo, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, regulación de la activación celular del sistema inmunitario y regulación de la producción de inmunoglobulina.

20 Aunque se pueden generar polipéptidos heterodiméricos que contienen Fc, los métodos actuales requieren la coexpresión de las dos porciones de cadena pesada de una región Fc heterodimérica o la conjugación química de la región Fc dimérica con uno o más sitios de unión (p. ej., un dominio Fab). La coexpresión de estas construcciones conduce a la producción de mezclas complejas que representan todos los apareamientos posibles del material de partida además de aglomerados y proteína inactiva. En consecuencia, los rendimientos del polipéptido funcional deseado son relativamente bajos. Recientemente, se desarrollaron moléculas Fc de cadena simple que superan muchos de estos problemas. Estas moléculas comprenden una región Fc de cadena simple en la que los restos Fc componentes están genéticamente fusionados en una cadena polipeptídica simple de manera que forman una región Fc dimérica funcional. Estos polipéptidos de cadena simple comprenden un enlazador que no está presente en construcciones Fc de origen natural y, por lo tanto, pueden crear respuestas inmunitarias indeseadas o pueden impedir otras interacciones proteína-proteína. Estas construcciones Fc de cadena simple pueden tener también estabilidad más baja posiblemente debido a las restricciones impuestas por el enlazador covalente.

Por consiguiente, existe la necesidad de polipéptidos heterodiméricos que contengan Fc, que se pueden producir de manera eficaz y robusta y que minimicen y preferiblemente no comprendan secuencias de aminoácidos extrañas.

Compendio de la invención

35 La presente invención presenta *inter alia* polipéptidos heterodiméricos que, en forma no procesada, comprenden una o más regiones Fc genéticamente fusionadas. En particular, las moléculas no procesadas de la invención comprenden una región Fc de cadena simple ("scFc", por sus siglas en inglés) en la que los restos Fc componentes están genéticamente fusionados en una cadena polipeptídica simple de manera que forman una región Fc dimérica, de cadena simple, funcional. Las moléculas Fc de cadena simple de la invención comprenden al menos dos restos Fc, F1 y F2, según se enumeran desde el extremo amínico al carboxílico en la cadena polipeptídica simple. Los restos Fc componentes de una scFc están genéticamente fusionados a través de un enlazador polipeptídico, un enlazador scFc escindible (cscFc, por sus siglas en inglés). El enlazador cscFc está intercalado entre los restos Fc que comprenden la región Fc. En un extremo, el enlazador cscFc que forma la región Fc de cadena simple está enlazado directamente a través de una unión peptídica a un sitio de escisión enzimática (P1) que está enlazado a (p. ej., adyacente a o directamente enlazado a) un resto Fc del polipéptido. En una realización, el sitio de escisión se escinde mediante una enzima de procesamiento intracelular. El otro extremo del enlazador cscFc está directamente enlazado con un segundo sitio de escisión enzimática (P2). En otra realización, el otro extremo del enlazador cscFc está enlazado con un resto biológicamente activo o un resto de direccionamiento.

50 En una realización, la escisión durante el procesamiento del polipéptido que contiene scFc mediante una célula permite la escisión y/o escisión sustancial del enlazador. Alternativamente, el polipéptido comprende un enlazador scFc escindible (cscFc) que se puede escindir después de que una célula ha secretado el polipéptido o después de que se ha administrado a un sujeto. Por lo tanto, aunque los polipéptidos de la invención comprenden una región(es) scFc en una secuencia polipeptídica contigua en su forma no procesada, el enlazador cscFc se escinde enzimáticamente (p. ej., durante el procesamiento en una célula, in vitro antes de la administración o in vivo después de la administración), y resulta en un polipéptido procesado que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas y comprende una región Fc que no está fusionada en una cadena aminoácida simple.

Los polipéptidos heterodiméricos de la invención tienen capacidad de fabricación mejorada en comparación con los polipéptidos que contienen Fc heteroméricos convencionales debido a que se evita la mezcla compleja de moléculas que resulta de la coexpresión de dos o más cadenas. Además, la extracción sustancial de la secuencia enlazadora

- 5 extraña reduce el riesgo de inmunogenicidad. Esto es de particular importancia en el caso de polipéptidos que se administrar de forma repetida a un sujeto, p. ej., como en el caso de los componentes de la cascada de coagulación. La extracción sustancial de la secuencia enlazadora extraña también puede aliviar cualquier estrés estérico o impedimento que estaba presente en la forma enlazada covalentemente. Además, la escisión del enlazador cscFc permite que los restos biológicamente activos fusionados al extremo amínico de cada resto Fc tengan un extremo N libre. Esto es particularmente valioso en el caso de los restos biológicamente activos acoplados al segundo resto Fc tales como dominios serina proteasa que requieren un extremo N libre para ser catalíticamente activos o restos que podrían estar estéricamente impedidos en presencia de un enlazador polipeptídico no escindido.
- 10 En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido, que comprenden (i) al menos un resto biológicamente activo, (ii) una región Fc que comprende al menos dos restos Fc y (iii) un enlazador scFc escindible (cscFc) intercalado entre los dos restos Fc, en donde el enlazador cscFc está flanqueado por un sitio de escisión enzimática antes y después del enlazador cscFc, que resulta en la escisión del enlazador cscFc.
- 15 En una realización, al menos un resto biológicamente activo comprende un factor de coagulación.
- En una realización, el factor de coagulación se selecciona del grupo que consiste en FVII, FVIIa, FVIII, FIX, FIXa, FX y FXa.
- 20 En una realización, el polipéptido comprende los restos A-F1-P1-L-P2-B-F2 en donde A es un resto biológicamente activo, F1 es un primer resto o dominio Fc, P1 es un sitio de escisión enzimática, L es un enlazador cscFc, P2 es un sitio de escisión enzimática, B es un resto biológicamente activo, F2 es un segundo resto o dominio Fc y "-" representa una unión peptídica. La fórmula (I) comprende menos un A o B y opcionalmente ambos. A y B, si ambos están presentes, pueden ser iguales o diferentes. La fórmula (I) comprende P1 y P2. P1 y P2 pueden ser iguales o diferentes. La fórmula (I) comprende al menos F1 y F2. F1 y F2 pueden ser iguales o diferentes. En una realización, F1 y F2 pueden comprender un dominio CH2 y uno CH3. En una realización, A y/o B están enlazados directamente con F1 o F2. En otra realización, A y/o B están enlazados con F1 o F2 a través de un resto espaciador.
- 25 En una realización, A está presente y se selecciona del grupo que consiste en: una porción de unión a antígeno de un anticuerpo; una molécula de unión distinta de inmunoglobulina, una porción de unión de un ligando, y una porción de unión de un receptor, y un factor de coagulación.
- En una realización, A comprende la cadena ligera de un factor de coagulación y B comprende la cadena pesada de un factor de coagulación que cuando se asocian forman una molécula activa.
- 30 En una realización, B está presente y se selecciona del grupo que consiste en: una porción de unión a antígeno de un anticuerpo; una molécula de unión distinta de inmunoglobulina, una porción de unión de un ligando, una porción de unión de un receptor, y un factor de coagulación.
- En una realización, F1 y F2 pueden comprender un dominio CH2 y uno CH3.
- 35 En una realización, el polipéptido comprende los restos A-F1-B-P1-L-P2-F2 o A-F1- -P1-L-P2 B-F2 en secuencia lineal desde el extremo amínico al carboxílico.
- En una realización, el polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula seleccionada del grupo que consiste en: A-F1-P1- L-P2-F2; F1-P1- L-P2-B-F2; y A-F1-P1-L-P2-B-F2 en secuencia lineal desde el extremo amínico al carboxílico.
- 40 En una realización, el polipéptido comprende un resto biológicamente activo. En una realización, dos restos biológicamente activos, p. ej., A y B de fórmula I, están ambos presentes y son restos biológicamente activos diferentes.
- 45 En una realización, P1 y P2 están ambos presentes y son reconocidos por la misma o por enzimas diferentes. En una realización, al menos uno de P1 o P2 comprende la secuencia de aminoácidos Arg-Arg-Arg-Arg. En una realización, al menos uno de P1 o P2 comprende la secuencia de aminoácidos Arg-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg. En una realización, al menos uno de P1 o P2 comprende la secuencia de aminoácidos Arg-Arg-Arg-Arg-Ser. En una realización, P1 y P2 están ambos presentes y P1 comprende la secuencia Arg-Arg-Arg-Arg y P2 comprende la secuencia Arg-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg. En una realización, al menos uno de P1 o P2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: TQSFNDFTR y SVSQTSKLTR, DFLAEGGGVR, TTKIKPR, LVPRG y ALRPR.
- 50 En una realización, el enlazador cscFc tiene una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 aminoácidos. En una realización, el enlazador cscFc tiene una longitud de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 aminoácidos.
- En una realización, el enlazador cscFc comprende un péptido gly/ser. En una realización, el péptido gly/ser es de fórmula (Gly₄Ser)_n o S(Gly₄Ser)_n, en donde n es un número entero positivo seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

En una realización, el enlazador S(Gly₄ Ser)_n es S(Gly₄ Ser)₆ o S(Gly₄ Ser)₄.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un polipéptido que comprende dos cadenas polipeptídicas, en donde la primera cadena polipeptídica comprende una cadena ligera de un factor de coagulación enlazada con un primer resto Fc y una segunda cadena polipeptídica comprende una cadena pesada de un factor de coagulación enlazada con un segundo resto Fc, en donde la en donde la cadena ligera y la cadena pesada se asocian para formar un factor de coagulación enzimáticamente activo

5

En una realización, la cadena ligera del factor de coagulación se enlaza con el primer resto Fc y la cadena pesada del factor de coagulación se enlaza con el segundo resto Fc y en donde el factor de coagulación es enzimáticamente activo después de la secreción por una célula.

10

En una realización, en donde el factor de coagulación se selecciona del grupo que consiste en FVII, FVIIa, FIX, FIXa, FX y FXa. En otra realización, al menos un resto biológicamente activo es el factor VII, factor VIIa o una porción de estos. En una realización, al menos un resto biológicamente activo es el factor IX, factor IXa o una porción de estos. En una realización, al menos un resto biológicamente activo es el factor VIII, factor VIIIa o una porción de estos. En una realización, al menos un resto biológicamente activo es el factor X, factor Xa o una porción de estos.

15

En una realización, un polipéptido de la invención comprende un resto de direccionamiento.

En una realización, el resto de direccionamiento se une a plaquetas en reposo.

En una realización, el resto de direccionamiento se une selectivamente a plaquetas activadas.

En una realización, el resto de direccionamiento se une selectivamente a una diana seleccionada del grupo que consiste en: GPIIb, GPVI y la forma no activa de GPIIb/IIIa.

20

En una realización, en donde el resto de direccionamiento se une selectivamente a una diana seleccionada del grupo que consiste en: la forma activa de GPIIb/IIIa, P selectina, GMP-33, LAMP-1, LAMP-2, CD40L y LOX-1.

En una realización, el resto de direccionamiento se une al complejo GPIb.

En una realización, comprende un resto de direccionamiento, en donde el resto de direccionamiento es un péptido seleccionado del grupo que consiste en: PS4, OS1 y OS2.

25

En una realización, el resto de direccionamiento comprende una región variable de anticuerpo de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: SCE5, MB9 y AP3.

En una realización, A es la cadena ligera de FVII y B es la cadena pesada de FVII.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido de la invención

En una realización, una composición de la invención comprende un sobrenadante de cultivo celular.

30

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención. Los ejemplos de dichas moléculas de ácido nucleico se describen en los presentes Ejemplos y se establecen en el listado de secuencias.

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, y al polipéptido codificado por esta, en donde el polipéptido que comprenden (i) al menos un resto biológicamente activo, (ii) una región Fc que comprende al menos dos restos Fc y (iii) un enlazador scFc escindible intercalado entre los dos restos Fc, en donde el enlazador scFc escindible está flanqueado por un sitio de escisión enzimática antes y después del enlazador cscFc, que enlaza los restos Fc de la región Fc y causa la escisión en estos dos sitios, lo que resulta en la extracción sustancial del enlazador cscFc.

35

40

En una instancia, la descripción se refiere a un polipéptido heterodimérico que comprende dos cadenas de aminoácidos cuyo polipéptido es codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención.

En otra realización, la invención se refiere a un polipéptido heterodimérico, en donde dicho polipéptido heterodimérico se produce al expresar el vector que contiene una molécula nucleica de la invención en una célula cultivada en medio de cultivo celular y aislar el polipéptido del medio de cultivo. En una instancia, el polipéptido es un polipéptido procesado que comprende al menos dos cadenas de aminoácidos.

45

En una realización, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico de la invención que está presente en un vector.

En una realización, el vector comprende, además, una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que escinde al menos uno de los sitios de procesamiento intracelular.

En una realización, la invención se refiere a una célula hospedante que comprende el vector de la invención, en donde la célula hospedante expresa una enzima que escinde el enlazador polipeptídico.

En una realización, la enzima es endógena con respecto a la célula. En otra realización, la enzima es exógena con respecto a la célula.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir un polipéptido que comprende cultivar la célula hospedante de la invención en cultivo de manera que se produzca el polipéptido maduro que comprende dos cadenas de aminoácidos.

10 En un aspecto, la descripción se refiere a un polipéptido heterodimérico procesado que comprende dos cadenas polipeptídicas, en donde dicho polipéptido heterodimérico procesado se produce al expresar el vector de la invención en una célula cultivada en medio de cultivo celular y aislar el polipéptido heterodimérico procesado del medio de cultivo.

En una instancia, la descripción se refiere a una composición que comprende un polipéptido procesado de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 En otra instancia, la descripción se refiere a una composición que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención un portador farmacéuticamente aceptable.

En una instancia, la descripción se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar una composición de la descripción a un sujeto.

En una instancia, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en un trastorno de la coagulación, un trastorno neurológico, un trastorno inflamatorio, un trastorno autoinmunitario y un trastorno neoplásico.

20 En otra instancia, la enfermedad o trastorno es un trastorno que afecta la hemostasia. En otra instancia, la composición promueve la formación de coágulos.

25 En un aspecto, la descripción se dirige a un polipéptido, en donde el polipéptido comprende (i) al menos un resto biológicamente activo, (ii) una región Fc codificada en una secuencia genética contigua simple, y (iii) un resto enlazador scFc, en donde el resto enlazador scFc comprende al menos un sitio de procesamiento intracelular o sitio de escisión enzimática que resulta en la escisión y extracción sustancial del enlazador scFc.

30 En otro aspecto, la descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, en donde el polipéptido comprende (i) al menos un resto biológicamente activo, (ii) una región Fc codificada en una secuencia genética contigua simple, y (iii) un resto enlazador scFc, en donde el resto enlazador scFc comprende al menos un sitio de procesamiento intracelular o sitio de escisión enzimática que resulta en la escisión y extracción sustancial del enlazador scFc.

En otra instancia, la descripción se refiere a un polipéptido heterodimérico maduro que comprende dos cadenas polipeptídicas, en donde dicho polipéptido heterodimérico maduro se produce al expresar el vector que contiene una molécula nucleica de la invención en una célula cultivada en medio de cultivo celular y aislar el polipéptido heterodimérico maduro del medio de cultivo.

35 La presente invención y las realizaciones de esta se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y B son ilustraciones de construcciones ilustrativas de la invención con sitios de procesamiento por proteasa antes y después de un enlazador polipeptídico que enlaza los restos Fc.

40 La Figura 2 ilustra un heterodímero Fc de Factor VIIa en el que el Fc de cadena ligera y el Fc de cadena pesada de FVII se expresan como una cadena simple y se secretan como un dímero de proteína activada después del procesamiento del enlazador mediante proteasas. La figura incluye una transferencia Western de una precipitación de proteína A de células transfectadas transitoriamente con FVII-024 +/- PC5

45 La Figura 3A ilustra la escisión por propéptido convertasa de sitios de procesamiento en proteínas FIX-Fc para la extracción de un enlazador polipeptídico que conecta ambos restos Fc en un cscFc. La Figura 3B ilustra que la escisión total de los sitios de procesamiento en FIX-044 se logró con PACE, pero no Kex2, PC5 ni PC7, sin embargo, la escisión por PACE resulta en una escisión extra de la proteína (véase la banda más adelante B,D). La Figura 3, panel C, ilustra que el procesamiento óptimo mediante PC5 se observó con los enlazadores escindibles incorporados en FIX-052 y -053.

50 La Figura 4, panel A, muestra un esquema que ilustra una molécula de scFc escindible por FVIII y la forma procesada de la molécula. La Figura 4, panel B muestra un gel SDS-PAGE de la proteína FVIII-049 purificada (después de la cotransfección con PC5) que demuestra el procesamiento completo de la molécula.

La Figura 5, panel A, muestra un esquema que ilustra la construcción de scFc escindible por FVIII (FVII-064) y la forma procesada de la molécula. En esta construcción, el resto biológicamente activo comprende FVII como una cadena simple. La Figura 5, panel B muestra un gel SDS-PAGE de la proteína FVII-064 purificada (después de la cotransfección con PC5) que demuestra el procesamiento completo de la molécula.

- 5 La Figura 6, panel A, ilustra la construcción FVIIc -027, que comprende una fusión FVII cscFc con un resto de direccionamiento, MB9. La Figura 6, panel B muestra un gel SDS-PAGE de la proteína FVII-027 purificada (después de la cotransfección con PC5) que demuestra el procesamiento completo de la molécula.

La Figura 7 ilustra varias construcciones adicionales que se produjeron en las que las cadenas pesada y ligera de FVII se expresaban por separado o como una cadena simple.

- 10 La Figura 8 ilustra el análisis de transferencia Western de especies de FVIIc después de la transfección transitoria de células HEK 293 y la precipitación de proteína A de las moléculas ilustradas en la Figura 7.

- La Figura 9 ilustra una construcción de scFc heterodimérica y una construcción de Fc monomérica. Se produjeron estas construcciones y se llevaron a cabo transferencias Western. Los datos muestran que la activación intracelular es más eficaz en el contexto del heterodímero (FVII-024) que el monómero (FVII-025), y requerían la cotransfección de PC5 para el procesamiento completo. Estos datos de FVII-024 son los mismos que se muestran en la Figura 2, pero muestran una comparación directa entre FVII-024 y FVII-025.
- 15

La Figura 10 muestra una molécula de scFc que comprende IFN-β como el resto biológicamente activo. La Figura también muestra una transferencia Western que ilustra la escisión parcial del enlazador procesable en ausencia de cotransfección de PC5, pero la escisión completa con la cotransfección.

- 20 La Figura 11 muestra el análisis de transferencia Western (Fc Western) de especies de FVIIc después de la transfección transitoria de células HEK 293 y la precipitación de proteína A.

Descripción detallada de la invención

- La presente descripción hace avanzar a la técnica al proporcionar moléculas, p. ej., moléculas de ácido nucleico y polipéptido, que comprenden (i) al menos un resto biológicamente activo (p. ej., un sitio de unión a antígeno sitio o dominio de unión, porción de unión a receptor de un ligando, porción de unión a un receptor, o resto que modula la coagulación) y (ii) al menos una región Fc (es decir, región Fc de cadena simple ("scFc")) que comprende un enlazador scFc escindible (cscFc). Sin embargo, a diferencia de los enlazadores scFc de la técnica anterior, las moléculas scFc, los enlazadores cscFc de la presente descripción que enlazan los restos Fc que forman la región scFc están adyacentes a al menos un sitio de escisión enzimática (p. ej., que se puede escindir mediante una enzima de procesamiento intracelular), que resulta en una molécula dimérica que comprende una región Fc de dos cadenas en la que el enlazador scFc se escinde o extrae sustancialmente. Esta etapa de escisión se puede producir antes de que el polipéptido sea secretado por una célula, antes de la administración a un sujeto, o in vivo después de la administración.
- 25
- 30

En una realización, el polipéptido se representa mediante la fórmula:

- 35 A-F1-P1- L-P2-B-F2 (I)

- en secuencia lineal desde el extremo amínico al carboxílico en donde A es un resto biológicamente activo, F1 es un primer resto o dominio Fc, P1 es un sitio de escisión enzimática, L es un enlazador cscFc, P2 es un sitio de escisión enzimática, B es un resto biológicamente activo, F2 es un segundo resto o dominio Fc y "-" representa una unión peptídica. La fórmula (I) comprende menos un A o B y opcionalmente ambos. A y B, si ambos están presentes, pueden ser iguales o diferentes. A y B también pueden ser cada uno subunidades o cadenas de una molécula, de manera que cuando ambos están presentes y se asocian entre sí forman una molécula funcional y activa. La fórmula (I) comprende un P1 y P2. P1 y P2 pueden ser iguales o diferentes. La fórmula (I) comprende al menos un F1 y F2. F1 y F2, si ambos están presentes, pueden ser iguales o diferentes. También se muestran polipéptidos ilustrativos mediante el esquema en la Figura 1A):
- 40

- 45 Los polipéptidos ilustrativos según la fórmula I incluyen: A-F1-P1- L-P2-F2; F1-P1- L-P2-B-F2; y F1- L-P2-B-F2.

En una realización, F1 y F2 comprenden cada uno un resto CH2 y uno CH3. En otra realización, F1 y F2 se dimerizan para formar una región Fc y donde A y B están opcionalmente presentes y son restos biológicamente activos.

- En una realización, P1 y P2 están ambos presentes y son reconocidos por la misma o por enzimas diferentes. En una realización, al menos uno de P1 o P2 es un sitio de procesamiento intracelular que comprende una aglomeración de residuos aminoácidos básicos que se reconocen mediante enzimas arginina kex2/furina. Dichas enzimas escinden inmediatamente el extremo C de un residuo arginina. En una realización, al menos uno del sitio de procesamiento intracelular P1 o P2 es un sitio de escisión enzimática, que se reconoce mediante trombina. En otra realización, al menos un sitio es un sitio de escisión que se escinde in vivo, por ejemplo, en un sitio de escisión
- 50

reconocido, p. ej., mediante trombina o Factor IXa o XIa. Los sitios de escisión por FXIa ilustrativos incluyen, p. ej., TQSFNDFTR (SEQ ID NO:7) y SVSQTSLKTR (SEQ ID NO:8). Los sitios de escisión por trombina ilustrativos incluyen: DFLAEGGGVR (SEQ ID NO:9), TTKIKPR (SEQ ID NO:10), y una secuencia que comprende o consiste en ALRPR (p. ej., ALRPRVVGGA (SEQ ID NO: 11)). El experto en la técnica puede seleccionar sin inconvenientes otros sitios de escisión, en función de las enseñanzas en la presente memoria.

Los polipéptidos objeto comprenden al menos un resto biológicamente activo (representado como A y B en la Fórmula I). Dichos restos biológicamente activos se pueden fusionar con cualquiera o ambos restos Fc presentes en la región Fc de una molécula de la invención. Dichas fusiones se pueden producir en el extremo C o el extremo N o en ambos de un resto Fc. Dichas fusiones pueden ser directas (p. ej., mediante una unión peptídica) mediante un enlazador peptídico (p. ej., un espaciador polipeptídico que imparte flexibilidad a la molécula), conjugación química u otros métodos reconocidos en la técnica.

En una realización, una célula que expresa una construcción que codifica un polipéptido de la invención endógenamente expresa una enzima que procesa el enlazador cscFc (L) y resulta en una molécula multimérica que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, p. ej., una molécula dimérica que comprende dos cadenas polipeptídicas. En otra realización, una célula que expresa una construcción que codifica un polipéptido de la invención expresa una enzima heteróloga (p. ej., expresa recombinantemente una enzima) que procesa, es decir, escinde el enlazador cscFc en el sitio de escisión.

La expresión de los polipéptidos de la invención a partir de una construcción genética contigua simple tiene numerosas ventajas con respecto a los métodos de expresión de proteínas convencionales que implican la coexpresión de dos genes (uno que codifica una cadena polipeptídica que comprende un primer dominio Fc y un segundo gen aparte que codifica una cadena polipeptídica que comprende un segundo dominio Fc con uniones disulfuro que enlazan las dos cadenas polipeptídicas). Los posibles problemas asociados con dichas construcciones convencionales incluyen heterogeneidad significativa dentro de la población de moléculas resultantes, de manera que la molécula deseada se debe retirar por purificación de las moléculas indeseadas, lo que resulta inevitablemente en una reducción en el rendimiento total de la molécula deseada. Por ejemplo, las proteínas de fusión Fc plegadas incorrectamente pueden ser difíciles de separar de las proteínas Fc plegadas adecuadamente, bivalentes, dado que la única diferencia entre las dos es frecuentemente un evento de plegado incorrecto heterogéneo. Los polipéptidos objeto no se pueden someter a intercambio de los dominios proteicos debido a que esta construcción no fija las moléculas en estrecha proximidad entre sí durante el proceso de plegado. Además, la extracción de la secuencia enlazadora extraña también puede aliviar cualquier estrés estérico o impedimento que estaba presente en la forma enlazada covalentemente. Sin embargo, la escisión del enlazador cscFc permite que los restos biológicamente activos fusionados al extremo amínico de cada resto Fc tengan un extremo N libre. Esto es particularmente valioso en el caso de los restos biológicamente activos que son catalíticamente activos, tales como dominios serina proteasa que requieren un extremo N libre para ser catalíticamente activos o restos que podrían estar estéricamente impedidos en presencia de un enlazador polipeptídico no escindido.

Las construcciones ilustrativas de la invención se ilustran en las Figuras adjuntas y en el listado de secuencias. En una realización, la invención se refiere a un polipéptido que tiene la estructura según se establece en las Figuras. En otra realización, la invención se refiere a un polipéptido que tiene la secuencia según se establece en el listado de secuencias adjunto o a una molécula de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido. En una realización, la invención se refiere a una forma madura de un polipéptido que tiene la secuencia según se establece en el listado de secuencias adjunto. Se entenderá que estas construcciones y moléculas de ácido nucleico que las codifican pueden usarse para mejorar la hemostasia en un sujeto.

Para proporcionar un claro entendimiento de la memoria descriptiva y reivindicaciones, se proporcionan a continuación las siguientes definiciones.

I. Definiciones

Según se usa en la presente memoria, el término "proteína" o "polipéptido" se refiere a un polímero de dos o más de los aminoácidos naturales o aminoácidos no naturales.

El término "aminoácido" incluye alanina (Ala o A); arginina (Arg o R); asparagina (Asn o N); ácido aspártico (Asp o D); cisteína (Cys o C); glutamina (Gln o Q); ácido glutámico (Glu o E); glicina (Gly o G); histidina (His o H); isoleucina (Ile o I); leucina (Leu o L); lisina (Lys o K); metionina (Met o M); fenilalanina (Phe o F); prolina (Pro o P); serina (Ser o S); treonina (Thr o T); triptófano (Trp o W); tirosina (Tyr o Y); y valina (Val o V). Los aminoácidos no tradicionales también están dentro del alcance de la invención e incluyen norleucina, omitina, norvalina, homoserina y otros residuos aminoácidos análogos tales como los descritos en Ellman et al. *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991). Para generar dichos residuos aminoácidos de origen no natural, se pueden usar los procedimientos de Noren et al. *Science* 244:182 (1989) y Ellman *et al.*, supra. De manera resumida, estos procedimientos implican la activación química de un ARNt supresor con un residuo aminoácido de origen no natural y la posterior transcripción y traducción in vitro del ARN. La introducción del aminoácido no tradicional también se puede lograr usando químicas peptídicas conocidas en la técnica.

Una "sustitución de aminoácido" se refiere al reemplazo de al menos un residuo aminoacídico existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada (una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de partida) con un segundo residuo aminoacídico de "reemplazo" diferente. Una "inserción de aminoácido" se refiere a la incorporación de al menos un aminoácido adicional en una secuencia de aminoácidos predeterminada. Aunque la inserción normalmente consistirá en la inserción de uno o dos residuos aminoacídicos, se pueden llevar a cabo las presentes "inserciones peptídicas" más grandes, p. ej., la inserción de aproximadamente tres a aproximadamente cinco o incluso hasta aproximadamente diez, quince o veinte residuos aminoacídicos. El(los) residuo(s) insertado(s) puede(n) ser de origen natural o de origen no natural, según se describió anteriormente. Una "eliminación de aminoácido" se refiere a la extracción de al menos un residuo aminoacídico de una secuencia de aminoácidos predeterminada.

Los polipéptidos pueden ser monómeros o multímeros. Por ejemplo, en una realización, una proteína de la invención es un dímero. En una realización, los dímeros de la invención son homodímeros, que comprenden dos subunidades monoméricas o polipéptidos idénticos (p. ej., dos restos Fc idénticos o dos restos biológicamente activos idénticos). En otra realización, los dímeros de la invención son heterodímeros, que comprenden dos subunidades monoméricas o polipéptidos no idénticos (p. ej., que comprenden dos restos biológicamente activos idénticos diferentes, un resto biológicamente activo solo, y/o una región Fc que comprende restos Fc no idénticos que se dimerizan para formar una región Fc heteromérica). Los dímeros polipeptídicos pueden comprender dos cadenas polipeptídicas o pueden consistir en una cadena polipeptídica.

Según se usa en la presente memoria, el término "polipéptido scFc" se refiere a un polipéptido que comprende una región Fc de cadena simple (scFc). Los polipéptidos de la invención comprenden enlazadores cscFc (L de fórmula I) que enlazan los restos Fc de la región scFc. El enlazador cscFc está intercalado entre los restos Fc que comprenden la región scFc y están flanqueado por al menos un sitio de escisión enzimática, p. ej., un sitio de procesamiento enzimático intracelular. Según se usa en la presente memoria, el término polipéptido scFc se refiere a un polipéptido que comprende una región Fc de cadena simple (scFc). Los restos Fc del polipéptido se pueden enlazar directamente o indirectamente. Si el enlazador cscFc conecta dos restos Fc de manera contigua en la secuencia polipeptídica lineal, se trata de un enlace "directo". En cambio, los enlazadores cscFc pueden enlazar el primer resto Fc con un resto diferente (p. ej., un resto de unión, un resto de direccionamiento o un resto funcional) que, a su vez, se enlaza con el segundo resto Fc y forma, de esta manera, un enlace indirecto.

En una realización, un polipéptido de la invención comprende modificaciones adicionales. Las modificaciones ilustrativas se describen en mayor detalle más adelante. Por ejemplo, en una realización, un polipéptido se puede modificar para agregar un resto funcional (p. ej., PEG, un fármaco o una etiqueta).

Un "resto biológicamente activo" se refiere a una molécula, porción, fragmento, derivado o componente de una molécula capaz de uno o más de llevar a cabo una función, una acción o una reacción en un contexto biológico. Un resto biológicamente activo puede comprender una proteína completa o una porción biológicamente activa de esta. Por ejemplo, el término "resto biológicamente activo" incluye moléculas activas y funcionales, dominios de unión de moléculas que se unen a componentes de un sistema biológico (p. ej., proteínas en suero o sobre la superficie de células o en matriz celular) y cuya unión resulta en un efecto biológico (p. ej., según se mide mediante un cambio en el resto activo y/o el componente al cual se une (p. ej., una escisión del resto activo y/o del componente al cual se une, la transmisión de una señal, o el aumento o inhibición de una respuesta biológica en una célula o en un sujeto)). Los restos biológicamente activos ilustrativos pueden comprender moléculas naturales, p. ej., un componente de la cascada de coagulación, un sitio o fragmento de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo (p. ej., F(ab) o scFv) (p. ej., para impartir, inducir o bloquear una respuesta biológica), una porción de unión a ligando de un receptor o una porción de unión a receptor de un ligando o un dominio catalítico. En una realización, un resto biológicamente activo comprende la forma madura de una proteína. En otra realización, un resto biológicamente activo comprende una proteína de longitud completa o una porción de una proteína de longitud completa que conserva la actividad biológica.

Según se usa en la presente memoria, el término "resto biológicamente activo" incluye, por ejemplo, un primer resto que puede no tener actividad cuando está presente solo en forma monomérica, pero que tiene una actividad biológica cuando se aparea con un segundo resto en el contexto de una construcción de la invención. En algunas de dichas realizaciones, el primer resto se puede representar mediante A (o B) en la Fórmula I y el segundo resto se puede representar mediante B (o A). Cuando A y B después se asocian en el polipéptido, forman una molécula funcional (los ejemplos incluyen, p. ej., las cadenas ligera y pesada de FVII o p. ej., las subunidades de FSH).

El término "resto biológicamente activo" incluye restos que requieren actividad enzimática para ser completamente activos biológicamente. Por ejemplo, los factores de coagulación, ya sea en su forma zimógena o en su forma completamente activada (p. ej., FVII, FVIIa, FIX, FIXa, FX o FXa) están abarcados por el término "resto biológicamente activo".

El término "dominio de unión a ligando" según se usa en la presente memoria, se refiere a un receptor natural (p. ej., receptor de superficie celular) o una región o derivado de este que conserva al menos una capacidad de unión a ligando cualitativa y, preferiblemente, la actividad biológica del receptor natural correspondiente. El término "dominio de unión a receptor" según se usa en la presente memoria, se refiere a un ligando o región o derivado de este que

conserva al menos una capacidad de unión a receptor cualitativa y, preferiblemente, la actividad biológica del ligando natural correspondiente.

5 En una realización, los polipéptidos de la invención comprenden al menos un resto biológicamente activo que se une a una molécula dirigida a la reducción o eliminación, p. ej., un antígeno de superficie celular o un antígeno soluble. En una realización, el resto biológicamente activo comprende o consiste en un sitio de unión a antígeno (p. ej., que comprende una secuencia de cadena pesada variable y una secuencia de cadena ligera variable o seis CDR de un anticuerpo colocadas en regiones de marco alternativas (p. ej., regiones de marco humanas que comprenden opcionalmente una o más sustituciones de aminoácidos). En otra realización preferida, un resto biológicamente activo comprende una porción biológicamente activa de un componente de la cascada de coagulación.

10 El término "especificidad" incluye la cantidad de posibles sitios de unión que se unen específicamente (p. ej., hacen inmunorreacción con) una diana dada. Un polipéptido puede ser mono-específico y contener uno o más sitios de unión que se unen específicamente a la misma diana (p. ej., el mismo epítipo) o el polipéptido puede ser multiespecífico y contener dos o más sitios de unión que se unen específicamente a diferentes regiones de la misma diana (p. ej., diferentes epítipos) o dianas diferentes.

15 Según se usa en la presente memoria, el término "valencia" se refiere a la cantidad de restos biológicamente activos (p. ej., dominios de unión) en un polipéptido o proteína. Cuando un polipéptido comprende más de un resto biológicamente activo, cada dominio de unión puede unirse específicamente a las mismas o a diferentes moléculas (p. ej., puede unirse a diferentes ligandos o diferentes antígenos, o diferentes epítipos en el mismo antígeno). En una realización, los polipéptidos de la invención son monovalentes. En otra realización, los polipéptidos de la
20 invención son multivalentes (p. ej., bivalentes).

Según se usa en la presente memoria, el término "enlazadores polipeptídicos" se refiere a una secuencia peptídica o polipeptídica (p. ej., una secuencia peptídica o polipeptídica sintética) que conecta dos dominios en una secuencia de aminoácidos lineal de una cadena polipeptídica. Los enlazadores preferidos incluyen, p. ej., enlazadores polipeptídicos gly-ser. Los polipéptidos de la invención se codifican mediante moléculas de ácido nucleico que
25 comprenden una secuencia nucleotídica que codifica enlazadores polipeptídicos que enlazan los dos restos Fc que componen la construcción, ya sea directamente o indirectamente. Estos enlazadores se denominan en la presente memoria "enlazadores cscFc". En lugar de enlazar dos restos Fc de manera contigua en la secuencia polipeptídica lineal, el enlazador cscFc puede, por ejemplo, enlazar el primer resto Fc con un resto diferente (p. ej., un resto biológicamente activo, un resto de direccionamiento o un resto funcional) que, a su vez, se enlaza con el segundo
30 resto Fc. Estos enlazadores cscFc (L) resultan en la formación de una construcción genética de cadena simple. Sin embargo, los polipéptidos también pueden comprender sitios de escisión enzimática que resultan en la escisión del enlazador cscFc y, en una realización, su extirpación sustancial (p. ej., durante el procesamiento por una célula). Por lo tanto, la molécula procesada es una molécula dimérica que comprende al menos dos cadenas de aminoácidos y carece sustancialmente de secuencias de aminoácidos enlazadoras extrañas. En algunas realizaciones, todo o sustancialmente todo el enlazador se extirpa, mientras que, en algunas realizaciones, una porción del sitio de
35 escisión puede permanecer, p. ej., cuatro argininas del sitio de escisión RRRR. En otra instancia, el enlazador se escinde en un sitio.

En otra realización, otro tipo de enlazador polipeptídico, denominado en la presente memoria "espaciador" se puede usar para conectar restos diferentes, p. ej., un resto biológicamente activa a un resto Fc. Este tipo de enlazadores polipeptídicos pueden proporcionar flexibilidad a la molécula polipeptídica. Los espaciadores no se escinden típicamente; sin embargo, dicha escisión puede ser deseable. Las posiciones ilustrativas de los espaciadores se muestran en los dibujos adjuntos.

Según se usa en la presente memoria, el término "enlazador polipeptídico gly-ser" se refiere a un enlazador polipeptídico que consiste en los residuos glicina y serina. Un enlazador polipeptídico gly/ser ilustrativo comprende la
45 secuencia de aminoácidos $(\text{Gly}_4 \text{Ser})_n$. (SEQ ID NO:4) Otro enlazador polipeptídico gly/ser ilustrativo comprende la secuencia de aminoácidos $\text{S}(\text{Gly}_4 \text{Ser})_n$.

En una realización, $n=1$. En una realización, $n=2$. En otra realización, $n=3$, es decir, $(\text{Gly}_4 \text{Ser})_3$. En otra realización, $n=4$, es decir, $(\text{Gly}_4 \text{Ser})_4$ (SEQ ID NO:6). En otra realización, $n=5$. En aún otra realización, $n=6$. En otra realización, $n=7$. En aún otra realización, $n=8$. En otra realización, $n=9$. En aún otra realización, $n=10$. Otro enlazador polipeptídico gly/ser ilustrativo comprende la secuencia de aminoácidos $\text{Ser}(\text{Gly}_4 \text{Ser})_n$ (SEQ ID NO:26). En una
50 realización, $n=1$. En una realización, $n=2$. En una realización preferida, $n=3$. En otra realización, $n=4$. En otra realización, $n=5$. En aún otra realización, $n=6$.

Un polipéptido o secuencia de aminoácidos "derivado de" un polipéptido o proteína designado se refiere al origen del polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido o secuencia de aminoácidos que deriva de una secuencia particular tiene una secuencia de aminoácidos que esencialmente idéntica a dicha secuencia o una porción de esta, en donde la porción consiste en al menos 10-20 aminoácidos, preferiblemente, al menos 20-30 aminoácidos, más preferiblemente, al menos 30-50 aminoácidos, o que es de cualquier otra manera identificable por un experto en la técnica por originarse a partir de la secuencia.

Los polipéptidos derivados de otro péptido pueden tener una o más mutaciones con respecto al polipéptido de partida, p. ej., uno o más residuos aminoacídicos que se han sustituido con otro residuo aminoacídico o que tiene una o más inserciones o eliminaciones de residuo aminoacídico. Preferiblemente, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que no es de origen natural. Dichas variantes necesariamente tienen menos de 100 % de identidad o similitud de secuencia con respecto al anticuerpo de partida. En una realización preferida, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 75 % a menos de 100 % de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de partida, más preferiblemente, de aproximadamente 80 % a menos de 100 %, más preferiblemente, de aproximadamente 85 % a menos de 100 %, más preferiblemente, de aproximadamente 90 % a menos de 100 % (p. ej., 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) y, lo más preferiblemente, de aproximadamente 95 % a menos de 100 %, p. ej., a lo largo de la longitud de la molécula variante. En una realización, hay una diferencia de un aminoácido entre una secuencia polipeptídica de partida y la secuencia derivada de esta. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en la presente memoria como el porcentaje de residuos aminoacídicos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo residuo) a los residuos aminoacídicos de partida, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para obtener el porcentaje de identidad de secuencia máximo.

Los polipéptidos preferidos de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos (p. ej., al menos un resto o dominio Fc) derivada de una secuencia de inmunoglobulina humana. Sin embargo, los polipéptidos pueden comprender uno o más aminoácidos de otra especie de mamíferos. Por ejemplo, un dominio Fc o sitio de unión de primate se puede incluir en los polipéptidos objeto. Alternativamente, uno o más aminoácidos derivados de una especie no humana pueden estar presentes en un polipéptido. Los polipéptidos preferidos de la invención son no inmunógenos.

También entenderá el experto en la técnica que los polipéptidos de la invención se pueden alterar de manera que varíen en la secuencia de aminoácidos con respecto a los polipéptidos de origen natural o naturales de los cuales se derivaron, mientras conservan la actividad deseable de los polipéptidos naturales. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de nucleótidos o aminoácidos que conducen a sustituciones o cambios conservadores en residuos aminoacídicos "no esenciales". Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (p. ej., un dominio, resto o sitio de unión a antígeno Fc) se puede crear al introducir una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia nucleotídica de la inmunoglobulina de manera que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones se pueden introducir mediante técnicas estándares, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR.

Los polipéptidos de la invención pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o más residuos aminoacídicos, p. ej., en residuos aminoacídicos esenciales o no esenciales. Por lo tanto, un residuo aminoacídico no esencial en un polipéptido se puede reemplazar con otro residuo aminoacídico de la misma familia de cadena lateral. En otra realización, una sucesión de aminoácidos se puede reemplazar con una sucesión estructuralmente similar que difiere en el orden y/o composición de los miembros de familia de cadena lateral. Alternativamente, en otra realización, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden incorporar en los polipéptidos de la invención y someterse a barrido para determinar su capacidad para unirse a la diana deseada.

En el contexto de los polipéptidos, una "secuencia lineal" o una "secuencia" es el orden de los aminoácidos en un polipéptido en un sentido de extremo amínico a carboxílico en el que los residuos que flanquean o están adyacentes entre sí en la secuencia son contiguos en la estructura primaria del polipéptido, es decir, están enlazados a través de una unión peptídica.

Según se usa en la presente memoria, los términos "enlazado/a", "fusionado/a" o "fusión" se refieren al enlace a través de una unión peptídica, conjugación química u otros medios. Los términos "genéticamente fusionado/a", "genéticamente enlazado/a" o "fusión genética" se usan de manera intercambiable y se refieren al enlace o acoplamiento colineal, covalente de dos o más proteínas, polipéptidos, o fragmentos de estos a través de sus cadenas principales peptídicas individuales, a través de la expresión genética de una molécula polinucleotídica simple que codifica dichas proteínas, polipéptidos o fragmentos. Dicha fusión genética resulta en la expresión de una secuencia genética contigua simple. En una realización, los restos de un polipéptido scFc están fusionados genéticamente. Las fusiones genéticas preferidas están dentro del marco, es decir, dos o más marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) se fusionan para formar un ORF contiguo más largo, de tal manera que se mantiene el marco de lectura correcto de los ORF originales. Por lo tanto, la proteína de fusión recombinante resultante es un polipéptido simple que contiene dos o más segmentos proteicos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (cuyos segmentos no están normalmente unidos de esta forma en la naturaleza). En este caso, el polipéptido simple se escinde durante el procesamiento para proporcionar moléculas dimericas que comprenden dos cadenas polipeptídicas.

Según se usa en la presente memoria, el término "región Fc" se definirá como la porción de un polipéptido que corresponde a la región Fc de la inmunoglobulina natural, es decir, según se forma mediante la asociación dimerica de los dominios Fc respectivos) de sus dos cadenas pesadas. Una región Fc natural es homodimerica y comprende

dos cadenas polipeptídicas. En cambio, el término "región Fc genéticamente fusionada" o "región Fc de cadena simple" (región scFc), según se usa en la presente memoria, se refiere a una región Fc dimérica sintética comprendida por dominios o restos Fc genéticamente enlazados dentro de una cadena polipeptídica simple (es decir, codificados en una secuencia genética contigua simple) en donde los dominios o restos Fc de la cadena polipeptídica simple se dimerizan para formar una región Fc.

Según se usa en la presente memoria, el término "dominio Fc" se refiere a la porción de una cadena pesada de inmunoglobulina simple que comienza en la región bisagra apenas antes del sitio de escisión por papaína (es decir, el residuo 216 en IgG, tomando el primer residuo de la región constante de cadena pesada como 114) y que termina en el extremo C del anticuerpo. Por consiguiente, un dominio Fc completo comprende al menos un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

Según se usa en la presente memoria, el término "porción de dominio Fc" o "resto Fc" incluye una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc o derivada de un dominio Fc. En ciertas realizaciones, un resto Fc comprende al menos uno de: un dominio bisagra (p. ej., región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, un dominio CH4 o una variante, porción, o fragmento de esta. En otras realizaciones, un resto Fc comprende un dominio Fc completo (es decir, un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3). En una realización, un resto Fc comprende un dominio bisagra (o porción de este) fusionado con un dominio CH3 (o porción de este). En otra realización, un resto Fc comprende un dominio CH2 (o porción de este) fusionado con un dominio CH3 (o porción de este). En otra realización, un resto Fc consiste en un dominio bisagra (o porción de este) y un dominio CH3 (o porción de este). En otra realización, un resto Fc consiste en un dominio bisagra (o porción de este) y un dominio CH2 (o porción de este). En una realización, un resto Fc carece de al menos una porción de un dominio CH2 (p. ej., todo o parte de un dominio CH2).

En una realización, un resto Fc de la invención comprende al menos la porción de una molécula Fc conocida en la técnica por ser necesaria para la unión a FcRn, denominada en la presente memoria agente de combinación para unión al receptor neonatal (FcRn). El experto en la técnica entenderá que porciones de una región constante de inmunoglobulina para su uso en la proteína quimérica de la invención pueden incluir mutantes o análogos de esta, o pueden incluir regiones constantes de inmunoglobulina químicamente modificadas (p. ej., pegiladas), o fragmentos de estas (véase, p. ej., Aslam y Dent 1998, Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences Macmillan Reference, Londres). En una instancia, un mutante puede proporcionar una unión mejorada de un agente de combinación para la unión a FcRn para el FcRn. También se contemplan para su uso en la proteína quimérica de la invención miméticos peptídicos de al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, p. ej., un mimético peptídico de un fragmento Fc o un mimético peptídico de un agente de combinación para unión a FcRn. En una realización, el mimético peptídico se identifica usando visualización en fagos o a través de barrido de biblioteca químico (véase, p. ej., McCafferty et al. 1990, Nature 348:552, Kang et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363; EP 0 589 877 B1). En otra realización, una región Fc de la invención (una región scFc) comprende al menos la porción de una molécula Fc conocida en la técnica por ser necesaria para la unión a FcRn.

En una realización, una región Fc de la invención (una región scFc) comprende al menos la porción de una molécula Fc conocida en la técnica por ser necesaria para la unión a Proteína A. En una realización, una región Fc de la invención (una región scFc) comprende al menos la porción de una molécula Fc conocida en la técnica por ser necesaria para la unión a proteína G.

Según se establece en la presente memoria, el experto en la técnica entenderá que un dominio Fc también se puede modificar de manera que varíe en otras funciones efectoras con respecto al dominio Fc natural de una molécula de inmunoglobulina de origen natural. En ciertas realizaciones ilustrativas, el resto Fc conserva una función efectora (p. ej., unión a FcγR).

Los dominios o restos Fc de un polipéptido de la invención se pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, un dominio o resto Fc de un polipéptido puede comprender un dominio CH2 y/o CH3 derivado de una molécula IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula IgG3. En otro ejemplo, un dominio o resto Fc puede comprender una región bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG3. En otro ejemplo, un dominio o resto Fc puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG4.

Las posiciones de aminoácidos en una región constante de cadena pesada, incluidas las posiciones de aminoácidos en los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3, se enumeran según el sistema de numeración del índice UE (véase Kabat et al., en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5a edición, 1991). En cambio, las posiciones de aminoácidos en una región constante de cadena ligera (p. ej., dominios CL) se enumeran en la presente memoria según el sistema de numeración del índice Kabat (véase Kabat *et al.*, *ibid*).

Según se usa en la presente memoria, el término "dominio V_H" incluye el dominio variable del extremo amínico de una cadena pesada de inmunoglobulina, y el término "dominio V_L" incluye el dominio variable del extremo amínico de una cadena ligera de inmunoglobulina según el sistema de numeración del índice Kabat.

- 5 Según se usa en la presente memoria, el término "dominio CH1" incluye el primer (y más cercano al extremo amínico) dominio de región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina que se extiende, p. ej., de aproximadamente las posiciones UE 118-215. El dominio CH1 es adyacente al dominio V_H y hacia el extremo amínico con respecto a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina, y no forma parte de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización, un polipéptido de la invención comprende un dominio CH1 derivado de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., una molécula IgG1 o IgG4 humana).
- 10 Según se usa en la presente memoria, el término "región bisagra" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, lo que permite, por lo tanto, que las dos regiones de unión a antígeno en el extremo N se muevan independientemente. Las regiones bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, medio e inferior (Roux et al. J. Immunol. 1998, 161:4083).
- 15 Según se usa en la presente memoria, el término "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina que se extiende, p. ej., de aproximadamente las posiciones UE 231-340. El dominio CH2 se diferencia por no estar estrechamente apareado con otro dominio. En cambio, dos cadenas de carbohidrato ramificadas enlazadas en N se intercalan entre los dos dominios CH2 de una molécula IgG natural intacta. En una realización, un polipéptido de la invención comprende un dominio CH2 derivado de una molécula IgG1 (p. ej., una molécula IgG1 humana). En otra realización, un polipéptido de la invención comprende un dominio CH2 derivado de una molécula IgG4 (p. ej., una molécula IgG4 humana). En una realización ilustrativa, un polipéptido de la invención comprende un dominio CH2 (posiciones UE 231-340), o una porción de este.
- 20 Según se usa en la presente memoria, el término "dominio CH3" incluye la porción de una molécula de inmunoglobulina de cadena pesada que se extiende aproximadamente 110 residuos desde el extremo N del dominio CH2, p. ej., de aproximadamente la posición 341-446b (sistema de numeración UE). El dominio CH3 típicamente forma la porción de extremo C del anticuerpo. En algunas inmunoglobulinas, sin embargo, dominios adicionales se pueden extender desde el dominio CH3 para formar la porción de extremo C de la molécula (p. ej., el dominio CH4 en la cadena μ de IgM y la cadena ϵ de IgE). En una realización, un polipéptido de la invención comprende un dominio CH3 derivado de una molécula IgG1 (p. ej., una molécula IgG1 humana). En otra realización, un polipéptido de la invención comprende un dominio CH3 derivado de una molécula IgG4 (p. ej., una molécula IgG4 humana).
- 25 Según se usa en la presente memoria, el término "dominio CL" incluye el primer (y más cercano al extremo amínico) dominio de región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina que se extiende, p. ej., de aproximadamente la posición según Kabat 107A-216. El dominio CL es adyacente al dominio V_L. En una realización, un polipéptido de la invención comprende un dominio CL derivado de una cadena ligera kappa (p. ej., una cadena ligera kappa humana).
- 30 Los restos Fc para su uso en los polipéptidos de la invención se pueden modificar en posiciones reconocidas en la técnica para alterar, p. ej., aumentar o reducir la función efectora. Según se usa en la presente memoria, el término "función efectora" se refiere a la capacidad funcional de la región Fc o porción de esta para unirse a proteínas y/o células del sistema inmunitario y mediar diversos efectos biológicos. Las funciones efectoras pueden ser dependientes del antígeno o independientes del antígeno. Una reducción en la función efectora se refiere a una reducción en una o más funciones efectoras, mientras se mantiene la actividad de unión a antígeno de la región variable del anticuerpo (o fragmento de este). Los aumentos o reducciones en la función efectora, p. ej., unión de Fc a un receptor Fc o proteína de complemento, se pueden expresar en función del volumen de cambio (p. ej., cambió 1 vez, 2 veces y similares) y se pueden calcular en función de, p. ej., los cambios porcentuales en la actividad de unión determinada usando ensayos que se conocen en la técnica.
- 35 Los restos Fc para su uso en los polipéptidos de la invención se pueden modificar en posiciones reconocidas en la técnica para alterar, p. ej., aumentar o reducir la semivida. Según se usa en la presente memoria, el término "semivida" se refiere a la semivida biológica de un polipéptido particular *in vivo*. La semivida se puede representar mediante el tiempo necesario para que la mitad de la cantidad administrada a un sujeto se aclare de la circulación y/u otros tejidos en el animal.
- 40 Según se usa en la presente memoria, el término "sitio de unión a antígeno" o "dominio de unión a antígeno" incluye un sitio que se une específicamente (hace inmunorreacción con) a un antígeno tal como un antígeno de superficie celular o soluble). En una realización, el sitio de unión incluye una región variable de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina y el sitio de unión formados por estas regiones variables determina la especificidad del anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno se forma mediante regiones variables (dominios V_H y V_L) que varían de un polipéptido a otro.
- 45 Según se usa en la presente memoria, el término "sitio de unión a antígeno" o "dominio de unión a antígeno" incluye un sitio que se une específicamente (hace inmunorreacción con) a un antígeno tal como un antígeno de superficie celular o soluble). En una realización, el sitio de unión incluye una región variable de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina y el sitio de unión formados por estas regiones variables determina la especificidad del anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno se forma mediante regiones variables (dominios V_H y V_L) que varían de un polipéptido a otro.
- 50 En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la invención comprenden al menos dos dominios de unión a antígeno (p. ej., dentro del mismo polipéptido (p. ej., en el extremo N y el extremo C de un polipéptido simple) o enlazados a cada componente de unión a polipéptido de una proteína de unión multimérica de la invención) que proporcionan la asociación del polipéptido con el antígeno seleccionado. Los dominios de unión a antígeno no tienen que derivar de la misma molécula de inmunoglobulina. En este sentido, la región variable puede o no derivar de cualquier tipo de
- 55

animal que se puede inducir para crear una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno deseado. Como tal, la región variable puede ser, por ejemplo, de origen mamífero, p. ej., puede ser humana, murina, de primate no humano (tal como monos cangrejeros, macacos, etc.), lupina, camélida (p. ej., de camellos, llamas y especies relacionadas).

5 El término "variante de anticuerpo" o "anticuerpo modificado" incluye un anticuerpo que no se produce en la naturaleza y que tiene una química de secuencia de aminoácidos o cadena lateral de aminoácidos que difiere de la de un anticuerpo derivado naturalmente en al menos un aminoácido o modificación de aminoácido según se describe en la presente memoria o una molécula de origen no natural que comprende al menos un sitio de unión a antígeno. Según se usa en la presente memoria, el término "variante de anticuerpo" incluye formas sintéticas de anticuerpos que se alteran de manera que no sean de origen natural, p. ej., anticuerpos que comprenden al menos dos porciones cadena pesada, pero no dos cadenas pesadas completas (tales como, anticuerpos o minicuerpos con dominio eliminado); formas multiespecíficas de anticuerpos (p. ej., biespecíficas, triespecíficas, etc.) alteradas para unirse a dos o más antígenos diferentes o a diferentes epítopos en un antígeno simple); moléculas cadena pesada unidas a moléculas scFv; anticuerpos de cadena simple; diacuerpos; triacuerpos; y anticuerpos con función efectora alterada y similares.

Según se usa en la presente memoria, el término "molécula scFv" incluye moléculas de unión que consisten en un dominio variable de cadena ligera (VL) o porción de este, y un dominio variable de cadena pesada (VH) o porción de este, en donde cada dominio variable (o porción de este) deriva de los mismos o diferentes anticuerpos. Las moléculas scFv preferiblemente comprenden un enlazador scFv intercalado entre el dominio VH y el dominio VL. Las moléculas scFv se conocen en la técnica y se describen, p. ej. en la patente estadounidense 5.892.019, Ho et al. 1989. Gene 77:51; Bird et al. 1988 Science 242:423; Pantoliano et al. 1991. Biochemistry 30:10117; Milenic et al. 1991. Cancer Research 51:6363; Takkinen et al. 1991. Protein Engineering 4:837.

Un "enlazador scFv", según se usa en la presente memoria, se refiere a un resto intercalado entre los dominios VL y VH de scFv. El enlazador scFv preferiblemente mantiene la molécula scFv en una conformación de unión a antígeno. En una realización, un enlazador scFv comprende o consiste en un péptido enlazador scFv. En ciertas realizaciones, un péptido enlazador scFv comprende o consiste en un enlazador polipeptídico gly-ser. En otras realizaciones, un enlazador scFv comprende una unión disulfuro.

El término "glicosilación" se refiere al enlace covalente de uno o más carbohidratos con un polipéptido. Típicamente, la glicosilación es un evento que se produce después de la traducción que puede producirse dentro del medio intracelular de una célula o extracto de esta. El término glicosilación incluye, por ejemplo, glicosilación enlazada a N (donde uno o más azúcares están enlazados a un residuo asparagina) y/o glicosilación enlazada a O (donde uno o más azúcares están enlazados a un residuo aminoácido que tiene un grupo hidroxilo (p. ej., serina o treonina). En una realización, una molécula de la invención está glicosilada. En otra realización, una molécula de la invención está aglicosilada. En otra realización adicional, una molécula de la invención tiene glicosilación reducida en comparación con la de una región Fc natural.

Según se usa en la presente memoria, el término "unión disulfuro" incluye la unión covalente formada entre dos átomos de azufre.

Según se usa en la presente memoria, el término "resto" se refiere a una parte componente o constituyente de un polipéptido quimérico.

40 El término "resto funcional" incluye restos que, preferiblemente, agregan una función deseable al polipéptido. Preferiblemente, la función se agrega sin alterar significativamente una actividad intrínseca deseable del polipéptido, p. ej., actividad de coagulación, solubilidad, o semivida de la molécula. Un polipéptido de la invención puede comprender uno o más restos funcionales, que pueden ser iguales o diferentes. Los ejemplos de restos funcionales útiles incluyen, pero no se limitan a, un resto detectable, un resto funcional, un resto farmacológico, un resto de afinidad y un resto de bloqueo (p. ej., que bloquea estéricamente la unión a una enzima o que bloquea la capacidad para unirse a un receptor particular). Los restos funcionales se pueden enlazar a polipéptidos usando métodos conocidos en la técnica, p. ej., a través de restos de enlace escindibles o no escindibles.

Según se usa en la presente memoria, el término "profármaco" se refiere a un precursor o forma derivada de un agente farmacéuticamente activo que es menos activo, reactivo o propenso a efectos secundarios en comparación con el fármaco genitor y es capaz de activarse enzimáticamente o de cualquier otra manera convertirse en una forma más activa *in vivo*. En una realización, un profármaco de la invención es un polipéptido que comprende una región scFc no escindida o no procesada que, tras la administración o antes de la administración a un sujeto se escinde para formar una molécula dimérica que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas.

55 El término "vector" o "vector de expresión" se usa en la presente memoria para hacer referencia a vectores que se usan según la presente invención como un vehículo para introducir y expresar un polinucleótido deseada en una célula. Como saben los expertos en la técnica, dichos vectores se pueden seleccionarse fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención

comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción adecuados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad para ingresar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas.

Las construcciones de la invención se pueden expresar en un plásmido simple y evitar la necesidad de múltiples plásmidos. Se pueden emplear numerosos sistemas de vector de expresión. Por ejemplo, una clase de vector usa elementos de ADN que derivan de virus de animales tales como virus del papiloma bovino, virus de poliovirus, adenovirus, virus de la vacuna de la viruela, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Además, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas se pueden seleccionar al introducir uno o más marcadores que permiten la selección de células hospedantes transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un hospedante auxótrofo, resistencia biocida (p. ej., antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como cobre. El gen marcador seleccionable puede enlazarse directamente con las secuencias de ADN para expresarse, o introducirse en la misma célula mediante cotransformación. En una realización, se puede emplear un sistema de expresión inducible. También pueden ser necesarios elementos adicionales para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de empalme, así como promotores, potenciadores y señales de terminación de la transcripción. En una realización, una señal de secreción, p. ej., una cualquiera de varios péptidos líderes bacterianos caracterizados (p. ej., pelB, phoA o ompA), se puede fusionar dentro del marco con el extremo N de un polipéptido de la invención para obtener la secreción óptima del polipéptido. (Lei et al. (1988), Nature, 331:543; Better et al. (1988) Science, 240:1041; Mullinax et al., (1990). PNAS, 87:8095).

El término "célula hospedante" se refiere a una célula que se ha transformado con un vector construido usando técnicas de ADN recombinante y que codifica al menos un gen heterólogo. En descripciones de procesos para el aislamiento de proteínas a partir de hospedantes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable para denotar la fuente de proteína, a menos que se especifique claramente de cualquier otra manera. En otras palabras, la recuperación de proteína de las "células" puede significar a partir de células enteras centrifugadas, o a partir del cultivo celular que contiene el medio y las células suspendidas. La línea celular hospedante usada para la expresión de la proteína es lo más preferiblemente de origen mamífero; se reconoce que los expertos en la técnica tienen la capacidad de determinar preferencialmente las líneas celulares hospedantes particulares que son más adecuadas para el producto génico deseado que se va a expresar en ellas. Las líneas celulares hospedantes ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chinp, DHFR menos), HELA (carcinoma de cuello de útero humano), CV1 (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CV1 con antígeno T de SV40), R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocitos humanos) y 293 (riñón humano). Las líneas celulares hospedantes típicamente están disponibles en servicios comerciales, la colección de cultivos tisulares estadounidense o en la literatura publicada. Los polipéptidos de la invención también se pueden expresar en células que no son de mamífero, tales como células de bacterias o levadura o planta. En este sentido, se apreciará que se pueden transformar también diversos microorganismos no mamíferos unicelulares tales como bacterias; *es decir*, aquellos capaces de cultivarse en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son susceptibles de transformación, incluyen miembros de enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; Bacillaceae, tal como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará, además, que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos típicamente se convierten en parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos se pueden aislar, purificar y después ensamblar en moléculas funcionales.

Además de los procariotas, también se pueden usar microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadería común, es la más usada comúnmente entre los microorganismos eucariotas, aunque existen varias otras cepas comúnmente disponibles que incluyen *Pichia pastoris*. Para la expresión en *Saccharomyces*, se usa comúnmente el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb et al., (1979), Nature, 282:39; Kingsman et al., (1979), Gene, 7:141; Tschemper et al., (1980), Gene, 10:157). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, n.º de ATCC 44076 o PEP4-1 (Jones, (1977), Genetics, 85:12). La presencia de la lesión *trp1* como característica del genoma de la célula hospedante de levadura proporciona después un entorno eficaz para detectar la transformación por cultivo en ausencia de triptófano.

Según se usa en la presente memoria, el término "endógeno/a" se refiere a moléculas (p. ej., moléculas de ácido nucleico y/o proteicas) que están naturalmente presentes en una célula. En cambio, el término "exógeno/a" o "heterólogo/a" se refiere a moléculas que no se encuentran normalmente en un contexto dado, p. ej., en una célula o en un polipéptido. Por ejemplo, una molécula exógena o heteróloga se puede introducir en una célula y está presente después de la manipulación de la célula, (p. ej., mediante transfección u otras formas de ingeniería genética) o una secuencia de aminoácidos heteróloga puede estar presente en una proteína en la que no se encuentra naturalmente

Según se usa en la presente memoria, el término "sitio de escisión" o "sitio de escisión enzimática" se refiere a un sitio reconocido por una enzima. Ciertos sitios de escisión enzimática comprenden un sitio de procesamiento intracelular. En una realización, un polipéptido tiene un sitio de escisión enzimática escindido por una enzima que se activa durante la cascada de coagulación, de manera que la escisión de dichos sitios se produce en el sitio de la formación del coágulo. Los sitios ilustrativos de este tipo incluyen los reconocidos por trombina, Factor XIa o Factor Xa. Los sitios de escisión por FXIa ilustrativos incluyen, p. ej., TQSFNDFTR y SVSQTSLTR. Los sitios de escisión

por trombina ilustrativos incluyen, p. ej., DFLAEGGGVR, TTKIKPR, LVPRG (SEQ ID NO:35) y una secuencia que comprende o consiste en ALRPR (p. ej. ALRPRVVGGA). Se conocen otros sitios de escisión útiles en la técnica.

5 Según se usa en la presente memoria, el término "sitio de procesamiento" o "sitio de procesamiento intracelular" se refiere a un tipo de sitio de escisión enzimática en un polipéptido que es la diana para la enzima que funciona después de la traducción del polipéptido. En una realización, dichas enzimas funcionan durante el transporte desde el lumen de Golgi hasta el compartimiento trans-Golgi. Las enzimas de procesamiento intracelular escinden polipéptidos antes de la secreción de la proteína a partir de la célula.

10 Un ejemplo de sitios de procesamiento incluye sitios dirigidos por la familia PACE/furina (donde PACE es un acrónimo en inglés para enzima de escisión de aminoácido básico apareado) de endopeptidasas. Estas enzimas están ubicadas en la membrana de Golgi y escinden muchas proteínas en el lado del extremo carboxílico del motivo de secuencia Arg-[cualquier residuo]-(Lys o Arg)-Arg. Según se usa en la presente memoria, la familia "furina" de enzimas incluye, p. ej., furina, PC2, PC1/PC3, PC4, PACE4, PC5/PC6 y LPC/PC7/PC8/SPC7. Se conocen otros sitios de procesamiento útiles en la técnica.

15 Una "proteína quimérica" o "proteína de fusión", según se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier proteína comprendida por una primera secuencia de aminoácidos derivada de una primera fuente, unida covalentemente o no covalentemente, a una segunda secuencia de aminoácidos derivada de una segunda fuente, en donde la primera y segunda fuentes no son iguales. Una primera fuente y una segunda fuente que no son iguales pueden incluir dos entidades biológicas diferentes, o dos proteínas diferentes de la misma entidad biológica, o una entidad biológica y una entidad no biológica. Una proteína quimérica puede incluir, por ejemplo, una proteína derivada de al menos 2 fuentes biológicas diferentes. Una fuente biológica puede incluir cualquier una secuencia de ácido nucleico o aminoácidos producida no sintéticamente (p. ej., una secuencia genómica o de ADNc, un plásmido o vector vírico, un virión natural o un mutante o análogo, según se describe adicionalmente en la presente memoria, de cualquiera de los mencionados anteriormente). Una fuente sintética puede incluir una secuencia proteica o de ácido nucleico producida químicamente y no mediante un sistema biológico (p. ej., síntesis en fase sólida de secuencias de aminoácidos). Una proteína quimérica puede incluir también una proteína derivada de al menos 2 fuentes sintéticas diferentes o una proteína derivada de al menos una fuente biológica y al menos una fuente sintética. Una proteína quimérica también puede comprender una primera secuencia de aminoácidos derivada de una primera fuente, enlazada covalentemente o no covalentemente con un ácido nucleico, derivado de cualquier fuente o una molécula orgánica o inorgánica pequeña derivada de cualquier fuente. La proteína quimérica puede comprender una molécula enlazadora entre la primera y segunda secuencia de aminoácidos o entre la primera secuencia de aminoácidos y el ácido nucleico, o entre la primera secuencia de aminoácidos y la molécula orgánica o inorgánica pequeña. Los ejemplos de moléculas quiméricas incluyen las moléculas scFc de la invención.

30 Según se usa en la presente memoria, el término "factor de coagulación", se refiere a moléculas, o análogos de estas, de origen natural o producidas recombinantemente que evitan o reducen la duración de un episodio hemorrágico en un sujeto. En otras palabras, significa moléculas que en su forma activa tienen actividad procoaguladora, es decir, son responsables de la conversión de fibrinógeno en una malla de fibrina insoluble que provoca que la sangre coagule.

35 "Actividad coaguladora", según se usa en la presente memoria, significa la capacidad de participar en una cascada de reacciones bioquímicas que culmina en la formación de un coágulo de fibrina y/o reduce la gravedad, duración o frecuencia de un episodio hemorrágico o de sangrado.

"Hemostasia", según se usa en la presente memoria, significa detener o enlentecer el sangrado o hemorragia; o detener o enlentecer el flujo de sangre a través de un vaso sanguíneo o parte corporal.

40 "Trastorno hemostático", según se usa en la presente memoria, significa una afección hereditaria genéticamente o adquirida caracterizada por una tendencia a la hemorragia, ya sea espontánea o como resultado de un traumatismo, debido a una capacidad alterada o a una incapacidad para formar un coágulo de fibrina. Los ejemplos de dichos trastornos incluyen las hemofilias. Las tres principales formas son hemofilia A (carencia de factor VIII), hemofilia B (carencia de factor IX o "enfermedad de la Navidad") y hemofilia C (carencia de factor XI, tendencia leve al sangrado), enfermedad de Von Willebrand, carencia de factor Xi (carencia de PTA), carencia de Factor XII, carencias o anomalías estructurales en fibrinógeno, protrombina, Factor V, Factor VII, Factor X o factor XIII, el síndrome de Bernard-Soulier es un defecto o carencia de GPIb. GPIb, el receptor para vWF, puede ser defectuoso y conducir a una falta de formación de coágulo primaria (hemostasia primaria) y mayor tendencia al sangrado), y trombostenia de Glanzman y Naegeli (trombostenia de Glanzmann). En la insuficiencia hepática (formas aguda y crónica), existe una producción insuficiente de factores de coagulación por parte del hígado; esto aumenta el riesgo de sangrados.

55 Según se usa en la presente memoria, el término "resto de direccionamiento" se refiere a una molécula, fragmento de esta o un componente de un polipéptido que ubica o dirige los polipéptidos de la invención hasta un sitio o célula deseado. En una realización, una construcción de la invención comprende un "resto de direccionamiento" que potencia la actividad del polipéptido, p. ej., al ubicar la molécula en un sitio deseado. Dicho resto puede ser, p. ej., un anticuerpo o variante de este (p. ej., un scFv) o un péptido. En otra realización, dicho resto de direccionamiento

puede ser un polipéptido, una porción de unión a receptor de un ligando, o una porción de unión a ligando de un receptor, que se enlaza a un polipéptido de la invención y se une a la diana deseada, p. ej., en una célula o tejido. El resto de direccionamiento puede estar genéticamente fusionado con una construcción, químicamente conjugado con la construcción o enlazado con la construcción a través de una unión peptídica, p. ej., un espaciador polipeptídico.

5 Por ejemplo, se pueden acoplar restos de direccionamiento a una construcción de la invención mediante la formación de una unión entre el resto de direccionamiento y un resto Fc de una construcción, donde el resto de direccionamiento comprende un primer grupo funcional y el resto Fc comprende un segundo grupo funcional, y donde el primer y segundo grupos funcionales son capaces de hacer reacción entre sí para formar una unión química (véase, p. ej., la patente estadounidense 7381408). En una realización de la invención, un resto de
10 direccionamiento se une a plaquetas según se describe en más detalle en la presente memoria.

Según se usa en la presente memoria, la frase "sujeto que se beneficiaría de la administración de un polipéptido" incluye sujetos, tales como sujetos mamíferos, que se beneficiarían de la administración de polipéptidos de la invención, p. ej., para el tratamiento de un trastorno. Por ejemplo, en una realización, el sujeto puede beneficiarse de la reducción o eliminación de una molécula soluble o particulada de la circulación o suero (p. ej., una toxina o patógeno) o de la reducción o eliminación de una población de células que expresan la diana (p. ej., células tumorales). En otra realización, un sujeto puede beneficiarse de la actividad biológica impartida por la porción de unión de la construcción, p. ej., como en el caso de un polipéptido que comprende un factor de coagulación. Según se describió anteriormente, el polipéptido se puede usar en forma no conjugada o puede estar químicamente conjugado o enlazado, p. ej., a un resto funcional, para formar un polipéptido modificado para la administración a
20 dicho sujeto.

Tratar, tratamiento, según se usa en la presente memoria, se refieren a, p. ej., la reducción en la gravedad de una enfermedad o afección; la reducción en la duración de una evolución de la enfermedad; la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o afección; el suministro de efectos beneficiosos a un sujeto con una enfermedad o afección, sin necesariamente curar la enfermedad o afección. En otra instancia, la administración de una composición producida según la invención resulta en la profilaxis de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o afección.
25

II. Moléculas que comprenden regiones Fc de cadena simple ("scFc")

En una realización, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos que comprenden al menos una región Fc genéticamente fusionada o porción de esta dentro de una cadena polipeptídica simple (es decir, polipéptidos que comprenden una región Fc de cadena simple (scFc)). Una molécula de ácido nucleico de la invención codifica un polipéptido en el que los restos Fc están genéticamente fusionados en una secuencia lineal contigua de aminoácidos a través de un enlazador cscFc.
30

La invención también proporciona polipéptidos especificados por dichas moléculas de ácido nucleico. En una realización, la invención proporciona polipéptidos no procesados en los que al menos dos restos o dominios Fc (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6 o más restos o dominios Fc) dentro de la misma cadena polipeptídica lineal son capaces de plegarse (p. ej., plegarse intramolecularmente o intermolecularmente) para formar una región scFc funcional que está enlazada mediante un enlazador polipeptídico Fc. Por ejemplo, en una realización preferida, un polipéptido de la invención es capaz de unirse, a través de su región scFc, a al menos un receptor Fc (p. ej., un FcRn, un receptor FcγR (p. ej., FcγRIII), o una proteína de complemento (p. ej., C1q)) para mejorar la semivida o desencadenar una función efectora inmunitaria (p. ej., citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis, o citotoxicidad dependiente de complemento (CDCC) y/o para mejorar la capacidad de fabricación).
35
40

En una instancia, la descripción se refiere a polipéptidos procesados (p. ej., maduros) en los que el al menos un sitio de escisión adyacente a un enlazador polipeptídico cscFc se ha escindido de manera que la molécula ya no es una cadena polipeptídica simple. El polipéptido procesado resultante está comprendido por al menos dos cadenas polipeptídicas (debido a la escisión en el(los) sitio(s) de escisión enzimática) P1 y/o P2.
45

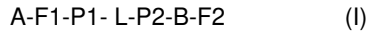
En una instancia, dichos polipéptidos procesados comprenden un resto biológicamente activo enlazado al segundo resto Fc (es decir, el segundo resto Fc cuando se cuenta desde el extremo amínico hacia el extremo carboxílico antes de la escisión del enlazador polipeptídico) que tiene un extremo amínico libre después de la escisión del enlazador polipeptídico.

50 En una realización, un resto biológicamente activo acoplado al extremo N del segundo resto Fc comprende un sitio de unión a antígeno (p. ej., una molécula scFv). En otra realización, un resto biológicamente activo acoplado al extremo N del segundo resto Fc es catalíticamente activo, p. ej., tiene actividad enzimática. En otra realización, un resto biológicamente activo acoplado al extremo N del segundo resto Fc se secreta mediante una célula como un zimógeno que requiere procesamiento enzimático adicional del resto biológicamente activo para activarse completamente, p. ej., FVII, FIX, o X).
55

En una realización, la invención se refiere a factores de coagulación que se secretan a partir de células en forma activa o activada sin la necesidad de activación adicional durante el procesamiento. Por ejemplo, el Factor VII se produce generalmente de forma recombinante como un zimógeno y requiere la activación durante la fabricación para

producir la forma activa para la administración. En una realización, un polipéptido de la invención se secreta a partir de la célula en la cual se expresa en forma activa para mejorar su capacidad de fabricación. Como se establece en mayor detalle más adelante, dichos factores de coagulación se pueden producir al expresar la cadena ligera de un factor de coagulación y la cadena pesada de un factor de coagulación por separado en el contexto de una molécula cscFc. La activación de dicha construcción se retrasa hasta más tarde en la vía de secreción durante el procesamiento, p. ej., cuando la proteína se co-localiza con enzimas de procesamiento activas en el aparato de trans-Golgi.

Una variedad de polipéptidos de diseños alternativos está dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, en una realización, una molécula de ácido nucleico de la invención especifica un polipéptido representado mediante la fórmula:



en secuencia lineal desde el extremo aminico al carboxílico en donde A es un resto biológicamente activo, F1 es un primer resto o dominio Fc, P1 es un sitio de escisión enzimática, L es un enlazador cscFc, P2 es un sitio de escisión enzimática, B es un resto biológicamente activo, F2 es un segundo resto o dominio Fc y "-" representa una unión peptídica. La fórmula (I) comprende al menos un A o B y opcionalmente ambos. A y B, si ambos están presentes, pueden ser iguales o diferentes. La fórmula (I) comprende al menos un P1 o P2 y opcionalmente ambos. P1 y P2, si ambos están presentes, pueden ser iguales o diferentes. La fórmula (I) comprende al menos un F1 y F2. F1 y F2, si ambos están presentes, pueden ser iguales o diferentes.

Los polipéptidos ilustrativos según la fórmula I incluyen: A-F1-P1-L-P2-F2; F1-P1-L-P2-B-F2; y F1-L-P2-B-F2.

En una realización, F1 y F2 comprenden cada uno un resto CH2 y uno CH3.

A. Restos o dominios Fc

Los restos Fc útiles como F1 y F2 para producir los polipéptidos de la presente invención se pueden obtener de varias fuentes diferentes. En realizaciones preferidas, un resto Fc del polipéptido se deriva de una inmunoglobulina humana. Sin embargo, se entiende que el resto Fc puede derivar de una inmunoglobulina de otra especie de mamífero, incluida, por ejemplo, una especie de roedor (p. ej., un ratón, rata, conejo, cobayo) o primate no humano (p. ej., chimpancé, macaco). Además, el dominio Fc del polipéptido o porción de este puede derivar de cualquier clase de inmunoglobulina, incluidas IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo de inmunoglobulina, incluidos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización preferida, se usa el isotipo humano IgG (p. ej., IgG1).

Una variedad de secuencias génicas de resto Fc (p. ej., secuencias génicas de región constante) están disponibles en forma de depósitos de acceso al público. Los dominios de región constante que comprenden una secuencia de resto Fc se pueden seleccionar por tener una función efectora particular (o por carecer de una función efectora particular) o con una modificación particular para reducir la inmunogenicidad. Muchas secuencias de anticuerpos y genes que codifican anticuerpos se han publicado y se pueden derivar secuencias de resto Fc adecuadas (p. ej., secuencias bisagra, CH2 y/o CH3, o porciones de estas) a partir de estas secuencias usando técnicas reconocidas en la técnica. El material genético obtenido usando cualquiera de los métodos precedentes a continuación puede alterarse o sintetizarse para obtener polipéptidos de la presente invención. Se apreciará, además, que el alcance de la presente invención abarca alelos, variantes y mutaciones de secuencias de ADN de región constante.

Las secuencias de resto Fc se pueden clonar, p. ej., usando la reacción en cadena de la polimerasa y cebadores que se seleccionan para amplificar el dominio de interés. Para clonar una secuencia de resto Fc a partir de un anticuerpo, se puede aislar el ARNm de hibridoma, bazo o linfocitos, transcribirse de forma inversa en ADN y amplificar los genes de anticuerpo mediante PCR. Los métodos de amplificación por PCR se describen en detalle en las patentes estadounidenses núms. 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; 4.965.188; y en, p. ej., "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, CA (1990); Ho et al. 1989. Gene 77:51; Horton et al. 1993. Methods Enzymol. 217:270). La PCR se puede iniciar mediante cebadores de región constante consenso o mediante cebadores más específicos en función de las secuencias de aminoácidos y ADN de cadena pesada y ligera publicadas. Según se describió anteriormente, la PCR también se puede usar para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de anticuerpo. En este caso, las bibliotecas se pueden someter a barrido mediante cebadores consenso o sondas homólogas más grandes, tales como sondas de región de constante de ratón. Se conocen numerosos conjuntos de cebadores adecuados para la amplificación de genes de anticuerpo en la técnica (p. ej., los cebadores hacia 5' basados en la secuencia del extremo N de anticuerpos purificados (Benhar y Pastan. 1994. Protein Engineering 7:1509); amplificación rápida de extremos de ADNc (Ruberti, F. et al. 1994. J. Immunol. Methods 173:33); secuencias líderes de anticuerpo (Larrick et al. 1989 Biochem. Biophys. Res. Commun. 160:1250). La clonación de secuencias de anticuerpo se describe adicionalmente en Newman et al., la patente estadounidense n.º 5.658.570, presentada el 25 de enero de 1995.

Los polipéptidos de la invención pueden comprender dos o más restos Fc (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos Fc). Estos dos o más restos Fc pueden formar una región Fc. En una realización, los restos Fc pueden ser de diferentes tipos. En una realización, al menos un resto Fc presente en el polipéptido comprende un dominio bisagra o porción de este. En otra realización, el polipéptido de la invención comprende al menos un resto Fc que

comprende al menos un dominio CH2 o porción de este. En otra realización, el polipéptido de la invención comprende al menos un resto Fc que comprende al menos un dominio CH3 o porción de este. En otra realización, el polipéptido de la invención comprende al menos un resto Fc que comprende al menos un dominio CH4 o porción de este. En otra realización, el polipéptido de la invención comprende al menos un resto Fc que comprende al menos un dominio bisagra o porción de este y al menos un dominio CH2 o porción de este (p. ej., en el sentido bisagra-CH2). En otra realización, el polipéptido de la invención comprende al menos un resto Fc que comprende al menos un dominio CH2 o porción de este y al menos un dominio CH3 o porción de este (p. ej., en el sentido CH2-CH3). En otra realización, el polipéptido de la invención comprende al menos un resto Fc que comprende al menos un dominio bisagra o porción de este, al menos un dominio CH2 o porción de este y al menos un dominio CH3 o porción de este, por ejemplo, en el sentido bisagra-CH2-CH3, bisagra-CH3-CH2 o CH2-CH3-bisagra).

En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende al menos una región Fc completa derivada de una o más cadenas pesadas de inmunoglobulina (p. ej., un dominio Fc que incluye los dominios bisagra, CH2 y CH3, aunque estos no deben derivar del mismo anticuerpo). En otras realizaciones, el polipéptido comprende al menos dos regiones Fc completas derivadas de una o más cadenas pesadas de inmunoglobulina. En realizaciones preferidas, el resto Fc completo deriva de una cadena pesada de inmunoglobulina IgG humana (p. ej., IgG1 humana).

En otra realización, un polipéptido de la invención comprende al menos un resto Fc que comprende un dominio CH3 completo (aproximadamente los aminoácidos 341-438 de una región Fc de anticuerpo según la numeración UE). En otra realización, un polipéptido de la invención comprende al menos un resto Fc que comprende un dominio CH2 completo (aproximadamente los aminoácidos 231-340 de una región Fc de anticuerpo según la numeración UE). En otra realización, un polipéptido de la invención comprende al menos un resto Fc que comprende al menos un dominio CH3 y al menos uno de una región bisagra (aproximadamente los aminoácidos 216-230 de una región Fc de anticuerpo según la numeración UE) y un dominio CH2. En una realización, un polipéptido de la invención comprende al menos un resto Fc que comprende un dominio bisagra y uno CH3. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende al menos un resto Fc que comprende un dominio bisagra, uno CH₂ y uno CH₃. En una realización, un resto Fc comprende o consiste en aminoácidos correspondientes a los números UE 221 a 447.

En realizaciones preferidas, el resto Fc deriva de una cadena pesada de inmunoglobulina IgG humana (p. ej., IgG1 humana).

En otra realización, un polipéptido de la invención comprende al menos un resto Fc que comprende un agente de combinación FcRn. Un agente de combinación de unión a FcRn es una molécula o porción de esta que se puede unir específicamente al receptor FcRn con el consecuente transporte activo por el receptor FcRn del agente de combinación de unión a FcRn. Unirse específicamente se refiere a dos moléculas que forman un complejo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se caracteriza por una afinidad elevada y una capacidad baja a moderada, según se diferencia de la unión no específica que normalmente tiene una afinidad baja con una capacidad moderada a alta. Típicamente, la unión se considera específica cuando la constante de afinidad K_A es mayor que 10^6 M^{-1} o, más preferiblemente, mayor que 10^8 M^{-1} . Si es necesario, la unión no específica se puede reducir sin afectar sustancialmente la unión específica al variar las condiciones de unión. El experto en la técnica puede optimizar las condiciones de unión adecuadas tales como la concentración de las moléculas, fuerza iónica de la disolución, temperatura, tiempo para la unión, concentración de agente de bloqueo (p. ej., seroalbúmina, caseína láctea), etc., usando técnicas rutinarias.

El receptor FcRn se ha aislado a partir de diversas especies de mamíferos, incluidos humanos. Se conocen las secuencias de FcRn humano, FcRn de mono, FcRn de rata y FcRn de ratón (Story et al. 1994, J. Exp. Med. 180:2377). El receptor FcRn se une a IgG (pero no a otras clases de inmunoglobulinas tales como IgA, IgM, IgD e IgE) a pH relativamente bajo, transporta activamente la IgG transcelularmente en sentido luminal a seroso, y después libera la IgG a pH relativamente más alto que se encuentra en los fluidos intersticiales. Se expresa en el tejido epitelial adulto (patentes estadounidenses núms. 6.485.726, 6.030.613, 6.086.875; WO 03/077834; US2003-0235536A1) incluido el epitelio pulmonar e intestinal (Israel et al. 1997, Immunology 92:69) epitelio tubular proximal renal (Kobayashi et al. 2002, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 282:F358) así como en el epitelio nasal, superficies vaginales y superficies del tracto biliar.

Los agentes de combinación de unión a FcRn de la presente invención abarcan moléculas que se pueden unir específicamente al receptor FcRn, incluida IgG entera, el fragmento Fc de IgG y otros fragmentos que incluyen la región de unión completa del receptor FcRn. La región de la porción Fc de IgG que se une al receptor FcRn se ha descrito en base a cristalografía de rayos X (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379). La principal área de contacto de Fc con FcRn es cerca de unión de los dominios CH2 y CH3. Los contactos entre Fc-FcRn están todos dentro de una cadena pesada de Ig simple. Los agentes de combinación de unión a FcRn incluyen IgG entera, el fragmento Fc de IgG y otros fragmentos de IgG que incluyen la región de unión completa de FcRn. Los principales sitios de contacto incluyen los residuos aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 y 314 del dominio CH2 y los residuos aminoácidos 385-387, 428 y 433-436 del dominio CH3. Las referencias hechas a la numeración de aminoácidos de inmunoglobulinas o fragmentos o regiones de inmunoglobulina se basan todas en Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.

La región Fc de IgG se puede modificar según procedimientos reconocidos tales como mutagénesis dirigida a sitio y similares para proporcionar la IgG modificada o fragmentos Fc o porciones de esta a los que se unirá FcRn. Dichas modificaciones incluyen modificaciones remotas con respecto a los sitios de contacto con FcRn, así como modificaciones dentro de los sitios de contacto que conservan o incluso potencian la unión al FcRn. Por ejemplo, los siguientes residuos aminoacídicos simples en Fc de IgG1 humana (Fc γ 1) se pueden sustituir sin pérdida significativa de la afinidad de unión de Fc por FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A y K447A, donde, por ejemplo, P238A representa prolina natural sustituida por alanina en la posición número 238. Como un ejemplo, una realización específica incorpora la mutación N297A que elimina un sitio de N-glicosilación altamente conservado. Además de la alanina, otros aminoácidos se pueden sustituir por los aminoácidos naturales en las posiciones especificadas anteriormente. Las mutaciones se pueden introducir solamente en Fc para originar más de cien agentes de combinación de unión a FcRn diferentes de Fc natural. Además, se pueden introducir combinaciones de dos, tres o más de estas mutaciones individuales juntas para originar cientos de agentes de combinación de unión a FcRn más. Asimismo, uno de los agentes de combinación de unión a FcRn de una construcción de la invención se puede mutar y el otro agente de combinación de unión a FcRn no, o se pueden mutar ambos, pero con mutaciones diferentes. Cualquiera de las mutaciones descritas en la presente memoria, incluida N297A, se puede usar para modificar Fc, independientemente de la molécula biológicamente activa (p. ej., EPO, IFN, Factor VII, Factor IX, T20).

Ciertas mutaciones de las mencionadas anteriormente pueden conferir una nueva funcionalidad al agente de combinación de unión a FcRn. Por ejemplo, una realización incorpora N297A, que elimina un sitio de N-glicosilación altamente conservado. El efecto de esta mutación es reducir la inmunogenicidad, potenciado así la semivida en circulación del agente de combinación de unión a FcRn y hacer que el agente de combinación de unión FcRn se vuelva incapaz de unirse a Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIIA, sin comprometer la afinidad por FcRn (Routledge et al. 1995, *Transplantation* 60:847; Friend et al. 1999, *Transplantation* 68:1632; Shields et al. 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591). Como un ejemplo adicional de una nueva funcionalidad que surge de las mutaciones descritas anteriormente, la afinidad por FcRn se puede aumentar más allá de la natural en algunas instancias. Esta afinidad aumentada puede reflejar una "asociación" mayor, una "disociación" o una "asociación" mayor y una "disociación" menor. Las mutaciones que se cree que imparten afinidad aumentada por FcRn incluyen T256A, T307A, E380A y N434A (Shields et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591).

Además, al menos tres receptores gamma Fc humanos parecen reconocer un sitio de unión en IgG dentro de la región bisagra inferior, generalmente los aminoácidos 234-237. Por lo tanto, otro ejemplo de nueva funcionalidad y posible inmunogenicidad reducida pueden surgir de mutaciones en esta región, como por ejemplo al reemplazar los aminoácidos 233-236 de la IgG1 humana "ELLG" por la secuencia correspondiente de IgG2 "PVA" (con una eliminación de aminoácido). Se ha mostrado que Fc γ I, Fc γ RII y Fc γ RIII, que median diversas funciones efectoras no se unirán a IgG1 cuando se han introducido dichas mutaciones. Ward y Ghetie 1995, *Therapeutic Immunology* 2:77 y Armour et al. 1999, *Eur. J. Immunol.* 29:2613.

En una realización, el agente de combinación de unión a FcRn es un polipéptido que incluye la secuencia PKNSSMISNTP (SEQ ID NO: 12) y, opcionalmente, incluye además una secuencia seleccionada de HQSLGTQ (SEQ ID NO: 13), HQNLSDGK (SEQ ID NO: 14), HQNISDGK (SEQ ID NO: 24), o VISSHLGQ (SEQ ID NO: 25) (patente estadounidense n.º 5.739.277).

Dos receptores FcRn se pueden unir a una molécula Fc simple. Los datos cristalográficos sugieren que cada molécula FcRn se une a un polipéptido simple del homodímero Fc. En una realización, enlazar el agente de combinación de unión a FcRn, p. ej., un fragmento Fc de una IgG, con una molécula biológicamente activa proporciona un medio para suministrar la molécula biológicamente activa por vía oral, bucal, sublingual, rectal, vaginal, como un aerosol administrado nasalmente o a través de una vía pulmonar o a través de una vía ocular. En otra realización, la proteína quimérica se puede administrar de manera invasiva, p. ej., subcutáneamente, intravenosamente.

Los dominios de región constante o porciones de estos que componen un resto Fc de un polipéptido de la invención se pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede comprender un dominio CH2 o porción de este derivado de una molécula IgG1 y una región CH3 o porción de esta derivada de una molécula IgG3. En otro ejemplo, un polipéptido puede comprender un resto Fc que comprende un dominio bisagra derivado, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG3. Según se establece en la presente memoria, el experto en la técnica entenderá que un resto Fc se puede alterar de manera que varíe en la secuencia de aminoácidos con respecto a una molécula de anticuerpo de origen natural.

En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una región scFc que comprende uno o más restos Fc truncados que sin embargo son suficientes para conferir propiedades de unión al receptor Fc (FcR) a la región Fc.

Por ejemplo, la porción de un dominio Fc que se une a FcRn (es decir, la porción de unión a FcRn) comprende de aproximadamente los aminoácidos 282-438 de IgG1, numeración UE (con los sitios de contacto primarios que son los aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 y 314 del dominio CH2 y los residuos aminoacídicos 385-387, 428 y 433-436 del dominio CH3. Por lo tanto, un resto Fc de un polipéptido de la invención puede comprender o consistir en una porción de unión a FcRn. Las porciones de unión a FcRn pueden derivarse de cadenas pesadas de cualquier isotipo, incluido IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización, se usa una porción de unión a FcRn de un anticuerpo del isotipo humano IgG1. En otra realización, se usa una porción de unión a FcRn de un anticuerpo del isotipo humano IgG4.

En una realización, un polipéptido de la invención carece de uno o más dominios de región constante de una región Fc completa, es decir, se han eliminado parcialmente o completamente. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la invención carecerán de un dominio CH2 completo (construcciones Δ CH2). Los expertos en la técnica apreciarán que dichas construcciones pueden preferirse debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 sobre la tasa catabólica del anticuerpo. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la invención comprenden regiones Fc eliminadas del dominio CH2 derivadas de un vector (p. ej., de IDEC Pharmaceuticals, San Diego) que codifican un dominio de región constante de IgG₁ humana (véase, p. ej., WO 02/060955A2 y WO02/096948A2). Este vector ilustrativo se manipula para eliminar el dominio CH2 y proporcionar un vector sintético que expresa una región constante de IgG₁ con dominio eliminado. Se señala que estas construcciones ilustrativas preferiblemente se manipulan para fusionar un dominio CH3 de unión directamente con una región bisagra del dominio Fc respectivo.

En otras construcciones puede ser deseable proporcionar un resto espaciador entre uno o más restos Fc constituyentes. Por ejemplo, un resto espaciador se puede colocar entre una región bisagra y un dominio CH2 y/o entre un dominio CH2 y uno CH3. Por ejemplo, las construcciones compatibles podrían expresarse en donde el dominio CH2 se ha eliminado y el dominio CH3 restante (sintético o no sintético) se une a la región bisagra con un espaciador de 5 - 20 aminoácidos. Dicho espaciador se puede agregar, por ejemplo, para garantizar que los elementos reguladores del dominio de región constante permanezcan libres y accesibles o que la región bisagra permanezca flexible. Preferiblemente, cualquier péptido enlazador compatible con la presente invención será relativamente no inmunógeno y no evitará el plegado adecuado de la región scFc.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la invención pueden comprender una región Fc dimérica que comprende restos Fc de la misma composición de secuencia, o sustancialmente la misma (denominada en la presente memoria "región Fc homodimérica"). En otras realizaciones, los polipéptidos de la invención pueden comprender una región Fc dimérica que comprende al menos dos restos Fc que tienen una composición de secuencia diferente (*es decir*, denominada en la presente memoria "región Fc heterodimérica"). En una realización ilustrativa, la región Fc heterodimérica comprende una sustitución de aminoácido en un primer resto Fc (p. ej., una sustitución de aminoácido de Asparagina en la posición UE 297), pero no en un segundo resto Fc.

En determinadas realizaciones, la región Fc está hemiglicosilada. Por ejemplo, la región scFc heteromérica puede comprender un primer resto Fc glicosilado (p. ej., una región CH2 glicosilada) y un segundo resto Fc aglicosilado (p. ej., una región CH2 aglicosilada), en donde un enlazador se intercala entre los restos Fc glicosilados y aglicosilados. En otras realizaciones, la región Fc está completamente glicosilada, es decir, todos los restos Fc están glicosilados. En realizaciones adicionales, la región Fc puede estar aglicosilada, es decir, ninguno de los restos Fc está glicosilado.

En ciertas realizaciones, un resto Fc empleado en un polipéptido de la invención se altera, p. ej., mediante mutación de aminoácido (p. ej., adición, eliminación o sustitución). Según se usa en la presente memoria, el término "resto Fc variante" se refiere a un resto Fc que tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con el Fc natural del cual deriva el resto Fc. Por ejemplo, en donde el resto Fc deriva de un anticuerpo IgG1 humano, una variante comprende al menos una mutación de aminoácido (p. ej., sustitución) en comparación con un aminoácido natural en la posición correspondiente de la región Fc de IgG1 humana.

La(s) sustitución(es) de aminoácido de una variante Fc se puede ubicar en una posición dentro del resto Fc a la que se hace referencia como correspondiente al número de posición que se le daría a dicho residuo en una región Fc en un anticuerpo (según se establece usando la convención de numeración UE). Un experto en la técnica puede generar sin inconvenientes alineaciones para determinar cuál sería el número UE correspondiente a una posición en un resto Fc.

En una realización, la variante Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio bisagra o porción de este. En otra realización, la variante Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio CH2 o porción de este. En otra realización, la variante Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio CH3 o porción de este. En otra realización, la variante Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio CH4 o porción de este.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la invención comprenden una variante Fc que comprende más de una sustitución de aminoácido. Los polipéptidos de la invención pueden comprender, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos están ubicadas espacialmente entre sí con un intervalo de al menos 1 posición de aminoácido o más, por ejemplo, al menos 2, 3, 4,

- 5, 6, 7, 8, 9 o 10 posiciones de aminoácido o más. Más preferiblemente, los aminoácidos manipulados están ubicados espacialmente separados entre sí mediante un intervalo de al menos 5, 10, 15, 20 realizaciones, los polipéptidos de la invención comprenden una variante Fc que comprende más de una sustitución de aminoácido. Los polipéptidos de la invención pueden comprender, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos están ubicadas espacialmente entre sí con un intervalo de al menos 1 posición de aminoácido o más, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 posiciones de aminoácido o más. Más preferiblemente, los aminoácidos manipulados están ubicados espacialmente separados entre sí mediante un intervalo de al menos 5, 10, 15, 20 o 25 posiciones de aminoácidos o más.
- 5 En ciertas realizaciones, la variante Fc confiere un cambio en al menos una función efectora impartida por una región Fc que comprende dicho dominio Fc natural (p. ej., una mejora o reducción en la capacidad de la región Fc para unirse a receptores Fc (p. ej. FcγRI, FcγRII, o FcγRIII) o proteínas de complemento (p. ej., C1q), o para desencadenar la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), la fagocitosis o a citotoxicidad dependiente de complemento (CDCC)). En otras realizaciones, la variante Fc proporciona un residuo cisteína manipulado
- 10 Los polipéptidos de la invención pueden emplear variantes Fc reconocidas en la técnica que se conocen por impartir un cambio (p. ej., una mejora o reducción) en la función efectora y/o la unión a FcR o FcRn. Específicamente, una molécula de unión de la invención puede incluir, por ejemplo, un cambio (p. ej., una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos divulgadas en las Publicaciones PCT Internacionales WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO04/044859, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2, y WO06/085967A2; las publicaciones de patentes estadounidenses núms. US2007/0231329, US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US20070248603, US20070286859, US20080057056; o las patentes estadounidenses 5.648.260; 5.739.277; 5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; 7.083.784; y 7.317.091.
- 15 En una realización, el cambio específico (p. ej., la sustitución específica de uno o más aminoácidos descrita en la técnica) se puede hacer en una o más de las posiciones de aminoácidos descritas. En otra realización, se puede hacer un cambio diferente en una o más de las posiciones de aminoácidos descritas (p. ej., la sustitución diferente de una o más posiciones de aminoácidos descritas en la técnica).
- 20 En ciertas realizaciones, un polipéptido de la invención comprende una sustitución de aminoácido en un resto Fc que altera las funciones efectoras independientes del antígeno del anticuerpo, en particular la semivida en circulación del anticuerpo.
- 25 Dichos polipéptidos exhiben unión aumentada o reducida a FcRn cuando se comparan con los polipéptidos que carecen de estas sustituciones y, por lo tanto, tienen una semivida en suero aumentada o reducida, respectivamente. Se anticipa que las variantes Fc con afinidad mejorada para FcRn tengan semividas en suero más extensas, y dichas moléculas tienen aplicaciones útiles en métodos para tratar mamíferos donde se desea la semivida extensa del polipéptido administrado, p. ej., para tratar una enfermedad o trastorno crónico (véase, p. ej., las patentes estadounidenses 7.348.004, 7.404.956 y 7.862.820). En cambio, se espera que las variantes Fc con afinidad de unión a FcRn reducida tengan semividas más cortas, y dichas moléculas son también útiles, por ejemplo, para la administración a un mamífero donde un tiempo de circulación reducido puede ser ventajoso, p. ej., para la generación de imágenes de diagnóstico in vivo o en situaciones donde el polipéptido de partida tiene efectos secundarios tóxicos cuando está presente en la circulación durante períodos prolongados. Las variantes Fc con afinidad de unión por FcRn reducida tienen también menos probabilidad de cruzar la placenta y, por lo tanto, son también útiles en el tratamiento de enfermedades o trastorno en mujeres embarazadas. Además, otras aplicaciones en las que la afinidad de unión a FcRn reducida puede desearse incluyen aquellas aplicaciones en las que se desea la localización en el cerebro, riñón e/o hígado. En una realización ilustrativa, los polipéptidos de la invención exhiben transporte reducido a través del epitelio de glomérulos renales desde la vasculatura. En otra realización, los polipéptidos de la invención exhiben transporte reducido a través de la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés) desde el cerebro hacia el espacio vascular. En una realización, un polipéptido con unión a FcRn alterada comprende al menos un resto Fc (p. ej., uno o dos restos Fc) que tiene una o más sustituciones de aminoácidos dentro del "bucle de unión a FcRn" de un resto Fc. El bucle de unión a FcRn está comprendido por los residuos aminoacídicos 280-299 (según la numeración UE) de un resto Fc de longitud completa natural. En otras realizaciones, un polipéptido de la invención que tiene afinidad de unión a FcRn alterada comprende al menos un resto Fc (p. ej., uno o dos restos Fc) que tiene una o más sustituciones de aminoácidos dentro de la "zona de contacto" con FcRn de 15 Å. Según se usa en la presente memoria, el término "zona de contacto" con FcRn de 15 Å incluye los residuos en las siguientes posiciones del resto Fc de longitud completa natural: 243-261, 275-280, 282-293, 302-319, 336-348, 367, 369, 372-389, 391, 393, 408, 424, 425-440 (numeración UE). En realizaciones preferidas, un polipéptido de la invención que tiene afinidad de unión a FcRn alterada comprende al menos un resto Fc (p. ej., uno o dos restos Fc) que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en una posición de aminoácido correspondiente a una cualquiera de las siguientes posiciones UE: 256, 277-281, 283-288, 303-309, 313, 338, 342, 376, 381, 384, 385, 387, 434 (p. ej., N434A o N434K) y 438. Las sustituciones de aminoácidos ilustrativas que alteraron la actividad de unión a FcRn se describen en la Publicación PCT Internacional n.º WO05/047327.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

Un polipéptido de la invención también puede comprender una sustitución de aminoácido reconocida en la técnica que altera la glicosilación del polipéptido. Por ejemplo, la región scFc del polipéptido de unión puede comprender un resto Fc que tiene una mutación que conduce a glicosilación reducida (p. ej., glicosilación enlazada a N u O) o puede comprender una glicofoma alterada del resto Fc natural (p. ej., un glicano con bajo contenido de fucosa o sin fucosa).

En otras realizaciones, un polipéptido de la invención comprende al menos un resto Fc que tiene un residuo cisteína manipulado o análogo de esto que está ubicado en la superficie expuesta a disolvente. Preferiblemente, el residuo cisteína manipulado o análogo de esto no interfiere con una función efectora conferida por la región scFc. Más preferiblemente, la alteración no interfiere con la capacidad de la región scFc de unirse a receptores Fc (p. ej., FcγRI, FcγRII o FcγRIII) o proteínas de complemento (p. ej., C1q), o de desencadenar una función efectora inmunitaria (p. ej., citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis o citotoxicidad dependiente de complemento (CDCC)).

En una realización, un polipéptido no procesado de la invención puede comprender una región Fc genéticamente fusionada (es decir, región scFc) que tiene dos o más de sus restos Fc constituyentes seleccionados independientemente de los restos Fc descritos en la presente memoria. En una realización, los restos Fc de una región Fc dimerica son iguales. En otra realización, al menos dos de los restos Fc son diferentes. Por ejemplo, los restos Fc de los polipéptidos de la invención comprenden la misma cantidad de residuos aminoacídicos o pueden diferir en longitud en uno o más residuos aminoacídicos (p. ej., en aproximadamente 5 residuos aminoacídicos (p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5 residuos aminoacídicos), aproximadamente 10 residuos, aproximadamente 15 residuos, aproximadamente 20 residuos, aproximadamente 30 residuos, aproximadamente 40 residuos o aproximadamente 50 residuos). En aún otras realizaciones, los restos Fc de los polipéptidos de la invención pueden diferir en secuencia en una o más posiciones de aminoácidos. Por ejemplo, al menos dos de los restos Fc pueden diferir en aproximadamente 5 posiciones de aminoácidos (p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos), aproximadamente 10 posiciones, aproximadamente 15 posiciones, aproximadamente 20 posiciones, aproximadamente 30 posiciones, aproximadamente 40 posiciones o aproximadamente 50 posiciones).

B. Enlazadores polipeptídicos

Las construcciones genéticas de la presente invención codifican polipéptidos que comprenden dos o más dominios o restos Fc enlazados a través de un enlazador cscFc para formar una región Fc comprendida en una cadena polipeptídica simple. El enlazador cscFc está flanqueado por dos sitios de escisión enzimática, p. ej., sitios para el procesamiento mediante una enzima intracelular. La escisión del polipéptido en el al menos un sitio de escisión enzimática resulta en un polipéptido que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas. Estos enlazadores se denominan en la presente memoria "enlazadores cscFc" y el enlazador cscFc se intercala entre los dos restos Fc de un polipéptido que lo comprende. Si el enlazador cscFc conecta dos restos Fc de manera contigua en la secuencia polipeptídica lineal, se trata de un enlace "directo". En cambio, los enlazadores cscFc pueden enlazar el primer resto Fc con un resto de unión que, a su vez, se enlaza con el segundo resto Fc y forma, de esta manera, un enlace indirecto.

Según se estableció anteriormente, se pueden usar opcionalmente otros enlazadores polipeptídicos en una construcción de la invención, p. ej., para conectar un resto biológicamente activo con un resto Fc. Estos enlazadores polipeptídicos se denominan en la presente espaciadores. Algunas ubicaciones ilustrativas de espaciadores que se pueden usar en conexión con la invención incluyen, p. ej., polipéptidos que comprenden aminoácidos GlySer tales como los establecidos en las figuras adjuntas y descritos en más detalle a continuación.

En una realización, el enlazador polipeptídico es sintético, es decir, de origen no natural. En una realización, un enlazador polipeptídico incluye péptidos (o polipéptidos) (que pueden ser o no de origen natural) que comprenden una secuencia de aminoácidos que enlaza o fusiona genéticamente una primera secuencia de aminoácidos lineal con una segunda secuencia de aminoácidos lineal con la cuales no está naturalmente enlazada ni fusionada genéticamente en la naturaleza. Por ejemplo, en una realización, el enlazador polipeptídico puede comprender polipéptidos de origen no natural que son formas modificadas de polipéptidos de origen natural (p. ej., que comprenden una mutación tal como una adición, sustitución o eliminación). En otra realización, el enlazador polipeptídico puede comprender aminoácidos de origen no natural. En otra realización, el enlazador polipeptídico puede comprender aminoácidos de origen natural que están en una secuencia lineal que no se encuentra en la naturaleza. En aún otra realización, el enlazador polipeptídico puede comprender una secuencia polipeptídica de origen natural.

En ciertas realizaciones, un enlazador polipeptídico se puede usar para fusionar restos Fc idénticos para formar, de esta manera una región scFc homomérica. En otras realizaciones, un enlazador polipeptídico se puede usar para fusionar diferentes restos Fc (p. ej., un resto Fc natural y una variante de resto Fc) para formar, de esta manera, una región scFc heteromérica.

En otra realización, un enlazador polipeptídico comprende o consiste en un enlazador gly-ser. En una realización, un enlazador cscFc comprende al menos una porción de una bisagra de inmunoglobulina y un enlazador gly-ser. Según se usa en la presente memoria, el término "enlazador gly-ser" se refiere a un péptido que consiste en los residuos

glicina y serina. Un enlazador gly/ser ilustrativo comprende una secuencia de aminoácidos de la fórmula (Gly₄Ser)_n (SEQ ID NO: 4), en donde es un número entero positivo (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10). Un enlazador gly/ser preferido es (Gly₄Ser)₂ (SEQ ID NO:29), (Gly₄Ser)₄ (SEQ ID NO:6) o (Gly₄Ser)₆. (SEQ ID NO: 5) Otro enlazador gly-ser ilustrativo es GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 30). En ciertas realizaciones, dicho enlazador gly-ser se puede insertar entre otras dos secuencias del enlazador polipeptídico (p. ej., cualquiera de las secuencias del enlazador polipeptídico descritas en la presente memoria). En otras realizaciones, un enlazador gly-ser se acopla en uno o ambos extremos de otra secuencia del enlazador polipeptídico (p. ej., cualquiera de las secuencias del enlazador polipeptídico descritas en la presente memoria). En aún otras realizaciones, dos o más enlazador gly-ser se incorporan en serie en un enlazador polipeptídico. En una realización, un enlazador polipeptídico de la invención comprende al menos una porción de una región bisagra superior (p. ej., derivada de una molécula IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), al menos una porción de una región bisagra media (p. ej., derivada de una molécula IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) y una serie de residuos aminoácidos gly/ser (p. ej., un enlazador gly/ser tal como (Gly₄Ser)_n) (SEQ ID NO:4)).

Los enlazadores polipeptídicos de la invención tienen al menos un aminoácido de longitud y pueden tener longitudes variables. En una realización, un enlazador polipeptídico de la invención tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Según se usa en este contexto, el término "aproximadamente" indica +/- dos residuos aminoácidos. Dado que la longitud del enlazador debe ser un número entero positivo, la longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, significa una longitud de 1-3 a 48-52 aminoácidos de longitud. En otra realización, un enlazador polipeptídico de la invención tiene de aproximadamente 10-20 aminoácidos de longitud. En otra realización, un enlazador polipeptídico de la invención tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En otra realización, un enlazador polipeptídico de la invención tiene de aproximadamente 20 a aproximadamente 45 aminoácidos de longitud. En otra realización, un enlazador polipeptídico de la invención tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 o aproximadamente 20 a aproximadamente 30 aminoácidos de longitud. En otra realización, un enlazador polipeptídico de la invención tiene de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50 o 60 aminoácidos de longitud.

En una realización, un enlazador polipeptídico de la invención tiene 20 o 30 aminoácidos de longitud.

Los enlazadores polipeptídicos se pueden introducir en secuencias polipeptídicas usando técnicas conocidas en la técnica. Las modificaciones se pueden confirmar mediante análisis de secuencia de ADN.

El ADN plasmídico se puede usar para transformar células hospedantes para la producción estable de los polipéptidos producidos.

C. Sitios de escisión enzimática

En una instancia, uno o más sitio(s) de escisión enzimática flanquea(n), es decir, está(n) adyacente a (antes o después de) un enlazador cscFc (L) de un polipéptido no procesado de la descripción que forma(n) un enlazador scFc escindible. En una realización de una construcción que codifica un polipéptido de la invención, un sitio de escisión se fusiona en ambos extremos de un enlazador cscFc (L). Por ejemplo, en una realización, el polipéptido se representa mediante la fórmula:

$$A-F1-P1- L-P2-B-F2 \quad (I)$$

en secuencia lineal desde el extremo amínico al carboxílico en donde A es un resto biológicamente activo, F1 es un primer resto o dominio Fc, P1 es un sitio de escisión enzimática, L es un enlazador cscFc, P2 es un sitio de escisión enzimática, B es un resto biológicamente activo, F2 es un segundo resto o dominio Fc y "-" representa una unión peptídica. La fórmula (I) comprende al menos un A o B y opcionalmente ambos. A y B, si ambos están presentes, pueden ser iguales o diferentes. La fórmula (I) comprende P1 y P2, P1 y P2 pueden ser iguales o diferentes. La fórmula (I) comprende al menos un F1 y F2. F1 y F2, si ambos están presentes, pueden ser iguales o diferentes. En una realización, P1 y P2 están ambos presentes y son reconocidos por la misma o por enzimas diferentes.

En una realización, uno o ambos sitios de escisión enzimática son un sitio de procesamiento intracelular reconocido por un miembro de la familia furina de enzimas, p. ej., furina, PC2, PC1/PC3, PC4, PACE4, PC5/PC6 y LPC/PC7/PC8/SPC7. Los sitios de escisión ilustrativos para esta familia de enzimas incluyen una secuencia de aminoácidos que comprende el motivo Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO:34). Se conocen otros sitios de escisión en la técnica.

En otra realización, un sitio de escisión por Factor XIa o Xa se puede incorporar en una construcción de la invención. Los sitios de escisión por FXIa ilustrativos incluyen, p. ej., TQSFNDFTR y SVSQTSKLTR. Los sitios de escisión por trombina ilustrativos incluyen, p. ej., DFLAEGGGVR, TTKIKPR, LVPRG (SEQ ID NO:35) y una secuencia que comprende o consiste en ALRPR (p. ej. ALRPRVVGGA).

En una instancia, un enlazador scFc se escinde en un sitio (p. ej., cuando P1 está presente). En una realización, un enlazador scFc se escinde en dos sitios (p. ej., cuando P1 y P2 están presentes). En una realización, alguna porción del enlazador puede permanecer después de la escisión en el al menos un sitio de escisión enzimática. Para minimizar la presencia de secuencias de aminoácidos extrañas, se pueden incluir dos sitios de escisión en un

polipéptido de la invención. En algunas realizaciones, todo o sustancialmente todo el enlazador se extirpa, mientras que, en algunas realizaciones, una porción del sitio de escisión puede permanecer, p. ej., cuatro argininas del sitio de escisión RRRR.

D. Restos biológicamente activos

- 5 Los polipéptidos de la invención comprenden al menos un resto biológicamente activo. Dicho resto puede ser biológicamente activo como una cadena simple, o puede necesitar la asociación con otra cadena polipeptídica (p. ej., mediante dimerización), o puede necesitar escindirse enzimáticamente para impartir actividad biológica.

10 Los polipéptidos de la invención pueden comprender solo un resto biológicamente activo (que crea una molécula que es monovalente con respecto al resto biológicamente activo, pero que es multimérica (p. ej., dimérica) con respecto a la cantidad de cadenas polipeptídicas presente después del procesamiento o escisión). Los ejemplos de dichas moléculas se muestran en el documento US 7404956.

15 En una realización, un resto biológicamente activo está enlazado funcionalmente (p. ej., a través de un enlazador polipeptídico) o directamente mediante una unión peptídica con el extremo C y/o el extremo N de un resto Fc. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la invención pueden comprender dos o más restos biológicamente activos. En una realización, los restos biológicamente activos son idénticos. En otra realización, los restos biológicamente activos son diferentes o son cada uno subunidades o cadenas separadas de una molécula funcional.

20 En ciertos aspectos, un polipéptido de la invención comprende más de un resto biológicamente activa y es multivalente, es decir, tiene al menos un resto biológicamente activo que tiene una primera actividad biológica y al menos un segundo resto biológicamente activo que tiene una segunda actividad biológica. En ciertas realizaciones, al menos un resto biológicamente activo de la invención es una región de unión a antígeno de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este (p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito *supra*).

25 En otras realizaciones, dos o más restos biológicamente activos iguales o diferentes están enlazados entre sí (p. ej., a través de un enlazador polipeptídico) en serie, y la matriz en tándem de restos biológicamente activos está enlazada funcionalmente (p. ej., conjugada químicamente o fusionada genéticamente (p. ej., directamente o a través de un enlazador polipeptídico)) con el extremo C o el extremo N de una región Fc simple genéticamente fusionada (es decir, una región scFc simple) o una matriz en tándem de regiones Fc genéticamente fusionadas (es decir, regiones scFc en tándem). En otras realizaciones, la matriz en tándem de restos biológicamente activos está enlazada funcionalmente con el extremo C y el extremo N de una región Fc simple genéticamente fusionada o una matriz en tándem de regiones Fc genéticamente fusionadas.

30 En una realización, un polipéptido de la invención comprende al menos uno de un resto biológicamente activo que es un sitio de unión a antígeno (p. ej., un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, variante de anticuerpo o fragmento de anticuerpo), una porción de unión a receptor de un ligando, o una porción de unión a ligando de un receptor.

35 En una realización, el resto biológicamente activo modula la activación o inhibición celular (p. ej., al unirse a un receptor de superficie celular y resultar en la transmisión de una señal de activación o inhibición). En una realización, el resto biológicamente activo es capaz de iniciar la transducción de una señal que resulta en la muerte de la célula (p. ej., mediante una vía inducida por señal celular, mediante fijación de complemento o exposición a un carga eficaz (p. ej., una carga eficaz tóxica) presente en la molécula de unión), o que modula una enfermedad o trastorno en un sujeto (p. ej., al mediar o promover la destrucción celular, al promover la lisis de un coágulo de fibrina o promover la formación del coágulo, o al modular la cantidad de una sustancia que está biodisponible (p. ej., al potenciar o reducir la cantidad de un ligando tal como TNF α en el sujeto)). En otra realización, los polipéptidos de la invención tienen al menos un sitio de unión específico para un antígeno dirigido a la reducción o eliminación, p. ej., un antígeno de superficie celular o un antígeno soluble, junto con al menos una región Fc genéticamente fusionada (es decir, una región scFc).

45 En otra realización, la unión de un resto biológicamente activo de la invención con una molécula diana (p. ej., antígeno) resulta en la reducción o eliminación de la molécula diana o una célula que expresa la molécula diana, p. ej., desde un tejido o desde la circulación. En otra realización, el resto biológicamente activo tiene al menos un sitio de unión específico para una molécula diana que se puede usar para detectar la presencia de la molécula diana (p. ej., para detectar un contaminante o diagnosticar una afección o trastorno). Los restos biológicamente activos se describen adicionalmente más adelante.

50 i Porciones de unión a antígeno

En ciertas realizaciones, un polipéptido de la invención comprende al menos un resto biológicamente activo que es un sitio de unión, p. ej., una porción de unión a antígeno de un anticuerpo.

55 En otras realizaciones, un sitio de unión de un polipéptido de la invención puede comprender una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. El término "porción de unión a antígeno" se refiere a un fragmento polipeptídico de una inmunoglobulina, anticuerpo o variante de anticuerpo que se une al antígeno o compete con el anticuerpo intacto (es

decir, con el anticuerpo intacto del cual deriva) por la unión al antígeno (es decir, unión específica). Por ejemplo, dichas porciones de unión a antígeno se pueden derivar de cualesquiera de los anticuerpos o variantes de anticuerpo conocidas en la técnica. Las porciones de unión a antígeno se pueden producir mediante métodos recombinantes o bioquímicos que se conocen en la técnica. Los fragmentos de unión a antígeno ilustrativos incluyen regiones VH y VL, Fv, Fab, Fab', y (Fab')₂.

En realizaciones ilustrativas, una construcción genética que codifica un polipéptido de la invención comprende una secuencia nucleotídica que codifica al menos un fragmento de unión a antígeno que está enlazado funcionalmente (p. ej., conjugado químicamente o fusionado genéticamente (p. ej., directamente fusionado o fusionado a través de un enlazador polipeptídico)) con el extremo C y/o el extremo N de una región Fc genéticamente fusionada (es decir, una región scFc). En una realización ilustrativa, un polipéptido inmaduro de la invención comprende un fragmento de unión a antígeno (p. ej., un Fab) que está enlazado funcionalmente con el extremo N (o extremo C) de al menos una región Fc fusionada genéticamente a través de un dominio bisagra o porción de este (p. ej., una bisagra IgG1 o porción de esta, p. ej., una bisagra IgG1 humana). Una porción de dominio bisagra ilustrativa comprende la secuencia DKTHTCPPCPAPPELLGG(SEQ ID NO: 28).

En otras realizaciones, un resto biológicamente activo de la invención puede comprender un sitio de unión de una molécula de unión de cadena simple (p. ej., una región variable de cadena simple o scFv). Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena simple (la patente estadounidense n.º 4.694.778; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); y Ward et al., Nature 334:544-554 (1989)) se pueden adaptar para producir moléculas de cadena simple. Los anticuerpos de cadena simple se forman al enlazar los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, que resulta en un anticuerpo de cadena simple. También se pueden usar las técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988)).

Las secuencias de región variable de cadena simple comprenden un polipéptido simple que tiene uno o más sitios de unión a antígeno, p. ej., un dominio V_L enlazado mediante un enlazador flexible a un dominio V_H. Los dominios V_L y/o V_H pueden derivar de cualesquiera de los anticuerpos o variantes de anticuerpo descritos *supra*. Las moléculas scFv se pueden construir en un sentido V_H-enlazador-V_L o en un sentido V_L-enlazador-V_H. El enlazador flexible que enlaza los dominios V_L y V_H que componen el sitio de unión a antígeno preferiblemente comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 residuos aminoácídicos. En una realización, el enlazador polipeptídico es un enlazador polipeptídico gly-ser. Un enlazador polipeptídico gly/ser ilustrativo tiene la fórmula (Gly4Ser)_n, en donde n es un número entero positivo (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o 6). Se conocen otros enlazadores polipeptídicos en la técnica. Los anticuerpos que tienen secuencias de región variable de cadena simple (p. ej., anticuerpos Fv de cadena simple) y los métodos para producir dichos anticuerpos de cadena simple se conocen en la técnica (véase, p. ej., Ho et al. 1989. Gene 77:51; Bird et al. 1988 Science 242:423; Pantoliano et al. 1991. Biochemistry 30:10117; Milenic et al. 1991. Cancer Research 51:6363; Takkinen et al. 1991. Protein Engineering 4:837).

En ciertas realizaciones, una molécula scFv empleada en un polipéptido de la invención es una molécula scFv estabilizada. En una realización, la molécula cFv estabilizada puede comprender un enlazador scFv intercalado entre un dominio V_H y un dominio V_L, en donde los dominios V_H y V_L están enlazados mediante una unión disulfuro entre un aminoácido en el V_H y un aminoácido en el dominio V_L. En otras realizaciones, la molécula scFv estabilizada puede comprender un enlazador scFv que tiene una longitud o composición optimizada. En aún otras realizaciones, la molécula scFv estabilizada puede comprender un dominio V_H o V_L que tiene al menos una(s) sustitución(es) de aminoácidos estabilizante(s). En aún otra realización, una molécula scFv estabilizada puede tener al menos dos de las características estabilizantes indicadas anteriormente.

Las moléculas scFv estabilizadas tienen estabilidad proteica mejorada o imparten estabilidad proteica mejorada al polipéptido al cual se enlazan funcionalmente. Los enlazadores scFv preferidos de la invención mejoran la estabilidad térmica de un polipéptido de la invención en al menos aproximadamente 2 °C o 3 °C en comparación con un polipéptido convencional. Se pueden hacer comparaciones, por ejemplo, entre las moléculas scFv de la invención. En ciertas realizaciones preferidas, la molécula scFv estabilizada comprende un enlazador scFv (Gly4Ser)₄ y una unión disulfuro que enlaza el aminoácido 44 de V_H y el aminoácido 100 de V_L. Otras moléculas scFv estabilizadas ilustrativas que se pueden emplear en los polipéptidos de la invención se describen en la Solicitud provisional de patente estadounidense n.º 60/873.996, presentada el 8 de diciembre de 2006 o la solicitud de patente estadounidense n.º 11/725.970, presentada el 19 de marzo de 2007.

En ciertas realizaciones ilustrativas, los polipéptidos de la invención comprenden al menos una molécula scFv que está funcionalmente enlazada (p. ej., químicamente conjugada o genéticamente fusionada (p. ej., directamente fusionada o fusionada a través de un enlazador polipeptídico)) con el extremo C y/o el extremo N de una región Fc genéticamente fusionada (es decir, una región scFc). En una realización ilustrativa, un polipéptido de la invención comprende al menos una molécula scFv (p. ej., una o más moléculas scFv estabilizadas) que están enlazadas funcionalmente con el extremo N (o el extremo C) de al menos una región Fc genéticamente fusionada a través de un enlazador gly/ser.

Los polipéptidos de la invención pueden comprender una región variable o porción de esta (*p. ej.*, un dominio VL y/o VH) derivada de un anticuerpo mediante el uso de protocolos reconocidos en la técnica o que se pueden obtener a partir de un anticuerpo reconocido en la técnica mediante el uso de técnicas de biología molecular estándares.

5 Los expertos en la técnica también apreciarán que el ADN que codifica los dominios variables del anticuerpo también se puede derivar de bibliotecas de anticuerpos expresadas en fagos, levadura o bacterias usando métodos conocidos en la técnica. Los métodos ilustrativos se establecen, por ejemplo, en EP 368 684 B1; la patente estadounidense n.º 5.969.108; Hoogenboom et al., (2000) *Immunol. Today* 21:371; Nagy et al. (2002) *Nat. Med.* 8:801; Huie et al. (2001), *PNAS*, 98:2682; Lui et al. (2002), *J. Mol. Biol.* 315:1063. Diversas publicaciones (*p. ej.*, Marks et al. (1992), *Bio/Technology* 10:779-783) han descrito la producción de anticuerpos humanos con alta afinidad mediante transposición de cadena, así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir grandes bibliotecas de fagos. En otra realización, se puede usar la visualización ribosómica para reemplazar al bacteriófago como la plataforma de visualización (véase, *p. ej.*, Hanes, et al. (1998), *PNAS* 95:14130; Hanes and Pluckthun. (1999), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 243:107; He y Taussig. (1997), *Nuc. Acids Res.*, 25:5132; Hanes et al. (2000), *Nat. Biotechnol.* 18:1287; Wilson et al. (2001), *PNAS*, 98:3750; o Irving et al. (2001) *J. Immunol. Methods* 248:31).

Además, las secuencias de región variable útiles para producir los restos biológicamente activos de la presente invención se pueden obtener de varias fuentes diferentes. Por ejemplo, según se describió anteriormente, una variedad de secuencias génicas humanas está disponible en forma de depósitos de acceso al público. Muchas secuencias de anticuerpos y genes que codifican anticuerpos se han publicado y se pueden sintetizar químicamente secuencias de región variable adecuadas (*p. ej.*, secuencias VL y VH) a partir de estas secuencias usando técnicas reconocidas en la técnica.

Además, un resto biológicamente activo de la invención puede comprender un dominio variable o CDR derivado de un anticuerpo completamente murino, completamente humano, quimérico, humanizado, desimmunizado, de primate no humano o primatizado.

25 Los anticuerpos ilustrativos de los cuales se pueden derivar sitios de unión para su uso en las moléculas de la invención se conocen en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos aprobados actualmente por la FDA (Administración de alimentos y fármacos estadounidense) se pueden usar para derivar sitios de unión.

En una realización, un polipéptido de la invención se une a una molécula que es útil para tratar el cáncer.

30 En aún otras realizaciones, un resto biológicamente activo de la invención se une a una molécula que es útil para tratar una enfermedad o trastorno autoinmunitario o inflamatorio.

Por ejemplo, un polipéptido puede unirse a un antígeno presente en una célula inmunitaria (*p. ej.*, un linfocito B o T) o un autoantígeno responsable de una enfermedad o trastorno autoinmunitario. El antígeno asociado con un trastorno autoinmunitario o inflamatorio puede ser un antígeno asociado a un tumor descrito *supra*. Por lo tanto, un antígeno asociado a un tumor también puede ser un trastorno autoinmunitario o inflamatorio asociado. Según se usa en la presente memoria, el término "enfermedad o trastorno autoinmunitario" se refiere a trastornos o afecciones en un sujeto en donde el sistema inmunitario ataca a las propias células del cuerpo, provocando la destrucción del tejido. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen enfermedades autoinmunitarias generales, es decir, en las que la reacción autoinmunitaria se produce simultáneamente en varios tejidos, o enfermedades autoinmunitarias específicas de un órgano, es decir, en las que la reacción autoinmunitaria se dirige a un único órgano. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias que se pueden diagnosticar, prevenir o tratar mediante los métodos y composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD, por sus siglas en inglés); lupus eritematoso sistémico; colitis ulcerosa; artritis reumatoide; síndrome de Goodpasture; enfermedad de Grave; tiroiditis de Hashimoto; pénfigo vulgar; miastenia grave; esclerodermia; anemia hemolítica autoinmunitaria; púrpura trombocitopénica autoinmunitaria; polimiositis y dermatomiositis; anemia perniciosa; síndrome de Sjögren; espondilitis anquilosante; vasculitis; diabetes mellitus tipo I; trastornos neurológicos, esclerosis múltiple y enfermedades secundarias causadas como resultado de enfermedades autoinmunitarias.

En otras realizaciones, un resto biológicamente activo de la invención que se une a una molécula diana asociada con una enfermedad o trastorno inflamatorio. Según se usa en la presente memoria, el término "enfermedad o trastorno inflamatorio" incluye enfermedades o trastornos que son causados, al menos en parte, o exacerbados por la inflamación, *p. ej.*, flujo sanguíneo aumentado, edema, activación de células inmunitarias (*p. ej.*, proliferación, producción de citocina o fagocitosis potenciada). Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede unirse a un factor inflamatorio (*p. ej.*, una metaloproteína de matriz (MMP, por sus siglas en inglés), TNF α , una interleucina, una proteína plasmática, una citocina, un metabolito lipídico, una proteasa, un radical tóxico, una proteína mitocondrial, una proteína apoptótica, una molécula de adhesión, *etc.*) que participa o está presente en un área en cantidades aberrantes, *p. ej.*, en cantidades que puede ser ventajoso alterar, *p. ej.*, para beneficiar al sujeto. El proceso inflamatorio es la respuesta del tejido vivo al daño. La causa de la inflamación puede deberse a daño físico, sustancias químicas, microorganismos, necrosis de tejido, cáncer u otros agentes. La inflamación aguda es de corta

duración, p. ej., dura apenas pocos días. Sin embargo, si es de larga duración, puede denominarse inflamación crónica.

Los trastornos inflamatorios incluyen trastornos inflamatorios agudos, trastornos inflamatorios crónicos y trastornos inflamatorios recurrentes. Los trastornos inflamatorios agudos son generalmente de duración relativamente corta, y duran de aproximadamente unos pocos minutos a aproximadamente uno a dos días, aunque pueden durar varias semanas. Las principales características de los trastornos inflamatorios agudos incluyen el flujo sanguíneo aumentado, la exudación de fluido y proteínas plasmáticas (edema) y la emigración de leucocitos, tales como neutrófilos. Los trastornos inflamatorios crónicos, generalmente, son de larga duración, p. ej., semanas a meses a años o incluso más y se asocian histológicamente con la presencia de linfocitos y macrófagos y con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conjuntivo. Los trastornos inflamatorios recurrentes incluyen trastornos que vuelven a aparecer después de un período de tiempo o que tienen episodios periódicos. Los ejemplos de trastornos inflamatorios recurrentes incluyen asma y esclerosis múltiple. Algunos trastornos pueden entrar dentro de una o más categorías. Los trastornos inflamatorios están caracterizados generalmente por calor, enrojecimiento, hinchazón, dolor y pérdida de función. Los ejemplos de causas de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, infecciones microbianas (p. ej., infecciones bacterianas, víricas y fúngicas), agentes físicos (p. ej., quemaduras, radiación y traumatismo), agentes químicos (p. ej., toxinas y sustancias cáusticas), necrosis de tejido y diversos tipos de reacciones inmunológicas. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, osteoartritis, artritis reumatoide, infecciones agudas y crónicas (bacterianas, víricas y fúngicas); bronquitis aguda y crónica, sinusitis, y otras infecciones respiratorias, incluido el resfriado común; gastroenteritis y colitis aguda y crónica; cistitis y uretritis aguda y crónica; síndrome de dificultad respiratoria agudo; fibrosis quística; dermatitis aguda y crónica; conjuntivitis aguda y crónica; serositis aguda y crónica (pericarditis, peritonitis, sinovitis, pleuritis y tendinitis); pericarditis urémica; colecistitis aguda y crónica; vaginitis aguda y crónica; uveítis aguda y crónica; reacciones a fármacos; y quemaduras (térmicas, químicas y eléctricas).

En aún otras realizaciones, un resto biológicamente activo de la invención se une a una molécula que es útil para tratar una enfermedad o trastorno neurológico. Por ejemplo, un polipéptido puede unirse a un antígeno presente en una célula neural (p. ej., una neurona, una célula glial, o una). En ciertas realizaciones, el antígeno asociado con un trastorno neurológico puede ser un trastorno autoinmunitario o inflamatorio descrito *supra*. Según se usa en la presente memoria, el término "enfermedad o trastorno neurológico" incluye trastornos o afecciones en un sujeto en donde el sistema nervioso se degenera (p. ej., trastornos neurodegenerativos, así como trastornos donde el sistema nervioso no se desarrolla adecuadamente o no se regenera después de una lesión, p. ej., lesión de la médula espinal. Los ejemplos de trastornos neurológicos que se pueden diagnosticar, prevenir o tratar mediante los métodos y composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dolor neuropático, lesión cerebral traumática, síndrome de Guillain-Barre y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP, por sus siglas en inglés).

En otros aspectos, los restos biológicamente activos de la invención pueden comprender sitios de unión a antígeno, o porciones de estos, derivados de formas modificadas de anticuerpos. Los ejemplos de dichas formas incluyen, p. ej., minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, nanocuerpos, camélidos, Dabs, anticuerpos tetravalentes, intradiacuerpos (p. ej., Jendreyko et al. 2003. J. Biol. Chem. 278:47813), proteínas de fusión (p. ej., proteínas de fusión de anticuerpo citocina, proteínas fusionadas con al menos una porción de un receptor Fc) y anticuerpos específicos. Otros anticuerpos modificados se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4.745.055; EP 256.654; Faulkner et al., Nature 298:286 (1982); EP 120.694; EP 125.023; Morrison, J. Immun. 123:793 (1979); Kohler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980); Raso et al., Cancer Res. 41:2073 (1981); Morrison et al., Ann. Rev. Immunol. 2:239 (1984); Morrison, Science 229:1202 (1985); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984); EP 255.694; EP 266.663; y WO 88/03559. También se conocen cadenas de inmunoglobulina reordenadas. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.444.878; WO 88/03565; y EP 68.763 y las referencias mencionadas en ellas.

En otra realización, un resto biológicamente activo de la invención comprende un sitio o región de unión a antígeno que es un diacuerpo o un sitio de unión a antígeno derivado de este. Los diacuerpos son moléculas diméricas, tetravalentes que tienen cada una un polipéptido similar a las moléculas scFv, pero que normalmente tienen un enlazador de residuos aminoácidos corto (p. ej., menos de 10 y preferiblemente 1-5) que conecta ambos dominios variables, de manera que los dominios V_L y V_H en la misma cadena polipeptídica no puedan interactuar. En cambio, el dominio V_L y V_H de una cadena polipeptídica interactúa con el dominio V_H y V_L (respectivamente) en una segunda cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, WO 02/02781). En una realización, un polipéptido inmaduro de la invención comprende un diacuerpo que está enlazado funcionalmente con el extremo N y/o el extremo C de al menos una región Fc fusionada genéticamente (es decir, una región scFc).

En ciertas realizaciones, un resto biológicamente activo de la invención comprende una molécula de unión de dominio simple (p. ej., un anticuerpo de dominio simple) enlazada con un scFc. Las moléculas de dominio simple ilustrativas incluyen un dominio variable de cadena pesada aislado (V_H) de un anticuerpo, es decir, un dominio variable de cadena pesada sin el dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena ligera aislado (V_L) de un anticuerpo, es decir, un dominio variable de cadena ligera sin un dominio variable de cadena pesada. Los anticuerpos de dominio simple ilustrativos empleados en las moléculas de la invención incluyen, por ejemplo, el dominio variable de cadena pesada de camélido (aproximadamente 118 a 136 residuos aminoácidos) según se

describe en Hamers-Casterman, et al., *Nature* 363:446-448 (1993), y Dumoulin, et al., *Protein Science* 11:500-515 (2002). Otros anticuerpos de dominio simple ilustrativos incluyen los dominios VH o VL simples, también conocidos como Dabs® (Domantis Ltd., Cambridge, RU). Otros anticuerpos de dominio simple incluyen anticuerpos de tiburón (p. ej., Ig-NAR de tiburón). Los Ig-NAR de tiburón comprenden un homodímero de un dominio variable (V-NAR) y cinco dominios constantes similares a C (C-NAR), en donde la diversidad se concentra en una región CDR3 alargada que varía de 5 a 23 residuos de longitud. En las especies de camélidos (p. ej., llamas), la región variable de cadena pesada, denominada VHH, forma el dominio de unión a antígeno completo. Las principales diferencias entre las regiones variables VHH de camélidos y las derivadas de anticuerpos convencionales (VH) incluyen (a) aminoácidos más hidrófobos en la superficie de contacto por cadena ligera de VH en comparación con la región correspondiente en VHH, (b) una CDR3 más larga en VHH, y (c) la aparición frecuente de una unión disulfuro entre CDR1 y CDR3 en VHH. Los métodos para producir moléculas de dominio simple se describen en las patentes estadounidenses núms. 6.005.079 y 6.765.087. Los anticuerpos de dominio simple ilustrativos que comprenden dominios VHH incluyen Nanobodies® (Ablynx NV, Gante, Bélgica).

En una realización, el resto biológicamente activo comprende una porción de unión a antígeno de un anticuerpo que se une a un miembro de la familia de receptores de TNF. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de varios miembros de la familia de receptores de TNF se conocen en la técnica e incluyen al menos 29 genes humanos: TNFRSF1A (TNFR1, también conocido como DR1, CD120a, TNF-R-I p55, TNF-R, TNFRI, TNFAR, TNF-R55, p55TNFR, p55R o TNFR60, n.º GI de GenBank 4507575; véase también US 5.395.760)), TNFRSF1B (CD120b, también conocido como p75, TNF-R, TNF-R-II, TNFR80, TNFR2, TNF-R75, TNFBR o p75TNFR; n.º GI de GenBank 4507577), TNFRSF3 (receptor beta de linfotóxina (LTβR), también conocido como TNFR2-RP, CD18, TNFR-RP, TNFCR o TNF-R-III; núms. GI 4505038 y 20072212), TNFRSF4 (OX40, también conocido como ACT35, TXGP1L o antígeno CD134; núms. GI 4507579 y 8926702), TNFRSF5 (CD40, también conocido como p50 o Bp50; núms. GI 4507581 y 23312371), TNFRSF6 (FAS, también conocido como FAS-R, DcR-2, DR2, CD95, APO-1 o APT1; núms. GI de GenBank 4507583, 23510421, 23510423, 23510425, 23510427, 23510429, 23510431 y 23510434)), TNFRSF6B (DcR3, DR3; núms. GI de GenBank 4507569, 23200021, 23200023, 23200025, 23200027, 23200029, 23200031, 23200033, 23200035, 23200037 y 23200039), TNFRSF7 (CD27, también conocido como Tp55 o S152; n.º GI de GenBank 4507587), TNFRSF8 (CD30, también conocido como Ki-1 o D1S166E; núms. GI de GenBank 4507589 y 23510437), TNFRSF9 (4-1-BB, también conocido como CD137 o ILA; núms. GI 5730095 y 728738), TNFRSF10A (TRAIL-R1, también conocido como DR4 o Apo2; n.º GI de GenBank 21361086), TNFRSF10B (TRAIL-R2, también conocido como DR5, KILLER, TRICK2A o TRICKB; núms. GI de GenBank 22547116 y 22547119), TNFRSF10C (TRAIL-R3, también conocido como DcR1, LIT o TRID; n.º GI de GenBank 22547121), TNFRSF10D (TRAIL-R4, también conocido como DcR2 o TRUNDD), TNFRSF11A (RANK; n.º GI de GenBank 4507565; véanse las patentes estadounidenses núms. 6.562.948; 6.537.763; 6.528.482; 6.479.635; 6.271.349; 6.017.729)), TNFRSF11B (Osteoprotegerina (OPG), también conocida como OCIF o TR1; núms. GI 38530116, 22547122 y 33878056), TNFRSF12 (proteína de membrana de asociación con cadena de translocación (TRAMP), también conocida como DR3, WSL-1, LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3, Fn14 o TWEAKR; n.º GI de GenBank 7706186; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2004/0033225A1), TNFRSF12L (DR3L), TNFRSF13B (TACI; n.º GI 6912694), TNFRSF13C (BAFFR; n.º GI 16445027), TNFRSF14 (mediador de ingreso del virus del herpes (HVEM), también conocido como ATAR, TR2, LIGHTR o HVEA; núms. GI de GenBank 23200041, 12803895, y 3878821), TNFRSF16 (receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (LNGFR), también conocido como receptor de neurotrofina o p75(NTR); núms. GI de GenBank 128156 y 4505393), TNFRSF17 (BCM, también conocido como BCMA; n.º GI 23238192), TNFRSF18 (AITR, también conocido como GITR; núms. GI de GenBank 4759246, 23238194 y 23238197), TNFRSF19 (Troy/Trade, también conocido como TAJ; núms. GI de GenBank 23238202 y 23238204), TNFRSF20 (RELT, también conocido como FLJ14993; núms. GI 21361873 y 23238200), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (SOBa, también conocido como Tnfrh2 o 2810028K06Rik), y TNFRSF23 (mSOB, también conocido como Tnfrh1). Otros miembros de la familia de TNF incluyen EDAR1 (receptor a de ectodisplasina, también conocido como Downless (DL), ED3, ED5, ED1R, EDA3, EDA1R, EDA-A1R; n.º GI de GenBank 11641231; la patente estadounidense n.º 6.355.782), XEDAR (también conocido como EDA-A2R; n.º GI de GenBank 11140823); y CD39 (núms. de GI 2135580 y 765256).

ii. Moléculas de unión distintas de inmunoglobulina

En ciertas realizaciones distintas, un resto biológicamente activo de la invención comprende uno o más sitios de unión derivados de una molécula de unión distinta de inmunoglobulina. Según se usa en la presente memoria, el término "moléculas de unión distintas de inmunoglobulina" son moléculas de unión cuyos sitios de unión comprenden una porción (p. ej., un cóntigo o marco) que deriva de un polipéptido distinto de una inmunoglobulina, pero que se puede manipular (p. ej., mutagenizar) para conferir una especificidad de unión deseada.

Otros ejemplos de restos biológicamente activos no derivados de moléculas de anticuerpo incluyen sitios de unión de receptor y sitios de unión de ligando que se describen en más detalle infra.

Los restos biológicamente activos distintos de inmunoglobulina pueden comprender porciones de sitio de unión que derivan de un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas que no es una inmunoglobulina (p. ej., un receptor de linfocito T o una proteína de adhesión celular (p. ej., CTLA-4, N-CAM, telocina)). Dichas moléculas de unión comprenden una porción de sitio de unión que conserva la conformación de un pliegue de inmunoglobulina y es capaz de unirse específicamente a un epítipo de IGF1-R. En otras realizaciones, las moléculas de unión distintas de

inmunoglobulina de la invención también comprenden un sitio de unión con una topología de proteína que no se base en el pliegue de inmunoglobulina (p. ej., tal como las proteínas de repetición de anquirina o fibronectinas), pero que sin embargo son capaces de unirse específicamente a una diana (p. ej., un epítipo de IGF-1R).

5 Los restos biológicamente activos distintos de inmunoglobulina se pueden identificar mediante selección o aislamiento de una variante de unión a diana a partir de una biblioteca de moléculas de unión que tienen sitios de unión diversificados artificialmente. Las bibliotecas diversificadas se pueden generar usando estrategias completamente aleatorias (p. ej., PCR propensa a errores, transposición de exones o evolución dirigida) o mediante el auxilio de estrategias de diseño reconocidas en la técnica. Por ejemplo, las posiciones de aminoácidos que normalmente participan cuando el sitio de unión interactúa con su molécula diana afín se pueden aleatorizar mediante la inserción de codones, trinucleótidos, péptidos aleatorios o bucles enteros degenerados en las posiciones correspondientes dentro del ácido nucleico que codifica el sitio de unión (véase, p. ej., la publicación estadounidense n.º 20040132028). La ubicación de las posiciones de aminoácidos se puede identificar mediante la investigación de la estructura de cristal del sitio de unión en complejo con la molécula diana. Las posiciones candidatas para la aleatorización incluyen bucles, superficies planas, hélices y cavidades de unión del sitio de unión. 10 En ciertas realizaciones, los aminoácidos dentro del sitio de unión que son probables candidatos para la diversificación se pueden identificar mediante su homología con el pliegue de inmunoglobulina. Por ejemplo, los residuos dentro de los bucles similares a CDR de fibronectina se pueden aleatorizar para generar una biblioteca de moléculas de unión a fibronectina (véase, p. ej., Koide et al., J. Mol. Biol., 284: 1141-1151 (1998)). Otras porciones del sitio de unión que se pueden aleatorizar incluyen superficies planas. Después de la aleatorización, la biblioteca diversificada a continuación se puede someter a un procedimiento de selección o barrido para obtener moléculas de unión con las características de unión deseadas, p. ej., unión específica a un epítipo de IGF-1R descrito *supra*. Por ejemplo, la selección se puede lograr mediante métodos reconocidos en la técnica tales como visualización en fago, visualización en levadura y visualización en ribosoma. 15

25 En una realización, un resto biológicamente activo deriva de una molécula de unión a fibronectina. Las moléculas de unión a fibronectina (p. ej., moléculas que comprenden los dominios de fibronectina tipo I, II o III) exhiben bucles similares a CDR que, a diferencia de las inmunoglobulinas, no dependen de uniones disulfuro intracatenarias. Los métodos para producir polipéptidos de fibronectina se describen, por ejemplo, en WO 01/64942 y en las patentes estadounidenses núms. 6.673.901, 6.703.199, 7.078.490 y 7.119.171. En una realización ilustrativa, el polipéptido de fibronectina es un AdNectin® (Adnexus Therapeutics, Waltham, MA).

30 En otra realización, un resto biológicamente activo de la invención comprende un sitio de unión de un Affibody® (Abcam, Cambridge, MA). Los Afficuerpos derivan de los dominios de unión de inmunoglobulina de la proteína A estafilocócica (SPA, por sus siglas en inglés) (véase, p. ej., Nord et al., Nat. Biotechnol., 15: 772-777 (1997)). Los sitios de unión Affibody empleados en la invención se pueden sintetizar al mutagenizar una proteína relacionada con SPA (p. ej., Proteína Z) derivada de un dominio de SPA (p. ej., el dominio B) y seleccionar los polipéptidos relacionados con SPA mutantes que tienen afinidad de unión por un epítipo de IGF-1R. Otros métodos para producir sitios de unión affibody se describen en las patentes estadounidenses 6.740.734 y 6.602.977 y en WO 00/63243. 35

40 En otra realización, un resto biológicamente activo de la invención comprende un sitio de unión de un Anticalin® (Pieris AG, Friesing, Alemania). Las anticalinas (también conocidas como lipocalinas) son miembros de una familia de proteínas de barril β diversas cuya función es unirse a moléculas diana en su región barril/bucle. Los sitios de unión a lipocalina se pueden manipular para unirse a un epítipo de IGF-1R al aleatorizar las secuencias de bucle que conectan las hebras del barril (véase, p. ej. Schlehuber et al., Drug Discov. Today, 10: 23-33 (2005); Beste et al., PNAS, 96: 1898-1903 (1999)). Los sitios de unión a anticalina empleados en las moléculas de unión de la invención se pueden obtener a partir de los polipéptidos de la familia de lipocalinas que se mutan en cuatro segmentos que corresponden a las posiciones de secuencia de la secuencia polipeptídica lineal que comprende las posiciones de aminoácidos 28 a 45, 58 a 69, 86 a 99 y 114 a 129 de la proteína de unión a bilina (BBP, por sus siglas en inglés) de *Pieris brassica*. Otros métodos para producir sitios de unión a anticalina se describen en WO99/16873 y WO 05/019251. 45

50 En otra realización, un resto biológicamente activo de la invención comprende un sitio de unión de un polipéptido rico en cisteína. Los dominios ricos en cisteína empleados en la puesta en práctica de la presente invención típicamente no forman una estructura de hélice α, lámina β o barril β. Típicamente, las uniones disulfuro promueven el plegado del dominio en una estructura tridimensional. Normalmente, los dominios ricos en cisteína tienen al menos dos uniones disulfuro, más típicamente, al menos tres uniones disulfuro. Un polipéptido rico en cisteína ilustrativo es una proteína de dominio A. Los dominios A (a veces llamados "repeticiones de tipo complemento") contienen aproximadamente 30-50 o 30-65 aminoácidos. En algunas realizaciones, los dominios comprenden aproximadamente 35-45 aminoácidos y en algunos casos aproximadamente 40 aminoácidos. Dentro de los 30-50 aminoácidos, existen aproximadamente 6 residuos cisteína. De las seis cisteínas, típicamente se encuentran uniones disulfuro entre las siguientes cisteínas: C1 y C3, C2 y C5, C4 y C6. El dominio A constituye un resto de unión a ligando. Los residuos cisteína del dominio están enlazados mediante disulfuro para formar un resto compacto, estable, funcionalmente independiente. Las aglomeraciones de estas repeticiones componen un dominio de unión a ligando y la aglomeración diferencial puede impartir especificidad con respecto a la unión al ligando. Las proteínas ilustrativas que contienen dominios A incluyen, p. ej., componentes de complemento (p. ej., C6, C7, C8, 55 60

C9 y Factor I), serina proteasas (p. ej., enteropeptidasa, matriptasa y corina), proteínas transmembranarias (p. ej., ST7, LRP3, LRP5 y LRP6) y receptores endocíticos (p. ej., receptor relacionado con sortilina, receptor de LDL, VLDLR, LRP1, LRP2 y ApoER2). Los métodos para producir proteínas de dominio A con una especificidad de unión deseada se describen, por ejemplo, en las publicaciones internacionales WO 02/088171 y WO 04/044011.

5 En otras realizaciones, un resto biológicamente activo de la invención comprende un sitio de unión de una proteína de repetición. Las proteínas de repetición son proteínas que contienen copias consecutivas de unidades estructurales pequeñas (p. ej., de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 residuos aminoacídicos) o repeticiones que se apilan entre sí para formar dominios contiguos. Las proteínas de repetición se pueden modificar para adaptarlas a un sitio de unión a diana específico mediante el ajuste de la cantidad de repeticiones en la proteína. Las proteínas de repetición ilustrativas incluyen (es decir, un DARPins®, Molecular Partners, Zúrich, Suiza) 10 (véase, p. ej., Binz et al., *Nat. Biotechnol.*, 22: 575-582 (2004)) o proteínas de repetición ricas en leucina (es decir, LRRP) (véase, p. ej., Pancer et al., *Nature*, 430: 174-180 (2004)). Todas las estructuras terciarias determinadas hasta el momento de unidades de repetición de anquirina comparte una característica compuesto por una horquilla β seguida de dos hélices α antiparalelas y que termina con un bucle que conecta la unidad de repetición con la próxima. Los dominios construidos con unidades de repetición de anquirina se forman al apilar las unidades de repetición hasta una estructura extendida y curvada. Los sitios de unión a LRRP forman parte del sistema inmunitario adaptativo de las lampreas marinas y otros peces sin quijada y se parecen a anticuerpos en que forman una recombinación de un conjunto de genes de repetición ricos en leucina durante la maduración de los linfocitos. Los métodos para producir sitios de unión a DARPins o LRRP se describen en las publicaciones internacionales WO 15 02/20565 y WO 06/083275.

Otros sitios de unión distintos de inmunoglobulina que se pueden emplear en moléculas de la invención incluyen sitios de unión derivados de dominios de homología Src (p. ej., los dominios SH2 o SH3), dominios PDZ, beta-lactamasa, inhibidores de proteasa de afinidad alta o pequeños cóntigos proteicos de unión a disulfuro tales como toxinas de escorpión. Los métodos para producir sitios de unión derivadas de estas moléculas se han descrito en la 25 técnica, véase, p. ej., Silverman et al., *Nat. Biotechnol.*, 23(12): 1493-4 (2005); Panni et al., *J. Biol. Chem.*, 277: 21666-21674 (2002), Schneider et al., *Nat. Biotechnol.*, 17: 170-175 (1999); Legendre et al., *Protein Sci.*, 11:1506-1518 (2002); Stoop et al., *Nat. Biotechnol.*, 21: 1063-1068 (2003); y Vita et al., *PNAS*, 92: 6404-6408 (1995). Otros sitios de unión pueden derivar de un dominio de unión seleccionado del grupo que consiste en un dominio similar a EGF, un dominio Kringle, un dominio PAN, un dominio Gla, un dominio SRCR, un dominio inhibidor de tripsina pancreático bovino/Kunitz, un dominio inhibidor de serina proteasa de tipo Kazal, un dominio Trefoil (tipo P), un dominio tipo C de factor de von Willebrand, un dominio similar a anafilatoxina, un dominio CUB, un repetición tipo I de tiroglobulina, un dominio clase A de receptor de LDL, un dominio Sushi, un dominio Link, un dominio de tromboespondina tipo I, un dominio similar a inmunoglobulina, un dominio de lectina tipo C, un dominio MAM, un dominio tipo A de factor de von Willebrand, un dominio de somatomedina B, un dominio de núcleo de cuatro disulfuros de tipo WAP, un dominio F5/8 tipo C, un dominio de hemopexina, un dominio similar a EGF de tipo laminina, un dominio C2, un dominio CTLA-4 y otros de dichos dominios conocidos para los expertos en la técnica, así como derivados y/o variantes de estos. Los polipéptidos distintos de inmunoglobulina adicionales incluyen Avimers® (Avidia, Inc., Mountain View, CA - véase la Publicación PCT internacional n.º WO 06/055689 y la publicación de patente estadounidense 2006/0234299), Telobodies® (Biotech Studio, Cambridge, MA), Evibodies® (Evogenix, Sídney, Australia, véase la patente estadounidense n.º 7.166.697) y Microbodies® (Nascacell Technologies, Múnich, Alemania).

iii. Porciones de unión de receptores o ligandos

En otros aspectos, un polipéptido de la invención comprende un sitio de unión a ligando de un receptor y/o una porción de unión a receptor de un ligando que está enlazado funcionalmente con al menos una región Fc fusionada genéticamente. 45

En ciertas realizaciones, las regiones transmembranarias o secuencias de reconocimiento de anclaje de lípido o fosfolípido del receptor de unión a ligando preferiblemente se inactivan o eliminan antes de la fusión. El ADN que codifica el ligando o agente de combinación de unión a ligando se escinde mediante una enzima de restricción en los extremos 5' y 3' o proximal a ellos del ADN que codifica el segmento de ORF deseado. El fragmento de ADN resultante se puede insertar sin inconvenientes (p. ej., ligarse dentro del marco) en un ADN que codifica una región Fc fusionada genéticamente. El sitio preciso en el que se hace la fusión se puede seleccionar empíricamente para optimizar las características de secreción o de unión de la proteína de fusión soluble. El ADN que codifica la proteína de fusión a continuación se puede subclonar en un vector de expresión adecuado que se pueden transfectar en una célula hospedante para la expresión. 50

Las porciones de unión de receptores o ligandos ilustrativas que pueden estar presentes en un polipéptido de la invención se establecen a continuación: 55

a. Citocinas y receptores de citocina

Las citocinas tienen efectos pleiotrópicos sobre la proliferación, diferenciación y activación funcional de los linfocitos. Se pueden utilizar diversas citocinas, o porciones de unión a receptor de estas, en las proteínas de fusión de la

invención como moléculas biológicamente activas, sitios y/o dominios de unión. Las citocinas ilustrativas incluyen las interleucinas (p. ej. IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13 e IL-18), los factores estimulantes de colonias (CSF, por sus siglas en inglés) (p. ej., CSF de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés), CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) y CFS de monocitos macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés)), factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) alfa y beta, antígeno de linfocito T citotóxico 4 (CTLA-4, por sus siglas en inglés) e interferones tales como interferón- α , β o γ (patentes estadounidenses núms. 4.925.793 y 4.929.554).

Los receptores de citocina típicamente consisten en una cadena alfa específica de ligando y una cadena beta común. Los receptores de citocina ilustrativos incluyen aquellos para GM-CSF, IL-3 (patente estadounidense n.º 5.639.605), IL-4 (patente estadounidense n.º 5.599.905), IL-5 (patente estadounidense n.º 5.453.491), el receptor de IL10, IPN γ (EP0240975), y la familia TNF de receptores (p. ej., TNF α (p. ej. TNFR-1 (EP 417. 563), TNFR-2 (EP 417.014) receptor de linfotóxina beta).

b. Proteínas de adhesión

Las moléculas de adhesión son proteínas unidas a la membrana que permiten que las células interactúen entre sí. Se pueden incorporar diversas proteínas de adhesión, receptores de migración dirigida de leucocitos y moléculas de adhesión celular, o porciones de unión a receptor de estas, en una proteína de fusión de la invención como moléculas biológicamente activas, sitios y/o dominios de unión. Los receptores de migración dirigida de leucocitos se expresan en las superficies celulares de los leucocitos durante la inflamación e incluyen las integrinas β -1 (p. ej., VLA-1, 2, 3, 4, 5 y 6) que median la unión con los componentes de la matriz extracelular y las integrinas β 2 (p. ej., LFA-1, LPAM-1, CR3 y CR4) que se unen a moléculas de adhesión celular (CAM, por sus siglas en inglés) en el endotelio vascular. Las CAM ilustrativas incluyen ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 y MAdCAM-1. Otras CAM incluyen las de la familia de selectina que incluyen E-selectina, L-selectina y P-selectina.

c. Quimiocinas

Las quimiocinas, proteínas quimiotácticas que estimulan la migración de los leucocitos hacia un sitio de infección, también se pueden incorporar en una proteína de fusión de la invención. Las quimiocinas ilustrativas incluyen proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP-1- α y MIP-1- β), el factor quimiotáctico de neutrófilos y RANTES (linfocito T normalmente expresado y secretado regulado con la activación).

d. Hormonas

Las hormonas de crecimiento ilustrativas para su uso como restos biológicamente activos en las proteínas de fusión de la invención incluyen renina, hormona del crecimiento humana (HGH, por sus siglas en inglés; patente estadounidense n.º 5.834.598), hormona de crecimiento humana N-metionilo; hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de hormona de crecimiento; hormona paratiroidea (PTH, por sus siglas en inglés); hormona estimulante de la tiroides (TSH, por sus siglas en inglés); tiroxina; proinsulina e insulina (patentes estadounidenses núms. 5.157.021 y 6.576.608); hormona estimulante del folículo (FSH, por sus siglas en inglés); calcitonina, hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés), leptina, glucagones; bombesina; somatropina; sustancia inhibidora de muleriana; relaxina y prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina; prolactina; lactógeno placentario; proteína OB; o sustancia inhibidora de muleriana.

e. Receptores y ligandos

En una realización, un polipéptido de la invención combine el(los) sitio(s) de unión del ligando o receptor (p. ej., el dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de un receptor) con al menos una región Fc genéticamente-fusionada (es decir, la región scFc). En ciertas realizaciones, el sitio o dominio de unión de la porción de unión a ligando de un receptor puede derivar de un receptor unido a un anticuerpo o variante de anticuerpo descrito *supra*. En otras realizaciones, la porción de unión a ligando de un receptor deriva de un receptor seleccionado del grupo que consiste en un receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) (p. ej., un receptor de linfocitos T soluble, p. ej., mTCR® (Medigene AG, Munich, Alemania), un receptor de la superfamilia de receptores de TNF descrita *supra* (p. ej., un receptor TNF α soluble de una inmunoadhesina), un receptor de la familia de receptores de factor neurotróficos derivados de células gliales (GDNF, por sus siglas en inglés) (p. ej., GFR α 3), un receptor de la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés), un receptor de la superfamilia de receptores de tirosina cinasa (TK, por sus siglas en inglés), un receptor de la superfamilia sincronizada por ligando (LG, por sus siglas en inglés), un receptor de la superfamilia de receptores de quimiocina, la superfamilia de receptores similares a IL-1/Toll (TLR, por sus siglas en inglés) y una superfamilia de receptores de citocina.

En otras realizaciones, el sitio o dominio de unión de la porción de unión a receptor de un ligando puede derivar de un ligando unido a un anticuerpo o variante de anticuerpo descrito *supra*. Por ejemplo, el ligando se puede unir a un receptor seleccionado del grupo que consiste en un receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig), un receptor de la superfamilia de receptores de TNF, un receptor de la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR), un receptor de la superfamilia de receptores de tirosina cinasa (TK), un receptor de la superfamilia

sincronizada por ligando (LG), un receptor de la superfamilia de receptores de quimiocina, la superfamilia de receptores similares a IL-1/Toll (TLR) y una superfamilia de receptores de citocina. En una realización ilustrativa, el sitio de unión de la porción de unión a receptor de un ligando deriva de un ligando que pertenece a la superfamilia de ligandos de TNF descrita *supra* (p. ej., CD40L).

- 5 Se pueden incorporar factores de crecimiento o sus receptores (o porciones de unión a receptor o de unión a ligando de estos) en las proteínas de fusión de la invención. Los factores de crecimiento ilustrativo incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) y sus isoformas (la patente estadounidense n.º 5.194.596); factores de crecimiento fibroblásticos (FGF, por sus siglas en inglés), incluidos aFGF y bFGF; factor natriurético atrial (ANF, por sus siglas en inglés); factores de crecimiento hepáticos (HGF, por sus siglas en inglés; patentes estadounidenses núms. 5.227.158 y 6.099.841), factores neurotróficos tales como factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF, por sus siglas en inglés), ligandos de factor neurotrófico derivado de células gliales (p. ej., GDNF, neurturino, artemina y persefina), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF-β, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) (patentes estadounidenses núms. 4.889.919, 4.845.075, 5.910.574, y 5.877.016); factores de crecimiento transformantes (TGF, por sus siglas en inglés) tales como TGF-alfa y TGF-beta (WO 90/14359), factores osteoinductores incluida la proteína morfogenética ósea (BMP, por sus siglas en inglés); los factores de crecimiento similares a insulina I y -II (IGF-I y IGF-II; las patentes estadounidenses núms. 6.403.764 y 6.506.874); eritropoyetina (EPO); trombopoyetina (TPO); factor de célula madre (SCF, por sus siglas en inglés), trombopoyetina (TPO, ligando *c-Mpl*) y los polipéptidos Wnt (la patente estadounidense n.º 6.159.462).
- 10
- 15
- 20 Los factores de crecimiento ilustrativos que se pueden usar como restos biológicamente activos de la invención incluyen los receptores de EGF; receptores de VEGF (p. ej., Flt1 o Flk1/KDR), receptores de PDGF (WO 90/14425); receptores de HGF (las patentes estadounidenses núms. 5.648.273 y 5.686.292) y receptores neurotróficos que incluyen el receptor de baja afinidad (LNGFR, por sus siglas en inglés), también denominado p75^{NTR} o p75, que se une a NGF, BDNF y NT-3, y receptores de afinidad alta que son miembros de la familia trk de las tirosina cinasas receptoras (p. ej., trkA, trkB (EP 455.460), trkC (EP 522.530)).
- 25

f. Receptores heterodiméricos

En una realización, los antagonistas para citocinas que usan un componente de determinación de la especificidad α que, cuando se combina con la citocina, se une a un primer componente de transducción de señal β para formar un intermediario no funcional que después se une a un segundo componente de transducción de señal β que provoca la dimerización del receptor β y la consecuente traducción de señal se pueden producir usando los métodos de la invención. Dichas moléculas se describen en la técnica (véase, p. ej., la patente estadounidense 6.927.044). En un ejemplo, un componente de determinación de la especificidad soluble del receptor y el dominio extracelular del primer componente de transducción de señal β del receptor de citocina se combinan para formar un heterodímero que se une a la citocina para formar un complejo no funcional. Las citocinas ilustrativas que se pueden inhibir mediante el uso dichos receptores heterodiméricos incluyen: IL1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-3, IL-4, IL-5, IL-11, IL-15, GMCSF, LIF, INFγ y TGFβ.

30

35

E. Factores de coagulación

Los factores de coagulación ilustrativos (factores de coagulación de la sangre) para su uso como restos biológicamente activos en las proteínas de fusión de la invención incluyen los factores de coagulación (p. ej., los factores V, VII, VIII, IX, X, XI, XII y XIII, el factor de von Willebrand); el factor tisular (las patentes estadounidenses núms. 5.346.991, 5.349.991, 5.726.147 y 6.596.84); trombina y protrombina; fibrina y fibrinógeno; plasmina y plasminógeno; activadores de plasminógeno, tal como urocinasa o activador de plasminógeno de tipo tisular o de orina humana (t-PA). También se pueden usar variantes y porciones biológicamente activas de dichos factores de coagulación como moléculas biológicamente activas. Las moléculas ilustrativas que se pueden producir usando las regiones scFc de la invención también se establecen en, p. ej., las patentes estadounidenses 7.404.956 y 7.348.004.

40

45

Los factores VII, IX y X están todos estructuralmente relacionados en el sentido de que en cada uno el extremo amínico de la cadena ligera no está disponible para la incorporación de restos adicionales, debido a la necesidad de la secuencia propéptido que proporciona un sitio de anclaje para la gamma-glutamyl carboxilasa dependiente de vitamina K. De manera similar, el extremo amínico de la cadena pesada de estos tres factores de coagulación no está disponible para la incorporación de restos adicionales, con la excepción de restos escindibles, es decir, restos enlazados a través de un sitio de escisión o restos que consisten en un sitio de escisión, debido a la necesidad de un extremo N libre para formar un dominio de proteasa catalíticamente activo. Aunque a menudo se muestra el factor VII para ilustrar realizaciones ilustrativas de la invención, las construcciones objeto se pueden producir usando el factor IX o X. Por ejemplo, un experto en la técnica entendería que la porción FVII de una construcción de la invención podría sustituirse con una porción FIX o FX.

50

55

Las construcciones de factor de coagulación ilustrativas de la invención se establecen en las Figuras adjuntas. Aunque las Figuras generalmente ilustran el factor de coagulación como una cadena simple (en su forma zimógena) se entenderá que el factor de coagulación también puede estar presente en su forma activa en una construcción de la invención, p. ej., como una forma de dos cadenas unidas por disulfuro.

En una realización, un factor de coagulación de la invención se expresa mediante una célula en forma activa. En otra realización, un factor de coagulación se expresa en forma inactiva y posteriormente se activa en las condiciones adecuadas in vitro de manera que la forma activa del factor de coagulación esté presente en la construcción. En otra realización, un factor de coagulación de la invención comprende un factor de coagulación en forma inactiva y el factor de coagulación se activa in vivo después de la administración.

En una realización, un factor de coagulación de la invención es una forma madura del Factor VII o una variante de este. El factor VII (FVII, F7; también denominado Factor 7, factor de coagulación VII, factor sérico VII, acelerador de conversión de protrombina sérica, SPCA, proconvertina y eptacog alfa) es una serina proteasa que es parte de la cascada de coagulación. FVII incluye un dominio Gla, dos dominios EGF (EGF-1 y EGF-2), y un dominio de serina proteasa (o dominio peptidasa S1) que está altamente conservado entre todos los miembros de la familia peptidasa S1 de serina proteasa, tales como, por ejemplo, con quimi tripsina. FVII se produce como un zimógeno de cadena simple, un polipeptídico de dos cadenas similar a zimógeno activado y una forma de dos cadenas completamente activada. Según se usa en la presente memoria, una proteína o polipéptido "similar a zimógeno" se refiere a una proteína que se ha activado mediante escisión proteolítica, pero todavía exhibe propiedades que están asociadas con un zimógeno, tales como, por ejemplo, baja a escasa actividad o una conformación que se parece a la conformación de la forma zimógena de la proteína. Por ejemplo, cuando no está unida a un factor tisular, la forma activada de dos cadenas de FVII es una proteína similar a zimógeno; conserva una conformación similar a la del zimógeno de FVII no escindido y, por lo tanto, exhibe una actividad muy baja. Después de unirse al factor tisular, la forma activada de dos cadenas de FVII sufre un cambio conformacional y adquiere su actividad completa como un factor de coagulación.

Las variantes de FVII ilustrativas incluyen aquellas con actividad específica aumentada, p. ej., mutaciones que aumentan la actividad de FVII al aumentar su actividad enzimática (Kcat o Km). Dichas variantes se han descrito en la técnica e incluyen, p. ej., las formas mutantes de la molécula según se describen, por ejemplo, en Persson et al. 2001. PNAS 98:13583; Petrovan y Ruf. 2001. J. Biol. Chem. 276:6616; Persson et al. 2001 J. Biol. Chem. 276:29195; Soejima et al. 2001. J. Biol. Chem. 276:17229; Soejima et al. 2002. J. Biol. Chem. 276:49027. En una realización, una forma variante de FVII incluye las mutaciones V158D-E296V-M298Q. En otra realización, una forma variante de FVII incluye un reemplazo de los aminoácidos 608-619 (LQQRKVGDSPN, correspondientes al bucle 170) de la secuencia madura de FVII con los aminoácidos EASYPGK del bucle 170 de tripsina. También se conocen variantes de FIX con actividad específica alta en la técnica. Por ejemplo, Simioni et al. (2009 N.E. Journal of Medicine 361:1671) describen una mutación R338L. Chang et al. (1988 JBC 273:12089) y Pierri et al. (2009 Human Gene Therapy 20:479) describen una mutación R338A. Se conocen otras mutaciones en la técnica e incluyen las descritas, p. ej., en Zogg y Brandstetter. 2009 Structure 17:1669; Sichler et al. 2003. J. Biol. Chem. 278:4121; y Sturzebecher et al. 1997. FEBS Lett 412:295. Otra versión del factor IX (el triple mutante V86A/E277A/R338A) con actividades de coagulación aumentadas ha sido descrita por Lin et al. 2010. Journal of Thrombosis and Haemostasis 8: 1773).

La activación completa, que se produce después del cambio conformacional de una forma similar a zimógeno, se produce después de la unión a su factor tisular cofactor. Además, se pueden introducir mutaciones que resultan en el cambio de conformación en ausencia de factor tisular. Por consiguiente, la referencia a FVIIa incluye ambas formas de dos cadenas de este, la forma similar a zimógeno y la forma de dos cadenas completamente activada.

En una realización, un factor de coagulación de la invención es una forma madura del Factor VIII o una variante de este. FVIII funciona en la vía intrínseca de la coagulación sanguínea como un cofactor para acelerar la activación del factor X mediante el factor IXa, una reacción que se produce sobre una superficie fosfolipídica con carga negativa en presencia de iones de calcio. FVIII se sintetiza como un polipéptido de cadena simple de 2351 aminoácidos que tiene la estructura de dominio A1-A2-B-A3-C1-C2. Wehar, G. A. et al., Nature 312:337-342 (1984) y Toole, J. J. et al., Nature 312:342-347 (1984). La estructura de dominio de FVIII es idéntica a la del factor de coagulación homólogo, el factor V (FV). Kane, W. H. et al., PNAS (USA) 83:6800-6804 (1986) y Jenny, R. J. et al., PNAS (USA) 84:4846-4850 (1987). Los dominios A de FVIII tienen 330 aminoácidos y tienen 40 % de identidad de aminoácido entre sí y con respecto al dominio A de FV y la proteína ceruloplasmina de unión a cobre plasmática. Takahashi, N. et al., PNAS (USA) 81:390-394 (1984). Cada dominio C tiene 150 aminoácidos y exhibe 40 % de identidad con respecto a los dominios C de FV, y con respecto a proteínas que se unen a glicoconjugados y fosfolípidos con carga negativa. Stubbs, J. D. et al., PNAS (USA) 87:8417-8421 (1990). El dominio B de FVIII se codifica mediante un exón simple y exhibe escasa homología con respecto a cualquier proteína conocida incluido el dominio B de FV. Gitschier, J. et al., Nature 312:326-330 (1984) y Cripe, L. D. et al., Biochemistry 31:3777-3785 (1992).

FVIII se secreta en el plasma como un heterodímero de una cadena pesada (dominios A1-A2-B) y una cadena ligera (dominios A3-C1-C2) asociadas a través de un enlace de ion metálico no covalente divalente entre los dominios A1 y A3. En el plasma, FVIII se estabiliza mediante la unión con el factor de von Willebrand. Más específicamente, la cadena ligera de FVIII se une mediante interacciones no covalentes con un sitio de unión primario en el extremo amínico del factor de von Willebrand. Después de la activación proteolítica mediante trombina, FVIII se activa como un heterotrímero de 2 fragmentos de cadena pesada (A1, un fragmento de 50 kDa y A2, un fragmento de 43 kDa) y la cadena ligera (A3-C1-C2, una cadena de 73 kDa). La forma activa de FVIII (FVIIIa), por lo tanto, consiste en una subunidad A1 asociada a través del enlace de ion metálico divalente con una cadena ligera A3-C1-C2 escindida por trombina y una subunidad A2 libre asociada con un dominio A1 a través de asociación iónica. Eaton, D. et al., Biochemistry 25: 505 (1986); Lollar, P. et al., J. Biol. Chem. 266: 12481 (1991); y Fay, P. J. et al., J. Biol. Chem. 266:

8957 (1991). Este heterotrímero de FVIII es inestable y está sujeto a una inactivación rápida a través de la disociación de la subunidad A2 en condiciones fisiológicas.

En una realización, un factor de coagulación comprende una versión con el dominio B eliminado del factor VIII. El "dominio B" del Factor VIII, según se usa en la presente memoria, es igual al dominio B conocido en la técnica que se define mediante identidad de secuencia de aminoácidos interna y sitios de escisión proteolítica, *p. ej.*, los residuos Ser741-Arg1648 del Factor VIII humano de longitud completa. Los otros dominios del Factor VIII humano se definen mediante los siguientes residuos aminoacídicos: A1, residuos Ala1-Arg372; A2, residuos Ser373-Arg740; A3, residuos Ser1690-Asn2019; C1, residuos Lys2020-Asn2172; C2, residuos Ser2173-Tyr2332. La secuencia A3-C1-C2 incluye los residuos Ser1690-Tyr2332. La secuencia restante, los residuos Glu1649-Arg1689, se denomina normalmente región ácida a3. Las ubicaciones de los límites para todos los dominios, incluidos los dominios B, para el Factor VIII porcino, murino y canino también se conocen en la técnica. En una realización, el dominio B del Factor VIII se elimina ("factor VIII con dominio B eliminado" o "BDD FVIII"). Un ejemplo de un BDD FVIII es REFACTO® (BDD FVIII recombinante con la fusión S743/Q1638), que se conoce en la técnica.

Un "Factor VIII con dominio B eliminado" puede tener las eliminaciones completas o parciales descritas en las patentes estadounidenses núms. 6.316.226, 6.346.513, 7.041.635, 5.789.203, 6.060.447, 5.595.886, 6.228.620, 5.972.885, 6.048.720, 5.543.502, 5.610.278, 5.171.844, 5.112.950, 4.868.112 y 6.458.563. En algunas realizaciones, una secuencia de Factor VIII con dominio B eliminado de la presente invención comprende una cualquiera de las eliminaciones descritas en la col. 4, línea 4 a la col. 5, línea 28 y los ejemplos 1-5 de la patente estadounidense n.º 6.316.226 (también en US 6.346.513). En otra realización, un Factor VIII con dominio B eliminado es el Factor VIII con dominio B eliminado S743/Q1638 (versión SQ del Factor VIII) (*p. ej.*, el Factor VIII que tiene una eliminación del aminoácido 744 al aminoácido 1637, *p. ej.*, el Factor VIII que tiene los aminoácidos 1-743 y los aminoácidos 1638-2332 de la SEQ ID NO: 6, es decir, la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, un Factor VIII con dominio B eliminado de la presente invención tiene una eliminación descrita en la col. 2, líneas 26-51 y los ejemplos 5-8 de la patente estadounidense n.º 5.789.203 (también US 6.060.447, US 5.595.886 y US 6.228.620). En algunas realizaciones, un Factor VIII con dominio B eliminado tiene una eliminación descrita en la col. 1, líneas 25 a la col. 2, línea 40 de la patente estadounidense n.º 5.972.885; col. 6, líneas 1-22 y ejemplo 1 de la patente estadounidense n.º 6.048.720; col. 2, líneas 17-46 de la patente estadounidense n.º 5.543.502; col. 4, línea 22 a col. 5, línea 36 de la patente estadounidense n.º 5.171.844; col. 2, líneas 55-68, figura 2, y ejemplo 1 de la patente estadounidense n.º 5.112.950; col. 2, línea 2 a col. 19, línea 21 y tabla 2 de la patente estadounidense n.º 4.868.112; col. 2, línea 1 a col. 3, línea 19, col. 3, línea 40 a col. 4, línea 67, col. 7, línea 43 a col. 8, línea 26, y col. 11, línea 5 a col. 13, línea 39 de la patente estadounidense no. 7.041.635; o col. 4, líneas 25-53, de la patente estadounidense n.º 6.458.563. En algunas realizaciones, un Factor VIII con dominio B eliminado tiene una eliminación de la mayor parte del dominio B, pero todavía contiene secuencias del extremo amínico del dominio B que son esenciales para el procesamiento proteolítico *in vivo* del producto de traducción primario en dos cadenas polipeptídicas, según se describe en WO 91/09122. En algunas realizaciones, un Factor VIII con dominio B eliminado se construye con una eliminación de los aminoácidos 747-1638, *es decir*, prácticamente una eliminación completa del dominio B. Hoeber R.C., et al. J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990). Un Factor VIII con dominio B eliminado también puede contener una eliminación de los aminoácidos 771-1666 o los aminoácidos 868-1562 del Factor VIII. Meulien P., et al. Proteína Eng. 2(4): 301-6 (1988). Las eliminaciones adicionales del dominio B que son parte de la invención incluyen: eliminación de los aminoácidos 982 a 1562 o 760 a 1639 (Toole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1986) 83, 5939-5942), 797 a 1562 (Eaton, et al. Biochemistry (1986) 25:8343-8347), 741 a 1646 (Kaufman (solicitud PCT publicada n.º WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, et al., DNA (1987) 6:553-564), 741 a 1648 (Pasek (solicitud PCT n.º 88/00831)), o 816 a 1598 o 741 a 1648 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, EP 295597)). Cada una de las eliminaciones indicadas anteriormente se puede hacer en cualquier secuencia del Factor VIII.

En una realización, un factor de coagulación de la invención es una forma madura del Factor IX o una variante de este. El factor IX circula como un zimógeno plasmático de cadena simple de 415 aminoácidos (A. Vysotchin et al., J. Biol. Chem. 268, 8436 (1993)). El zimógeno de FIX se activa mediante FXIa o mediante el complejo de factor tisular/FVIIa. Las escisiones específicas entre arginina-alanina 145-146 y arginina-valina 180-181 resultan en una cadena ligera y una cadena pesada enlazadas mediante una unión disulfuro simple entre la cisteína 132 y cisteína 289 (S. Bajaj et al., Biochemistry 22, 4047 (1983)). La organización estructural de FIX es similar a la de las proteínas de coagulación sanguínea dependientes de vitamina K FVII, FX y la proteína C (B. Furie y B. Furie, *supra*). Los aproximadamente 45 aminoácidos del extremo amínico comprenden el dominio de ácido gamma-carboxiglutámico, o gla. Le siguen dos dominios de homología con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), un péptido de activación y la "cadena pesada" catalítica que es un miembro de la familia de serina proteasas (A. Vysotchin et al., J. Biol. Chem. 268, 8436 (1993); S. Spitzer et al., Biochemical Journal 265, 219 (1990); H. Brandstetter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9796 (1995)).

En una realización, un factor de coagulación de la invención es una forma madura del Factor X. El Factor X es una glicoproteína dependiente de la vitamina K con un peso molecular de 58,5 kDa, que se secreta a partir de células hepáticas en el plasma como un zimógeno. Inicialmente, el factor X se produce como un prepropéptido con un péptido señal que consiste en un total de 488 aminoácidos. El péptido señal se retira por escisión mediante peptidasa señal durante la exportación hacia el retículo endoplasmático, la secuencia de propéptido se retira por escisión después de que se produce la gamma carboxilación en los primeros 11 residuos ácido glutámico en el extremo N de la cadena del extremo N madura. Una etapa de procesamiento adicional se produce por la escisión

entre Arg182 y Ser183. Esta etapa de procesamiento también conduce a la eliminación concomitante del tripéptido Arg180-Lys181-Arg182. El zimógeno de factor X resultante secretado consiste en una cadena ligera en el extremo N de 139 aminoácidos (M, 16.200) y una cadena pesada en el extremo C de 306 aminoácidos (M, 42.000) que están enlazadas covalentemente a través de un puente disulfuro entre Cys172 y Cys342. Las etapas de procesamiento después de la traducción adicionales incluyen la .beta.-hidroxilación de Asp103, así como la glicosilación de tipo N y O.

Se entenderá que, además de las versiones naturales (WT, por sus siglas en inglés) de estos factores de coagulación o porciones biológicamente activas de estos, la presente invención también puede emplear formas precursoras truncadas de estos que tienen actividad, variantes alélicas y especies variantes, variantes codificadas por variantes de empalme y otras variantes, incluidos polipéptidos que tienen al menos 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad secuencial con respecto a la forma madura del factor de coagulación y que conservan la capacidad de promover la formación de coágulos. Por ejemplo, se pueden emplear polipéptidos de FVII modificados y las variantes de estos que conservan al menos una actividad de un FVII, tal como unión a TF, unión al factor X, unión a fosfolípido y/o actividad coagulante de un FVII. Al conservar la actividad, la actividad se puede alterar, tal como reducir o aumentar, en comparación con un factor de coagulación natural, siempre que el nivel de actividad conservado sea suficiente para proporcionar un efecto detectable. Las secuencias de factores de coagulación ilustrativas que se pueden usar en las construcciones de la invención se encuentran en el listado de secuencias adjunto.

Los polipéptidos modificados ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, isoformas específicas para tejido y variantes alélicas de estas, moléculas sintéticas preparadas mediante traducción de ácidos nucleicos, proteínas generadas mediante síntesis química, tales como síntesis que incluyen la ligadura de polipéptidos más cortos, a través de métodos recombinantes, proteínas aisladas a partir de tejido o células humanos y no humanos, polipéptidos quiméricos y formas modificadas de estos.

Otras variantes de factores de coagulación incluyen versiones que están modificadas para alterar la actividad. Por ejemplo, se conocen en la técnica versiones de los factores de coagulación con actividad específica alta y se pueden usar para producir un polipéptido de la invención. Los ejemplos de dichas variantes con actividad específica alta se describen, p. ej., en Persson et al. PNAS. 2001. 98:13583 y Soejima et al. Journal of Biological Chemistry. 2002. 277:49027. Por ejemplo, en una realización, una versión con actividad específica alta del Factor VII retira los aminoácidos 311 a 322 de la secuencia madura de FVII (LQQSRKVGDSPN, correspondiente al bucle 170) y los reemplaza con los aminoácidos EASYPGK del bucle 170 de tripsina. Se ha demostrado que esta sustitución confiere actividad específica alta. Una versión con actividad específica alta adicional del Factor VII contiene tres mutaciones puntuales en la cadena pesada de FVII, V158D, E296V y M298Q.

Los presentes factores de coagulación también pueden consistir en fragmentos o porciones de moléculas naturales que tienen una longitud suficiente o incluyen regiones adecuadas para conservar al menos una actividad (después de la activación, si es necesaria) de un polipéptido maduro de longitud completa. Se conocen variantes de factor de coagulación ilustrativas en la técnica.

Los factores de coagulación ilustrativos son los de origen mamífero, p. ej., humano. Las secuencias de los factores de coagulación ilustrativos están presentes en el listado de secuencias adjunto, p. ej., solas o en el contexto de una construcción de factor de coagulación.

En una realización, puede haber más de un factor de coagulación presente en un polipéptido de la invención. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una cadena ligera de un factor de coagulación genéticamente fusionada con un resto Fc de una construcción de la invención y una cadena pesada de un factor de coagulación genéticamente fusionada con un segundo resto Fc de una construcción de la invención, o viceversa.

Las construcciones ilustrativas que comprenden factores de coagulación como restos biológicamente activos se muestran en los ejemplos de trabajo. Por ejemplo, en una realización, un zimógeno de factor de coagulación (p. ej., la cadena pesada y ligera del factor VII) se acopla a través de un enlazador opcional (p. ej., el enlazador 6x(G₄S)) o directamente al extremo amínico de un primer resto Fc (que comprende los dominios CH1, CH2 y CH3). El extremo carboxílico del primer resto Fc tiene un enlazador cscFc (p. ej., un enlazador 6x(G₄S) o un enlazador 4x(G₄S)) que comprende un primer sitio de procesamiento (p. ej., el sitio de procesamiento RRRRS). El otro extremo del enlazador cscFc comprende un segundo sitio de procesamiento (p. ej., un sitio de procesamiento RKRRKR o RRRR) y está opcionalmente enlazado a través de un espaciador con un resto de direccionamiento (p. ej., un resto de direccionamiento a plaquetas) o está directamente enlazada con un segundo resto Fc. Cuando el resto de direccionamiento está presente, puede enlazarse con el segundo resto Fc a través de un espaciador (p. ej., 6x(G₄S)). Las moléculas FVII-027, FVII-064 y FIX-044 descritas en la presente memoria son ejemplos de dichas construcciones.

Otras construcciones ilustrativas resultan en la secreción de un factor de coagulación activado, en lugar de un zimógeno, después del procesamiento del enlazador mediante proteasas. Por ejemplo, en una realización, la cadena ligera de un factor de coagulación se fusiona a través de un espaciador (p. ej., un enlazador 4x(G₄S)) con el extremo amínico de un primer resto Fc (que comprende los dominios CH1, CH2 y CH3). El extremo carboxílico del primer

- resto Fc se enlaza con un enlazador (p. ej., un enlazador cscFc 6x(G₄S) que comprende un primer sitio de procesamiento (p. ej., el sitio de procesamiento RRRR). El otro extremo del enlazador comprende un segundo sitio de procesamiento, p. ej., un sitio de procesamiento RKRRKR y está genéticamente fusionado con la cadena pesada del factor de coagulación (p. ej., la cadena pesada de FVII) que, a su vez, está fusionada con el extremo amínico del
- 5 resto Fc a través de un segundo espaciador (p. ej., un enlazador 4x(G₄S)). Un ejemplo de dicha construcción es la construcción FVII-024 descrita en la presente memoria y que se muestra en la Figura 2.
- Se crearon construcciones adicionales para variar el modo en que se expresan las cadenas pesada y ligera de un factor de coagulación. Como se muestra en la Figura 7, la cadena pesada y ligera se pueden expresar como una cadena simple (FV-011 y FV-003) o por separado (FV-010, FVII-013 o FVII-018).
- 10 Una construcción adicional se creó para evaluar la capacidad de FVII para expresarse en forma activada. La construcción FVII-025 se establece en la Figura 9.
- Otra construcción en la que se empleó un resto biológicamente activo diferente, IFN β , se establece en la Figura 10 para mostrar que no solo se pueden producir factores de coagulación usando los métodos de la invención. Para producir esta construcción, se enlazó IFN β con un primer resto Fc usando una molécula espaciadora.
- 15 La incapacidad para expresar la cadena pesada de FVII con un extremo N libre condujo a la generación de las construcciones descritas en la Figura 11. En estas construcciones, FVII_{FC} se expresa como un heterodímero, donde una subunidad comprende la cadena ligera de FVII y un resto Fc, y la otra subunidad comprende la cadena pesada precedida por un sitio de procesamiento RKRRKR (FVII-019) o por un fragmento de extremo C de cadena ligera y un sitio de procesamiento RKRRKR (FVII-020).
- 20 F. Restos de direccionamiento
- En una realización, la porción de unión a antígeno dirige la composición hacia un tipo de célula o tejido particular. Dichos restos de direccionamiento pueden comprender, p. ej., un sitio de unión a antígeno, una porción de unión a ligando de un receptor o una porción de unión a receptor de un ligando. En otra realización, un resto de direccionamiento es un péptido.
- 25 En una realización, un factor de coagulación de la invención se dirige a plaquetas para potenciar su eficacia al ubicar el factor de coagulación en el sitio de coagulación usando un "resto de direccionamiento" que se une a una molécula expresada en las plaquetas. Preferiblemente, las moléculas diana no se expresan en células o tejidos distintos de las plaquetas, es decir, los restos de direccionamiento se unen específicamente a las plaquetas.
- 30 En una realización, la diana son los receptores/conformaciones que se encuentran en las plaquetas en reposo. Al hacerlo, se podrían cebar los sitios para la coagulación para que tengan una eficacia potenciada. Dirigirse a dicha molécula también puede extender la semivida del factor de coagulación y/o evitar el aclaramiento. Los ejemplos de dichas dianas incluyen, p. ej., Gplb del complejo Gplb/V/IX y GpVI y la forma no activa de GPIIb/IIIa.
- En una realización, la diana son los receptores/conformaciones que solo se encuentran en plaquetas activadas para ubicar el factor de coagulación en el sitio de coagulación activa. Los ejemplos de dichas dianas incluyen, p. ej., la
- 35 forma activa de GPIIb/IIIa, así como CD62P.
- En una realización, un polipéptido de la invención comprende un "resto de direccionamiento" que tiene afinidad por y se une a plaquetas. Por ejemplo, en una realización, un resto de direccionamiento se une al complejo GPIb, p. ej., GPIb-alfa. Los ejemplos de dichos restos de direccionamiento incluyen los péptidos PS4, OS1 y OS2 que se unen a plaquetas activas y no activas (Benard et al. 2008 *Biochemistry* 47:4674); En otra realización, un resto de
- 40 direccionamiento se une a la conformación activa de GPIIb/IIIa. Los ejemplos de dichos restos de direccionamiento incluyen las regiones variables SCE5 y MB9 que se unen solo a las plaquetas activas (Schwarz et al. 2004 *FASEB Journal express* artículo 10.1096/fj.04-1513fje; Schwarz et al. 2006 *Circulation Research*. 99:25-33; la publicación de patente estadounidense 20070218067). En otra realización, un resto de direccionamiento se une a la conformación activa/no activa de GPIIb/IIIa. Un ejemplo de dicho resto de direccionamiento es la región variable del anticuerpo AP3 (Peterson et al. 2003. *Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology* 101:937; WO 2010115866).
- 45 Un experto en la técnica podría seleccionar sin inconvenientes otras dianas en plaquetas o restos de direccionamiento que se unen a dichas dianas.
- Los polipéptidos de la invención pueden comprender uno o más de un resto de direccionamiento. Las configuraciones ilustrativas se establecen en las Figuras adjuntas. Además, dos o más restos de direccionamiento se pueden enlazar entre sí (p. ej., a través de un espaciador) en serie, y la matriz en tándem se puede enlazar funcionalmente con una construcción de la invención. Cuando están presentes dos o más restos de
- 50 direccionamiento en un factor de coagulación de la invención, los restos pueden ser iguales o diferentes.
- En una realización, un resto de direccionamiento se fusiona con un polipéptido de la invención mediante un enlazador escindible o alternativamente, en otra realización, el polipéptido comprende, además, un sitio de escisión.
- 55 El enlazador escindible o el sitio de escisión se puede escindir para retirar el resto de direccionamiento en el sitio de

un coágulo. En otra realización, un resto de direccionamiento se acopla a través de un espaciador que no es escindible y, por lo tanto, no se escinde en el sitio de un coágulo.

5 En una realización, el resto de direccionamiento se ubica en el extremo N o C del factor VIII. En otra realización, un resto de direccionamiento se ubica en el extremo C de FVII, FIX, FX, o el extremo C de cualquiera o ambas cadenas de FVIIa, FIXa, de FXa. En una realización, el resto de direccionamiento se puede posicionar en el extremo N o C del segundo resto Fc (F2), o el extremo C de cualquiera o ambos restos Fc (F1 y/o F2). El resto de direccionamiento se puede enlazar con el resto biológicamente activo o el resto Fc a través de un espaciador.

10 En una realización, el resto de direccionamiento no se fusiona con una construcción a través de una unión peptídica, sino que, en cambio, se conjuga químicamente con la construcción. Por ejemplo, se pueden acoplar restos de direccionamiento a una construcción de la invención mediante la formación de una unión entre el resto de direccionamiento y un resto Fc de una construcción, donde el resto de direccionamiento comprende un primer grupo funcional y el resto Fc comprende un segundo grupo funcional, y donde el primer y segundo grupos funcionales son capaces de hacer reacción entre sí para formar una unión química (véase, p. ej., la patente estadounidense 7381408).

15 Los formatos ilustrativos de factores de coagulación diana también se establecen en las Figuras adjuntas.

20 En una realización, un polipéptido de la invención comprende al menos uno de un sitio de unión a antígeno (p. ej., un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, variante de anticuerpo o fragmento de anticuerpo), un polipéptido, una porción de unión a receptor de un ligando, o una porción de unión a ligando de un receptor que se une específicamente a plaquetas, p. ej., plaquetas en reposo o activadas. Los restos de direccionamiento ilustrativos incluyen moléculas o péptidos scFv que se unen a las moléculas que serán diana. Los ejemplos de restos de direccionamiento se encuentran en los presentes ejemplos.

25 Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un polipéptido de la invención comprende al menos una porción de unión a antígeno (p. ej., un sitio de unión) de un anticuerpo. En una realización, la porción de unión a antígeno dirige la composición a plaquetas. Dicho anticuerpo se puede unir a un epítipo expresado por todas las plaquetas (p. ej., activadas e inactivadas) o se puede unir a un epítipo expresado específicamente por plaquetas activadas.

30 Los anticuerpos ilustrativos de los cuales se pueden derivar sitios de unión o los sitios de unión de anticuerpo ilustrativos para su uso en las moléculas polipeptídicas de la invención se conocen en la técnica. Según se estableció anteriormente, los anticuerpos conocidos por unirse a plaquetas se pueden usar para derivar sitios de unión, por ejemplo, el anticuerpo AP3 o el scFv MB9 descrito en US 2007/0218067 o la región variable o una molécula scFv que comprende la región variable se pueden usar como resto de direccionamiento en una construcción de la invención. Otros sitios de unión de anticuerpo ilustrativos incluyen SCE5 que se dirige a una conformación que se encuentra en plaquetas activadas. Otros anticuerpos útiles se pueden seleccionar sin inconvenientes entre los conocidos en la técnica.

35 En ciertas realizaciones distintas, los polipéptidos de la invención comprenden uno o más sitios de unión derivados de una molécula de unión distinta de inmunoglobulina. Según se usa en la presente memoria, el término "moléculas de unión distintas de inmunoglobulina" son moléculas de unión cuyos sitios de unión comprenden una porción (p. ej., un cóntigo o marco) que deriva de un polipéptido distinto de una inmunoglobulina, pero que se puede manipular (p. ej., mutagenizar) para conferir una especificidad de unión deseada.

40 Otros ejemplos de moléculas de unión que comprenden sitios de unión no derivados de moléculas de anticuerpo incluyen sitios de unión de receptor y sitios de unión de ligando que se unen a plaquetas.

45 Las moléculas de unión distintas de inmunoglobulina se pueden identificar mediante selección o aislamiento de una variante de unión a diana a partir de una biblioteca de moléculas de unión que tienen sitios de unión diversificados artificialmente. Las bibliotecas diversificadas se pueden generar usando estrategias completamente aleatorias (p. ej., PCR propensa a errores, transposición de exones o evolución dirigida) o mediante el auxilio de estrategias de diseño reconocidas en la técnica. Por ejemplo, las posiciones de aminoácidos que normalmente participan cuando el sitio de unión interactúa con su molécula diana aún se pueden aleatorizar mediante la inserción de codones, trinucleótidos, péptidos aleatorios o bucles enteros degenerados en las posiciones correspondientes dentro del ácido nucleico que codifica el sitio de unión (véase, p. ej., la publicación estadounidense n.º 20040132028). La ubicación de las posiciones de aminoácidos se puede identificar mediante la investigación de la estructura de cristal del sitio de unión en complejo con la molécula diana. Las posiciones candidatas para la aleatorización incluyen bucles, superficies planas, hélices y cavidades de unión del sitio de unión. En ciertas realizaciones, los aminoácidos dentro del sitio de unión que son probables candidatos para la diversificación se pueden identificar mediante técnicas conocidas en la técnica. Después de la aleatorización, la biblioteca diversificada a continuación se puede someter a un procedimiento de selección o barrido para obtener moléculas de unión con las características de unión deseadas, p. ej., unión específica a plaquetas usando métodos conocidos en la técnica. La selección se puede lograr mediante métodos reconocidos en la técnica tales como visualización en fago, visualización en levadura o visualización en ribosoma. En una realización, las moléculas conocidas en la técnica que se unen a plaquetas se pueden emplear en

las construcciones de la invención. Por ejemplo, se pueden usar péptidos que se unen a GPIba según se describen en la técnica (p. ej., PS4, 0S1 o 0S2) (Benard et al. 2008. *Biochemistry* 47:4674-4682).

III. Preparación de polipéptidos

- 5 Existe una variedad de métodos disponibles para producir un polipéptido de la invención. En una realización, la invención se refiere a una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula polipeptídica de la invención. Se entenderá que, debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácido nucleico codificará la secuencia de aminoácidos del polipéptido. El polinucleótido deseado se puede producir mediante síntesis de ADN en fase sólida *de novo* o mediante mutagénesis por PCR de un polinucleótido preparado anteriormente que codifica el polipéptido diana.
- 10 Los ácidos nucleicos que codifican una molécula biológicamente activa se pueden sintetizar sin inconvenientes mediante técnicas recombinantes conocidas en la técnica. Alternativamente, los péptidos en sí se pueden sintetizar químicamente. Los ácidos nucleicos de la invención se pueden sintetizar mediante métodos estándares conocidos en la técnica, p. ej., mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tales como los comercializados por Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, se pueden sintetizar oligonucleótidos de fosforioato mediante el método de Stein et al. 1988, *Nucl. Acids Res.* 16:3209, se pueden preparar oligonucleótidos de metilfosfonato mediante el uso de soportes poliméricos de vidrio poroso controlados como se describe en Sarin et al. 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7448. Se conocen métodos adicionales de síntesis de ácido nucleico en la técnica. (véase, p. ej., las patentes estadounidenses núms. 6.015.881; 6.281.331; 6.469.136).
- 15 Los métodos para enlazar restos biológicamente activos deseados, ya sea derivados de anticuerpos u otras moléculas, con cóntigos scFc escindibles se conocen en la técnica.
- 20 La mutagénesis mediada por oligonucleótidos es un método para preparar una sustitución, inserción dentro del marco o alteración (p. ej., codón alterado) para introducir un codón que codifica una sustitución de aminoácido (p. ej., en un resto variante de Fc). Por ejemplo, el ADN polipeptídico de partida se altera al hibridar un oligonucleótido que codifica la mutación deseada con una plantilla de ADN monocatenario. Después de la hibridación, se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria entera de la plantilla que incorpora el cebador de oligonucleótido. En una realización, la manipulación genética, p. ej., mutagénesis por PCR basada en cebador, es suficiente para incorporar una alteración, según se define en la presente memoria, para producir un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención.
- 25 Para la producción recombinante, una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido se inserta en un vehículo de expresión adecuado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada o, en el caso de un vector vírico de ARN, los elementos necesarios para la replicación y traducción.
- 30 En una realización, una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína se inserta en el vector en un marco de lectura adecuado. El vector de expresión a continuación se transfecta a una célula diana adecuada que expresará el polipéptido. Las técnicas de transfección conocidas en la técnica incluyen, pero no se limitan a, precipitación de fosfato cálcico (Wigler et al. 1978, *Célula* 14 : 725) y electroporación (Neumann et al. 1982, *EMBO, J.* 1 : 841). Se puede usar una variedad de sistemas de hospedante-vector de expresión para expresar las proteínas descritas en la presente memoria en células eucariotas. En una realización, la célula eucariota es una célula animal, incluidas células de mamíferos (p. ej., las células 293, PerC6, CHO, BHK, Cos, células HeLa). Cuando la proteína se expresa en una célula eucariota, el ADN que codifica la proteína también puede codificar una secuencia señal que permitirá que se secrete la proteína. Un experto en la técnica entenderá que mientras la proteína se traduce, la célula escinde la secuencia señal para formar la proteína madura. Se conocen diversas secuencias señal en la técnica, p. ej., secuencia señal de factor VII natural, secuencia señal de factor IX natural y la secuencia señal de cadena ligera de IgK de ratón. Alternativamente, cuando no se incluye una secuencia señal, la proteína se puede recuperar mediante lisis de las células.
- 35 40 45
- La proteína de la invención se puede sintetizar en un animal transgénico, tal como un roedor, cabra, oveja, cerdo o vaca. El término "animales transgénicos" se refiere a animales no humanos que tienen incorporado un gen extraño en su genoma. Debido a que este gen está presente en tejidos de línea germinal, pasa del genitor al descendiente. Los genes exógenos se introducen en embriones unicelulares (Brinster et al. 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 4438). Los métodos para producir animales transgénicos se conocen en la técnica e incluyen la transgénica que produce moléculas de inmunoglobulina (Wagner et al. 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6376; McKnight et al. 1983, *Cell* 34 : 335; Brinster et al. 1983, *Nature* 306: 332; Ritchie et al. 1984, *Nature* 312: 517; Baldassarre et al. 2003, *Theriogenology* 59 : 831; Robl et al. 2003, *Theriogenology* 59: 107; Malassagne et al. 2003, *Xenotransplantation* 10 (3): 267).
- 50
- 55 Los vectores de expresión pueden codificar etiquetas que permiten la fácil purificación o identificación de la proteína producida recombinantemente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, vector pUR278 (Ruther et al. 1983, *EMBO J.* 2: 1791) en el que la secuencia codificante de proteína descrita en la presente memoria se puede ligar en el vector dentro del marco con la región codificante lac z para que se produzca una proteína híbrida; se pueden usar

5 vectores pGEX para expresar proteínas con una etiqueta glutatión S-transferasa (GST). Estas proteínas normalmente son solubles y se pueden purificar sin inconvenientes a partir de las células mediante adsorción en perlas de glutatión-agarosa y posterior elución en presencia de glutatión libre. Los vectores incluyen sitios de escisión (p. ej., PreCission Protease (Pharmacia, Peapack, N. J.)) para retirar con facilidad la etiqueta después de la purificación.

10 A los efectos de la presente invención, se pueden emplear numerosos sistemas de vector de expresión. Estos vectores de expresión típicamente son replicables en organismos hospedantes como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del hospedante. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias de control de la expresión que incluyen, pero no se limitan a, promotores (p. ej., promotores asociados naturalmente o heterólogos), potenciadores, secuencias de señal, señales de empalme, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción. Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedantes eucariotas. Los vectores de expresión también pueden usar elementos de ADN que derivan de virus de animales tales como virus del papiloma bovino, virus de polioma, adenovirus, virus de la vacuna de la viruela, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV), citomegalovirus (CMV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios de unión a ribosoma internos.

20 Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (p. ej., para resistencia a la ampicilina, resistencia a la higromicina, resistencia a la tetraciclina o resistencia a la neomicina) para permitir la detección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, p. ej., Itakura et al., la patente estadounidense 4.704.362). Las células que han integrado el ADN en sus cromosomas se pueden seleccionar al introducir uno o más marcadores que permiten la selección de células hospedantes transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un hospedante auxótrofo, resistencia biocida (p. ej., antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como cobre. El gen marcador seleccionable puede enlazarse directamente con las secuencias de ADN para expresarse, o introducirse en la misma célula mediante cotransformación.

25 Un vector de expresión ilustrativo es NEOSPLA (patente estadounidense n.º 6.159.730). Este vector contiene el promotor/potenciador de citomegalovirus, el promotor principal de beta globina de ratón, el origen de replicación de SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, el exón 1 y el exón 2 de neomicina fosfotransferasa, el gen de dihidrofolato reductasa y la secuencia líder. Se halló que este vector resulta en un nivel de expresión muy alto de anticuerpos tras la incorporación de genes de región variable y constante, transfección en células, posterior selección en medio que contiene G418 y amplificación con metotrexato. También se describen sistemas de vectores en las patentes estadounidenses núms. 5.736.137 y 5.658.570. Este sistema proporciona niveles de expresión altos, p. ej., >30 pg/célula/día. Otros sistemas de vectores ilustrativos se describen, p. ej., en la patente estadounidense n.º 6.413.777.

35 En otras realizaciones, los polipéptidos de la invención se pueden expresar usando construcciones policistrónicas. En estos sistemas de expresión, se pueden producir múltiples productos génicos de interés tales como múltiples polipéptidos de proteína de unión a multímero a partir de una construcción policistrónica simple. Estos sistemas usan de manera ventajosa un sitio de ingreso a ribosoma interno (IRES, por sus siglas en inglés) para proporcionar niveles relativamente altos de los polipéptidos de la invención en células hospedantes eucariotas. Las secuencias de IRES compatibles se describe en la patente estadounidense n.º 6.193.980. Los expertos en la técnica apreciarán que dichos sistemas de expresión se pueden usar para producir de manera eficaz una gama completa de polipéptidos descritos en la presente solicitud.

45 Más generalmente, después de que se ha preparado el vector o secuencia de ADN que codifica un polipéptido, el vector de expresión se puede introducir en una célula hospedante adecuada. Es decir, las células hospedantes se pueden transformar. La introducción del plásmido en la célula hospedante se puede lograr mediante diversas técnicas que son conocidas para los expertos en la técnica. Estas incluyen, pero no se limitan a, transfección (incluidas electroforesis y electroporación), fusión con protoplasto, precipitación de fosfato cálcico, fusión celular con ADN encapsulado, microinyección e infección con virus intacto. Véase, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors", capítulo 24.2, págs. 470-472 Vectors, Rodriguez y Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Lo más preferiblemente, la introducción del plásmido en el hospedante es a través de electroporación. Las células transformadas se cultivan en condiciones adecuadas para la producción de las cadenas ligeras y cadenas pesadas, y se someten a ensayo para la síntesis de proteína de cadena pesada y/o ligera. Las técnicas de ensayo ilustrativas incluyen ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA, por sus siglas en inglés), radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) o análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés), inmunohistoquímica y similares.

55 Según se usa en la presente memoria, el término "transformación" se usará en sentido amplio para hacer referencia a la introducción de ADN en una célula hospedante receptora que cambia el genotipo y, en consecuencia, resulta en un cambio en la célula receptora.

60 En los mismos términos, "células hospedantes" se refiere a células que se han transformado con vectores contruidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En descripciones de procesos para el aislamiento de polipéptidos a partir de hospedantes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo

celular" se usan de manera intercambiable para denotar la fuente del polipéptido, a menos que se especifique claramente de cualquier otra manera. En otras palabras, la recuperación del polipéptido a partir de las "células" puede significar a partir de células enteras centrifugadas, o a partir del cultivo celular que contiene el medio y las células suspendidas.

5 La línea celular hospedante usada para la expresión de la proteína es lo más preferiblemente de origen mamífero; se reconoce que los expertos en la técnica tienen la capacidad de determinar preferencialmente las líneas celulares hospedantes particulares que son más adecuadas para el producto génico deseado que se va a expresar en ellas. Las líneas celulares hospedantes ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, CHO, p. ej., DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chimp, DHFR menos), HELA (carcinoma de cuello de útero humano), CVI (línea de riñón de mono),
10 COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3.times.63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocitos humanos), PerC6 y 293 (riñón humano). Las líneas celulares hospedantes típicamente están disponibles en servicios comerciales, la colección de cultivos tisulares estadounidense o en la literatura publicada.

15 En una realización, una célula hospedante expresa endógenamente una enzima (o las enzimas) necesaria para escindir el enlazador polipeptídico (L) durante el procesamiento para formar el polipéptido maduro. Durante este procesamiento, el enlazador polipeptídico (L) se elimina sustancialmente para reducir la presencia de aminoácidos extraños. En otra realización de la invención, una célula hospedante se transforma para expresar una o más enzimas que son heterólogas o exógenas con respecto a la célula de manera que se produce o mejorar el
20 procesamiento del enlazador polipeptídico (L).

En una realización, una enzima que se puede expresar endógenamente o exógenamente a partir de una célula es un miembro de la familia furina de enzimas. El ADnc y las secuencias de aminoácidos completas de la furina humana (es decir, PACE) se publicaron en 1990. Van den Ouweland A M et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18:664; Erratum in: Nucleic Acids Res. 18:1332 (1990).

25 La patente estadounidense n.º 5.460.950, concedida a Barr et al., describe PACE recombinante y la coexpresión de PACE con un polipéptido precursor de sustrato de una proteína heteróloga para mejorar la expresión de la proteína heteróloga madura, activa.

La patente estadounidense n.º 5.935.815, concedida a van de Ven et al., asimismo describe la furina humana recombinante (es decir, PACE) y la coexpresión de furina con un polipéptido precursor de sustrato de una proteína heteróloga para mejorar la expresión de la proteína heteróloga madura, activa. Los posibles precursores de sustrato descritos en la presente patente incluyen un precursor del Factor IX. Se han informado que otros miembros de la familia en la familia de furina mamífera/ subtilisina/proteína convertasa (PC) similar a Kex2p, además de PACE, incluyen PC1/PC3, PC2, PC4, PC5/6 (denominado simplemente en la presente memoria PC5), PACE4 y LPC/PC7/PC8/SPC7. Aunque estos diversos miembros comparten ciertas características estructurales generales
35 conservadas, difieren en su distribución en el tejido, ubicación subcelular, especificidades de escisión y sustratos preferidos. Para acceder a un informe, véase Nakayama K (1997) Biochem J. 327:625-35. De manera similar a PACE, estas proproteína convertasas generalmente incluyen, comenzando desde el extremo amínico, un péptido señal, un propéptido (que se puede escindir autocatalíticamente), un dominio catalítico similar a subtilisina caracterizado por los residuos Asp, His, Ser y Asn/Asp, y un dominio Homo B que es también esencial para la actividad catalítica y se caracteriza por una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD). PACE, PACE4 y PC5 también incluyen un dominio rico en Cys, cuya función es desconocida. Además, PC5 tiene isoformas con y sin un dominio transmembranario; estas isoformas diferentes se conocen como PC5B y PC5A, respectivamente. La comparación entre la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de PACE y las secuencias de aminoácidos de los dominios catalíticos de otros miembros de esta familia de proproteína convertasas revela los siguientes grados de identidad:
40 70 por ciento para PC4; 65 por ciento para PACE4 y PC5; 61 por ciento para PC1/PC3; 54 por ciento para PC2; y 51 por ciento para LPC/PC7/PC8/SPC7. Nakayama K (1997) Biochem J. 327:625-35.

Se ha informado que PACE y PACE4 tienen sustrato parcialmente superpuestos, pero distintos. En particular, se ha informado que PACE4, en notable diferencia con PACE, es incapaz de procesar el polipéptido precursor de FIX. Wasley L C et al. (1993) J Biol Chem. 268:8458-65; Rehemtulla A et al. (1993) Biochemistry. 32: 11586-90.

50 La patente estadounidense n.º 5.840.529, concedida a Seidah et al., describe secuencias de nucleótidos y aminoácidos para PC7 humano y la notable capacidad de PC7, en comparación con otros miembros de la familia PC, para escindir gp160 a gp120 y gp41 de VIH.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de PC5 de roedor fueron descritas primero como PC5 por Lusson J et al. (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:6691-5 y como PC6 por Nakagawa T et al. (1993) J Biochem (Tokio) 113:132-5. La patente estadounidense n.º 6.380.171, concedida a Day et al., describe las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para PC5A humano, la isoforma sin el dominio transmembranario (véase, p. ej., las patentes estadounidenses 7.795.400 y 7.566.595).

Los genes que codifican los polipéptidos de la invención también se pueden expresar en células que no son de mamífero, tales como células de bacterias o levadura o planta. En este sentido, se apreciará que se pueden transformar también diversos microorganismos no mamíferos unicelulares tales como bacterias; es decir, aquellos capaces de cultivarse en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son susceptibles de transformación, incluyen miembros de enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; Bacillaceae, tal como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará, además, que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos típicamente se convierten en parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos se pueden aislar, purificar y después ensamblar en moléculas funcionales.

Además de los microbios procariontes, también se pueden usar eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadería común, es la más usada comúnmente entre los microorganismos eucariotas, aunque existen varias otras cepas comúnmente disponibles. Para la expresión en *Saccharomyces*, se usa comúnmente el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, n.º de ATCC 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión *trp1* como característica del genoma de la célula hospedante de levadura proporciona después un entorno eficaz para detectar la transformación por cultivo en ausencia de triptófano. Se pueden emplear también otros hospedantes de levadura como *Pichia*. Se desean vectores de expresión de levadura que tengan secuencias de control de la expresión (p. ej., promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato cinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables del uso de metanol, maltosa y galactosa.

Alternativamente, las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido se pueden incorporar en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y la posterior expresión en la leche del animal transgénico (véase, p. ej., Deboer et al., US 5.741.957, Rosen, US 5.304.489, y Meade et al., US 5.849.992). Los transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para polipéptidos en enlace funcional con un promotor y potenciador de un gen específico de glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

La producción *in vitro* permite la ampliación para proporcionar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Las técnicas para el cultivo de células de mamíferos en condiciones de cultivo de tejido se conocen en la técnica e incluyen cultivo en suspensión homogénea, p. ej., en un reactor de agitación por aire o en un reactor de agitación continua, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, p. ej., en fibras huecas, microcápsulas, sobre microperlas de agarosa o cartuchos de cerámica. Si se necesita y/o desea, las disoluciones de polipéptidos se pueden purificar mediante los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa o cromatografía de (inmuno-)afinidad, p. ej., después de la biosíntesis preferencial de un polipéptido de región bisagra sintético o antes o después de la etapa de cromatografía HIC descrita en la presente memoria. Una secuencia etiqueta de afinidad (p. ej., una etiqueta His(6)) se puede acoplar o incluir opcionalmente dentro de la secuencia polipeptídica para facilitar la purificación posterior.

En una realización, una célula hospedante de la invención puede comprender una construcción genética que codifica un polipéptido scFc y una o más enzimas que pueden escindir un enlazador cscFc (L). La construcción y la(s) enzima(s) se pueden expresar usando un vector simple o dos vectores. Cuando los polipéptidos se clonan en vectores de expresión separados, los vectores se cotransfectan para obtener la expresión y ensamblaje de proteínas enteras intactas.

Los métodos objeto resultan en una población de proteínas maduras que está sustancialmente enriquecida con la proteína madura de dos cadenas heterodimérica deseada en comparación con métodos de la técnica anterior. En una realización, una composición de polipéptido maduro de la descripción carece sustancialmente de no procesado (es decir, formas de cadena simple del polipéptido). En una realización, el medio de cultivo celular en el que las células hospedantes que expresan los polipéptidos de la invención comprenden una población de polipéptidos que carece sustancialmente de forma no procesada (es decir, formas de cadena simple) del polipéptido, lo que simplifica la purificación. En otra realización, el medio de cultivo celular en el que las células hospedantes que expresan los polipéptidos de la invención comprenden una población de polipéptidos que está enriquecida con formas activas de una forma biológicamente activa de una molécula. Por ejemplo, en una realización, la expresión de un polipéptido heterodimérico de la invención usando un enlazador cscFc permite la expresión de formas activas de moléculas, p. ej., factores de coagulación, sin la necesidad de activarlos en una etapa adicional.

Después de expresada, la proteína de dos cadenas madura se puede purificar según procedimientos estándares de la técnica, incluida precipitación de sulfato de amonio, cromatografía en columna de afinidad, purificación por HPLC, electroforesis en gel y similares (véase generalmente Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Se prefieren las proteínas sustancialmente puras con al menos aproximadamente 90 a 95 % de homogeneidad y, lo más preferible es 98 a 99 % o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos.

La producción *in vitro* permite la ampliación para proporcionar grandes cantidades de los polipéptidos alterados deseados de la invención. Las técnicas para el cultivo de células de mamíferos en condiciones de cultivo de tejido se conocen en la técnica e incluyen cultivo en suspensión homogénea, p. ej., en un reactor de agitación por aire o en

un reactor de agitación continua, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, p. ej., en fibras huecas, microcápsulas, sobre microperlas de agarosa o cartuchos de cerámica. Si se necesita y/o desea, las disoluciones de polipéptidos se pueden purificar mediante los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés), cromatografía sobre DEAE-celulosa o cromatografía de afinidad.

IV. Purificación de polipéptidos

En una instancia, la descripción se refiere a un método para la purificación de moléculas de polipéptido maduro de la descripción que se expresan con cadena doble (es decir, diméricas) que comprenden una región Fc que no es Fc genéticamente fusionada. Dichas moléculas se pueden separar de las moléculas no procesadas que comprenden una región Fc genéticamente fusionada, así como de otros contaminantes. Los métodos para la purificación se conocen en la técnica e incluyen, p. ej., cromatografía de exclusión por tamaño, columna de filtración en gel, SDS-PAGE, etc. La descripción también se refiere a poblaciones purificadas de moléculas de cadena doble.

V. Etiquetado o conjugación de restos funcionales con polipéptidos

Los polipéptidos de la presente invención se pueden usar en forma no conjugada o se pueden conjugar con al menos uno de una variedad de restos funcionales, p. ej., para facilitar la detección de la diana o para generar imágenes o tratar al paciente. Los polipéptidos de la invención se pueden etiquetar o conjugar antes o después de la purificación, cuando se lleva a cabo la purificación. En particular, los polipéptidos de la presente invención se pueden conjugar (p. ej., a través de un residuo cisteína manipulado) con un resto funcional. Los restos funcionales se acoplan preferiblemente a una porción del polipéptido distinta de un sitio de unión (p. ej., un enlazador polipeptídico o un resto Fc de una región Fc genéticamente fusionada (es decir, una región cscFc)).

Los restos funcionales ilustrativos incluyen citotoxinas (tales como radioisótopos, fármacos citotóxicos o toxinas), agentes terapéuticos, agentes citostáticos, toxinas biológicas, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos y modificadores de respuesta biológicos,

VI. Métodos para administrar polipéptidos de la invención

Los métodos para preparar y administrar polipéptidos de la invención a un sujeto se conocen o los pueden determinar sin inconvenientes los expertos en la técnica.

Las composiciones para administración a un sujeto incluyen moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de la invención ya se procesada o no procesada (para aplicaciones de terapia génica), así como moléculas polipeptídicas.

La vía de administración de los polipéptidos de la invención puede ser oral, parenteral, mediante inhalación o tópica. El término parenteral, según se usa en la presente memoria, incluye administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Las formas intravenosa, intraarterial, subcutánea e intramuscular de administración parenteral se prefieren generalmente. Aunque todas estas formas de administración están claramente contempladas dentro del alcance de la descripción, una forma de administración sería una disolución para inyección, en particular, inyección intravenosa o intraarterial o infusión intravenosa. Normalmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (p. ej., tampón de acetato, fosfato o citrato), a tensioactivo (p. ej., polisorbato), opcionalmente, un agente estabilizador (p. ej., albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas en la presente memoria, los polipéptidos se pueden suministrar directamente al sitio de la población celular adversa y aumentar, de esta manera, la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluidas disolución salina y medios tamponados. En la invención objeto, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, tampón de fosfato 0,01-0,1M y, preferiblemente, 0,05M o disolución salina al 0,8 %. Otros vehículos parenterales comunes incluyen disoluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, aceites de Ringer lactados o fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Los conservantes y otros aditivos también pueden estar presentes, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida que exista un uso fácil con jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferiblemente se conservará contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un medio disolvente o dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de estos. La fluidez adecuada se puede

mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tales como lecitina, que mantiene el tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión, y mediante el uso de tensioactivos.

5 La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Se puede lograr la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

10 En cualquier caso, las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar un compuesto activo (*p. ej.*, un polipéptido solo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes indicados en la presente memoria, según sea necesario, y posterior esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de aquellos indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización, que proporciona un polvo de un ingrediente 15 activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración de estos. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se cargan en contenedores tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales y se sellan en condiciones asépticas según métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones se pueden envasar y comercializar en forma de un kit tal como los descritos en U.S.S.N. 09/259.337 y U.S.S.N. 09/259.338 copendientes.

Dichos artículos de fabricación preferiblemente tendrán etiquetas o prospectos del envase que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o tiene predisposición a trastornos autoinmunitarios o neoplásicos.

25 Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de afecciones varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluidos medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos incluidos mamíferos transgénicos. Las dosificaciones para tratamiento se pueden titular usando métodos habituales conocidos para los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y eficacia.

30 En una instancia, la dosis de un resto biológicamente activo (*p. ej.*, que comprende FIX) puede variar de aproximadamente 25 a 100 UI/kg, *p. ej.*, 0,417 mg/kg a 1,67 mg/kg. En otra instancia, la dosis de un resto biológicamente activo (*p. ej.*, que comprende FVIII) puede variar de aproximadamente 25 a 65 UI/kg, *p. ej.*, 0,003125 mg/kg a 0,008125 mg/kg. En otra instancia, la dosis de un resto biológicamente activo (*p. ej.*, que comprende FVII) puede variar de aproximadamente 90 a 270 ug/kg o 0,090 mg/kg a 0,270 mg/kg.

35 En otra instancia, la dosificación puede variar, *p. ej.*, de aproximadamente 1000 ug/kg a 0,1 ng/kg de peso corporal. En una instancia, el intervalo de dosificación es 1 ug/kg a 100 ug/kg. En otra instancia, las dosis pueden variar de 0,0001 a 100 mg/kg y, más habitualmente, 0,01 a 5 mg/kg (*p. ej.*, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del hospedante. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, preferiblemente, al menos 1 mg/kg.

40 También se pretende que las dosis intermedias en los intervalos mencionados anteriormente estén dentro del alcance de la descripción. Se pueden administrar dichas dosis a los sujetos diariamente, en días alternantes, semanalmente o según cualquier otro régimen determinado por análisis empírico. Un tratamiento ilustrativo implica la administración en múltiples dosificaciones a lo largo de un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. En una instancia, los regímenes de tratamiento ilustrativos adicionales implican la administración una vez 45 cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los regímenes de dosificación ilustrativos incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos métodos, se administran dos o más polipéptidos con diferentes especificidades de unión simultáneamente, en tal caso la dosificación de cada polipéptido administrado está dentro de los intervalos indicados.

50 Los polipéptidos de la invención se pueden administrar en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones simples pueden ser semanalmente, mensualmente o anualmente. Los intervalos pueden ser también irregulares según la indicación al medir los niveles sanguíneos del polipéptido modificado o antígeno en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de polipéptido modificado en plasma de 1-1000 µg/ml y, en algunos métodos, 25-300 µg/ml. Alternativamente, los polipéptidos se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida, en tal caso, se requieren una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la semivida del polipéptido en el paciente.

La dosificación y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los polipéptidos de la invención o un cóctel de estos se administran a un paciente que todavía no padece la enfermedad para potenciar la resistencia del

paciente o reducir los síntomas asociados con una enfermedad o trastorno. Dicha cantidad se define como "una dosis eficaz profiláctica". En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta (p. ej., de aproximadamente 1 a 400 mg/kg de polipéptido por dosis, con dosificaciones de 5 a 25 mg como las más comúnmente usadas para radioinmunoconjugados y dosis más altas para polipéptidos modificados por citotoxina-fármaco) en intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina y, preferiblemente, hasta que el paciente exhibe una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A continuación, se pueden administrar un régimen profiláctico al paciente.

Los polipéptidos de la invención se pueden administrar opcionalmente en combinación con otros agentes que son eficaces para tratar el trastorno o afección que necesita tratamiento (p. ej., profiláctico o terapéutico).

Aunque los polipéptidos de la invención se pueden administrar según se describió inmediatamente atrás, se debe enfatizar que, en otra instancia, los polipéptidos se pueden administrar de cualquier otra manera a pacientes sanos como tratamiento de primera línea. En tales instancias, los polipéptidos se pueden administrar a pacientes que tienen reservas de médula roja normales o promedio y/o pacientes que no han y no están experimentando. Según se usa en la presente memoria, la administración de polipéptidos de la invención en conjunto o combinación con un tratamiento adjunto significa la administración o aplicación secuencial, simultánea, coextensiva, concurrente, concomitante o contemporánea del tratamiento y los polipéptidos descritos. Los expertos en la técnica apreciarán que la administración o aplicación de los diversos componentes del régimen terapéutico combinado se puede cronometrar para potenciar la eficacia general del tratamiento. Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos o biológicos se podrían administrar en ciclos de tratamiento estándares, conocidos junto con las moléculas objeto. Un experto en la técnica (p. ej., un médico) podría ser capaz de discernir sin inconvenientes los regímenes terapéuticos combinados eficaces sin experimentación indebida en función del tratamiento adjunto seleccionado y las enseñanzas de la presente memoria descriptiva.

En este sentido, se apreciará que la combinación del polipéptido y el agente se puede administrar en cualquier orden y dentro de cualquier marco temporal que proporcione un beneficio terapéutico al paciente. Es decir, el agente y el polipéptido se pueden administrar en cualquier orden o concurrentemente. En instancias seleccionadas, los polipéptidos de la presente invención se administrarán a pacientes que se sometieron a quimioterapia anteriormente. En otras instancias, los polipéptidos y el tratamiento quimioterapéutico se administrarán sustancialmente de manera simultánea o concurrente. Por ejemplo, se puede suministrar al paciente el polipéptido mientras recibe un ciclo de quimioterapia. En instancias preferidas, el polipéptido se administrará después de 1 año de cualquier agente o tratamiento. En otras instancias preferidas, el polipéptido se administrará después de 10, 8, 6, 4 o 2 meses de cualquier agente o tratamiento. En aún otras instancias preferidas, el polipéptido se administrará después de 4, 3, 2 o 1 semana de cualquier agente o tratamiento. En aún otras instancias, el polipéptido se administrará después de 5, 4, 3, 2 o 1 día de cualquier agente o tratamiento. Se apreciará, además, que los dos agentes o tratamientos se pueden administrar a un paciente después de horas o minutos (es decir, sustancialmente de manera simultánea).

En una instancia, un polipéptido de la invención se puede administrar como una molécula de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar usando técnicas conocidas en la técnica, que incluyen a través de un vector, plásmido, liposoma, inyección de ADN, electroporación, pistola génica, inyección intravenosa o infusión en la arteria hepática. En la técnica se conocen vectores para su uso en terapia génica.

Se apreciará, además, que las moléculas de la presente invención se pueden usar en conjunto o combinación con un agente o agentes (p. ej., para proporcionar un régimen terapéutico combinado). Los agentes ilustrativos con los cuales se puede combinar una molécula de la invención incluyen agentes que representan el tratamiento de referencia actual para un trastorno particular que se está tratando. Dichos agentes pueden ser de naturaleza química o biológica. El término "biológico" o "agente biológico" se refiere a cualquier agente farmacéuticamente activo hecho a partir de organismos vivos y/o sus productos que está previsto para uso como un agente terapéutico.

La cantidad de agente para usar en combinación con los polipéptidos de la presente invención puede variar según el sujeto o se puede administrar según lo que se sabe en la técnica. Véase, por ejemplo, Bruce A Chabner et al., *Antineoplastic Agents*, in GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287 (Joel G. Hardman et al., eds., 9a ed. 1996). En otra instancia, se administra una cantidad de dicho agente consistente con el tratamiento de referencia.

Según se describió anteriormente, los polipéptidos de la presente invención se pueden administrar en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de trastornos de mamíferos. En este sentido, se apreciará que la molécula de la invención se puede formular para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas según la presente invención comprenden un portador farmacéuticamente aceptable, no tóxico, estéril tal como disolución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. A los efectos de la presente solicitud, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido de la invención, conjugado o no conjugado con un agente terapéutico, se considerará que significa una cantidad suficiente para lograr un beneficio, p. ej., para mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno o para detectar una sustancia o una célula. Es evidente que las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en dosis simples o múltiples para proporcionar una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido.

5 Los polipéptidos de la invención tienen muchos usos como reconocerá un experto en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, métodos para tratar a un sujeto con una enfermedad o afección. Al mantenerse dentro del alcance de la presente descripción, la molécula de la invención se puede administrar a un humano u otro animal según los métodos de tratamiento mencionados anteriormente en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico o profiláctico. Se entenderá que el tipo de trastornos que se pueden tratar depende del resto biológicamente activo presente en el polipéptido y los efectos biológicos conocidos del resto biológicamente activo. Dada la naturaleza modular de los polipéptidos descritos, los expertos en la técnica pueden seleccionar los restos biológicamente activos y colocarse en un cóntigo scFc con un enlazador cscFc según la invención reivindicada.

10 En una instancia, cuando el polipéptido comprende un factor de coagulación como resto biológicamente activo, la descripción se refiere a un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno hemostático que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno polipéptido de la invención.

15 Los polipéptidos de la invención que comprenden un factor de coagulación se pueden usar para tratar o prevenir un trastorno hemostático al promover la formación de un coágulo de fibrina. Los polipéptidos de la invención se pueden usar para tratar trastornos hemostáticos, p. ej., los que se sabe que se pueden tratar con el factor de coagulación particular presente en el polipéptido. Los trastornos hemostáticos que se pueden tratar mediante la administración de la proteína quimérica de la invención incluyen, pero no se limitan a hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de Von Willebrand, carencia de factor XI (carencia de PTA), carencia de Factor XII, así como carencias o anomalías estructurales en fibrinógeno, protrombina, Factor V, Factor VII, Factor X o Factor XIII.

20 En una realización, el trastorno hemostático es un trastorno hereditario. En una realización, el sujeto tiene hemofilia A, y los polipéptidos comprenden Factor VII o Factor VIIa. En otra realización, el sujeto tiene hemofilia A y la proteína quimérica comprende Factor VII o Factor VIIIa. En otra realización, el sujeto tiene hemofilia B y la proteína quimérica comprende Factor X o Factor IXa. En otra realización, el sujeto tiene hemofilia B y los polipéptidos comprenden Factor VII o Factor VIIIa. En otra realización, el sujeto tiene anticuerpos inhibidores para el Factor VII o Factor VIIa y los polipéptidos comprenden el Factor VII o Factor VIIa. En aún otra realización, el sujeto tiene anticuerpos inhibidores contra el Factor IX o Factor IXa y los polipéptidos comprenden el Factor VII o Factor VIIa.

25 Los polipéptidos de la invención se pueden usar para tratar profilácticamente a un sujeto con un trastorno hemostático. Los polipéptidos de la invención se pueden usar para tratar un episodio hemorrágico agudo en un sujeto con un trastorno hemostático.

30 En una realización, el trastorno hemostático es el resultado de una carencia de un factor de coagulación, p. ej., Factor IX, Factor VIII. En otra realización, el trastorno hemostático puede ser el resultado de un factor de coagulación defectuoso.

35 En otra realización, el trastorno hemostático puede ser un trastorno adquirido. El trastorno adquirido puede resultar de una enfermedad o afección secundaria subyacente. La afección no relacionada puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse a, cáncer, una enfermedad autoinmunitaria o un embarazo. El trastorno adquirido puede resultar del envejecimiento o de un medicamento para tratar un trastorno secundario subyacente (p. ej., quimioterapia para cáncer).

40 La descripción también se refiere a métodos para tratar a un sujeto que no tiene un trastorno hemostático ni una enfermedad o afección secundaria que resulta en la adquisición de un trastorno hemostático. Por lo tanto, la descripción se refiere a un método para tratar a un sujeto que necesita un agente hemostático general que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno polipéptido de la invención. Por ejemplo, en una instancia, el sujeto que necesita un agente hemostático general se está sometiendo o está a punto de someterse a una cirugía. Los polipéptidos de la invención se pueden administrar antes o después de la cirugía para controlar un episodio hemorrágico agudo. La cirugía puede incluir, pero no se limita a, trasplante de hígado, extirpación de hígado o trasplante de célula madre.

45 En otra instancia, los polipéptidos de la invención se pueden usar para tratar a un sujeto que padece un episodio hemorrágico agudo que no tiene un trastorno hemostático. El episodio hemorrágico agudo puede resultar de un traumatismo grave, p. ej., cirugía, accidente automovilístico, herida, laceración por arma de fuego o cualquier otro evento traumático que resulta en una hemorragia descontrolada.

50 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben interpretar como limitantes.

Ejemplos

A lo largo de los ejemplos, se usaron los siguientes materiales y métodos a menos que se indique de cualquier otra manera.

55 Ejemplo 1: Clonación de pSYN-FVII-024

ES 2 739 503 T3

La secuencia codificante de FVII se obtuvo mediante transcripción inversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa a partir de una biblioteca de ARNm de hígado humano (Ambion, Austin, Texas) usando los siguientes cebadores:

FVII-F1

5 GGAATGTCAACAGGCAGGG (SEQ ID NO: 41)

FVII-R1

CTTGGCTTTCTCTCCACAGGC (SEQ ID NO:42)

Se llevó a cabo una reacción de 50 µl con 10 pmol de cada cebador usando la RT-PCR Superscript One-step con el sistema Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) según el protocolo estándar del fabricante en un termociclador MJ. El ciclo usado fue 50 °C durante 30 minutos para la transcripción inversa con posterior desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos y 30 ciclos de (94 °C 30 segundos, 53 °C 30 segundos, 72 °C 90 segundos) posteriormente 10 minutos a 72 °C. El tamaño de banda esperado (~1400 bp) se purificó en gel con kit de Gel Extraction (Qiagen, Valencia, Calif.) y se clonó en pCR2.1 TOPO usando el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) para producir el plásmido intermediario pSYN-FVII-001. Para construir un plásmido para la expresión de un heterodímero de FVII-Fc y Fc de dos cadenas, la secuencia codificante de FVII se amplificó por PCR usando los siguientes cebadores:

HindIII-Kozak-FVII-F

CGACAAGCTTGCCGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGG (SEQ ID NO: 43)

BspEI-Fc-FVII-R

CGACTCCGGAGCTGGGCACGGTGGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGGGAAATG

20 GGGCTCGCAGG (SEQ ID NO: 44)

El cebador directo HmdIII-Kozak-FVII-F agrega un sitio de restricción HindIII seguido por una secuencia Kozak inmediatamente antes de la región codificante de FVII. El cebador inverso BspEI-Fc-FVII-R agrega un fragmento de la región constante de IgG1 (la región Fc) que comprende los aminoácidos 221-233 (numeración UE). Este proceso también incorpora un sitio de restricción BspEI en los aminoácidos 231-233 usando la degeneración del código genético para conservar la secuencia de aminoácidos correcta (numeración UE). Se llevó a cabo una reacción de 50 µl con 15 pmol de cada cebador y la plantilla pSYN-FVII-001 usando el sistema Platinum Pfx DNA Polymerase según el protocolo del fabricante en un MJ Thermocycler usando los siguientes ciclos: 95 °C 2 minutos; 30 ciclos de (95 °C 15 segundos, 49 °C 30 segundos, 68 °C 90 segundos); 68 °C 10 minutos. El plásmido pSYN-FIX-027 (pBUD FIXFc/Fc) se digirió con HindIII y BspEI y la banda del tamaño esperado para el vector (aproximadamente 5800 bp) se retiró por purificación del inserto de FIX (tamaño de banda esperado de aproximadamente 1480 bp) con un kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, Calif.). A continuación, la secuencia de FVII amplificada por PCR se subclonó en los sitios HindIII y EcoRI del vector derivados de pSYN-FIX-027 después de retirar el inserto de FIX. Esto generó pSYN-FVII-002 (pBUD FVII/Fc/Fc). A continuación, se agregó un enlazador polipeptídico (GGGGS)_{6x} entre las secuencias codificantes de FVII y la región Fc en pSYN-FVII-002 usando los siguientes cebadores:

35 FVII-enlazador-F:

CATCCCCAGCAGTACGTCC (SEQ ID NO: 45)

FVII-enlazador-R:

GGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGATCCCCGCCACCGGAACCTCCACCGCCT

GATCCACCCCCACCTGATCCGCCGCCACCGGACCCACCTCCGCCGGAGCC

ACCGCCACCGGAAATGGGGCTCGCAGGAGG (SEQ ID NO: 46)

Fc-enlazador-F:

40 GACAAAACCTCACACATGCCACC (SEQ ID NO: 47)

Fc-enlazador-R:

GCAGAATTCTCATTTACCCGGAG (SEQ ID NO: 48)

Se llevaron a cabo dos reacciones de PCR de 12 µl con 12 pmol de FVII-enlazador-F y FVII-enlazador-R (reacción 1) o Fc-enlazador-F y Fc-enlazador-R (reacción 2) usando el Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Ind.) según el protocolo estándar del fabricante en un MJ Thermocycler. La primera y segunda

45

reacciones se llevaron a cabo con 1 µg de pSYN-FVII-002 como plantilla usando el siguiente ciclo: 94 °C 2 minutos; 14 ciclos de (94 °C 30 segundos, 55 °C 30 segundos, 72 °C 2 minutos); 72 °C 10 minutos. Las bandas del tamaño esperado (532 bp para la reacción 1 y 670 bp para la reacción 2) se purificaron en gel con un kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, Calif.), después se combinaron en una reacción PCR con 25 pmol de FVII-enlazador-F y Fc-enlazador-R como antes, pero con 30 pasadas de amplificación. La banda del tamaño esperado (aproximadamente 1200 bp) se purificó en gel con un kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, Calif.) y se digirió con las enzimas de restricción KpnI y EcoRI. La banda del tamaño esperado (920 bp) se purificó en gel como antes y se clonó en los sitios KpnI/EcoRI de pSYN-FVII-002 para generar pSYN-FVII-003 (pBUD FVIIFc/6x(GGGGS) (SEQ ID NO: 36)/Fc).

Clonación de pSYN-FVII-024 para expresar un heterodímero de dos cadenas

- 10 Se generó el plásmido (pSYN-FVII-024) para la expresión de un heterodímero de dos cadenas donde una cadena consiste en la cadena ligera de FVII (residuos 1-152) seguida por un enlazador (GGGGS)_{6x} (SEQ ID NO: 36) seguido por la región Fc, mientras que la otra cadena contiene una cadena pesada de FVII (residuos 153 a 406) seguida por un enlazador (GGGGS)_{6x} (SEQ ID NO: 36) seguido por la región Fc. El plásmido se diseñó para expresar el heterodímero como un polipéptido simple donde el extremo C de la cadena de cadena pesada de FVII-enlazador-Fc está conectado con el extremo N de la cadena de cadena pesada-enlazador-Fc mediante la siguiente secuencia polipeptídica: RRRRS-(GGGGS)_{6x}-RKRRKR (SEQ ID NO: 50), donde las secuencias RRRRS (SEQ ID NO: 38) y RKRRKR (SEQ ID NO: 39) son sitios de escisión por propeptina convertasa. La escisión intracelular mediante propeptina convertasa después de la última Arg en cada sitio de escisión puede resultar en la eliminación del enlazador polipeptídico. En consecuencia, las células expresarán un heterodímero de 2 cadenas donde la cadena de cadena ligera de FVII-enlazador-Fc tiene una secuencia RRRRS (SEQ ID NO: 38) en el extremo C, pero el resto del enlazador y la secuencia RKRRKR (SEQ ID NO: 39) se han retirado de cualquier otra manera. La construcción de pSYN-FVII-024 y diversos plásmidos intermediarios requiere el uso de los siguientes cebadores:

HindIII-Sall-BpEI-Fc-F

AGTCAAGCTTGTCTGACTCCGGAACTCCTGGGCGGACC (SEQ ID NO: 51)

- 25 BamHI-enlazador(PACE1)-Fc-R

CATCGGATCCCCGCCACCGGAACCTCCACCGCCTGATCCACCCCCACCT
GATCCGCCGCCACCGCTCCGGCGGCGCCGTTTACCCGGAGACAGGGAGAG
G (SEQ ID NO: 52)

HmdIII-Kozak-FVII-F

CGACAAGCTTGCCGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGG (SEQ ID NO: 43)

BspEI-Fc-enlazador-FVIIIC-R

GAGTTCGGGAGCTGGGCACGGTGGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGATCCCCC
GCCACCGGAACCTCCACCGCCTGATCCACCCCCACCTGATCCGCCGCCAC
CGGACCCACCTCCGCCGGAGCCACCGCCACCTCGGCCTTGGGGTTTGCTG
G (SEQ ID NO: 53)

- 30

BamHI-2xenlac-pace-HC-F

CAGTCTGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGGGGTGGATCAAGGAAGA
GGAGGAAGAGGATTGTGGGGGGCAAGGTGTGCC (SEQ ID NO: 54)

Fc-EcoRI-R

ATGTCTGAATTCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGG (SEQ ID NO: 55)

- 35 Para generar el primer plásmido intermediario, se llevó a cabo una reacción PCR con 25 pmol de los cebadores HindIII-Sall-BpEI-Fc-F y BamHI-enlazador(PACE1)-Fc-R y la plantilla pSYN-Fc-001 usando el Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Ind.) según el protocolo estándar del fabricante en un MJ Thermocycler. Se usaron los siguientes ciclos: 95 °C 2 minutos; 30 ciclos de (95 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos y 72 °C 1 minuto); 72 °C 10 minutos. La banda de tamaño correcto (aproximadamente 730 bp) se purificó en gel como anteriormente y se clonó en los sitios HindIII/BamHI del vector pBUDCE4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), generando pSYN-FVII-014. La amplificación por PCR con los cebadores HindIII-Sall-BpEI-Fc-F y BamHI-enlazador(PACE1)-Fc-R generó un fragmento de ADN que codifica una porción de la región Fc (Amino A X-Y) seguida por una secuencia RRRRS (SEQ ID NO: 38) y el enlazador polipeptídico (GGGGS)_{2x} (SEQ ID NO: 29). El cebador HindIII-Sall-BpEI-Fc-
- 40

F introduce un sitio de restricción HindIII y Sall en el extremo hacia 5' de la molécula, mientras que el cebador BamHI-enlazador(PACE1)-Fc-R introduce un BamHI en el extremo hacia 3' que se superpone con los codones que codifican los últimos 2 residuos del enlazador GGGGS (SEQ ID NO: 56) (residuos GS con codones GGA TCC)

5 A continuación, se llevó a cabo otra reacción PCR como anteriormente con los cebadores HindIII-Kozak-FVII-F y BspEI-Fc-enlazador-FVIIIC-R y la plantilla pSYN-FVII-002 usando las mismas condiciones descritas para la clonación de pSYN-FVII-014, pero con una temperatura de apareamiento de 57 °C. La banda del tamaño esperado (aproximadamente 700 bp) se purificó en gel y se clonó en los sitios HindIII y BspEI de pSYN-FVII-014 para generar pSYN-FVII-023. Los cebadores HindIII-Kozak-FVII-F y BspEI-Fc-enlazador-FVIIIC-R amplificaron un fragmento de ADN que codifica la cadena ligera de FVII seguida por un enlazador polipeptídico (GGGGS)_{6x} (SEQ ID NO: 36) y una porción de la región Fc hasta el aminoácido 232 (numeración UE). El cebador HmdIII-Kozak-FVII-F introduce un sitio de restricción HindIII en el extremo hacia 5' de la molécula seguido por una secuencia Kozak mientras que el cebador BspEI-Fc-enlazador-FVIIIC-R agrega un sitio BspEI en el extremo hacia 3' de la molécula.

15 En la etapa final, se llevó a cabo una reacción PCR como anteriormente con los cebadores BamHI-2xenlac-pace-HC-F y Fc-EcoRI-R y la plantilla pSYN-FVII-003 con los siguientes ciclos: 95 °C 2 minutos; 30 ciclos de (95 °C 30 segundos, 55 °C 30 segundos y 72 °C 2 minutos); 72 °C 7 minutos. Esta reacción PCR generó una molécula de ADN que codifica un enlazador polipeptídico (GGGGS)_{2x} (SEQ ID NO: 29) seguido por una secuencia RKRRKR (SEQ ID NO: 39) seguida por la cadena pesada de FVII. Los cebadores BamHI-2xenlac-pace-HC-F y Fc-EcoRI-R introducen un sitio BamHI y un sitio EcoRI en los extremos hacia 5' y 3' de la molécula, respectivamente. La banda del tamaño esperado (aproximadamente 1600 bp) se clonó en los sitios BamHI y EcoRI de pSYN-FVII-023 para generar pSYN-FVII-024. La estructura final de traducción de pSYN-FVII-024 se ilustra en la Figura 1B.

Ejemplo 2. Construcciones heterodiméricas que comprenden FIX-Fc

Clonación de pSYN-FIX-044

25 El plásmido pSYN-FIX-044 se construyó para la expresión de un heterodímero de FIX-Fc y Fc de 2 cadenas producido en la célula como una proteína de cadena simple donde la región de ADN codificante de FIX-Fc se enlaza con la segunda región codificante Fc mediante un fragmento de ADN que codifica la siguiente secuencia polipeptídica: RRRRS-(GGGGS)_{4x}-RRRR (SEQ ID NO: 57), donde la secuencia RRRR (SEQ ID NO: 40) es un sitio de escisión por proproteína convertasa. Las proproteína convertasas después escinden hacia 5' de la última Arg en las secuencias RRRRS (SEQ ID NO: 38) y RRRR (SEQ ID NO: 40) intracelularmente. En consecuencia, las células expresan un heterodímero FIX-Fc/Fc de 2 cadenas donde la cadena de FIX-Fc tiene una secuencia RRRRS (SEQ ID NO: 38) en el extremo C, pero el resto del enlazador y la secuencia RRRR (SEQ ID NO: 40) hacia 3' se han retirado de cualquier otra manera. Con este fin, la síntesis de un fragmento de ADN (Genscript-FIX-044) se tercerizó (Genscript, Piscataway, NJ). Este fragmento consistía en una secuencia de ADN que codifica una porción de la región Fc de los residuos 231-447 (numeración UE) seguida por una secuencia RRRRS (SEQ ID NO: 38) seguida por el enlazador polipeptídico (GGGGS)_{4x} (SEQ ID NO: 6) y una secuencia RRRR (SEQ ID NO: 40) antes de otra porción de la región Fc (residuos 221-230, numeración UE). La región de ADN que codifica los residuos 231-233 de la región Fc en 5' de la molécula se superpone con el sitio BspEI, mientras que la región que codifica los residuos 236-238 de la región Fc en 3' de la molécula incluye un sitio de restricción RsrII. Se diseñó Genscript-FIX-044 para que el sitio RsrII de la región Fc hacia 5' y el sitio BspEI de la región Fc hacia 3' se retiraran usando la degeneración del código genético para conservar la secuencia de aminoácidos correcta. Se escindió Genscript-FIX-044 con las enzimas de restricción BspEI y RsrII y se clonó en los mismos sitios de pSYN-FIX-029 para generar pSYN-FIX-044. La estructura final de traducción de pSYN-FIX-044 se ilustra en la Figura 1B.

Ejemplo 3. Construcciones heterodiméricas que comprenden FVII-Fc y MB9-Fc

Clonación de pSYN-FVII-027

45 El plásmido (pSYN-FVII-027) se generó para la expresión del heterodímero FVII-Fc y MB9-Fc, donde MB9 es un scFv que se mostró anteriormente que se unía al receptor GPIIb/IIIa en plaquetas activadas. La proteína de pSYN-FVII-027 se expresó en la célula como un polipéptido simple donde el extremo C de la subunidad FVII-Fc está enlazado con el extremo N de la subunidad MB9-Fc mediante un enlazador polipeptídico (GGGGS)_{6x} (SEQ ID NO: 36). Además, las secuencias RRRRS (SEQ ID NO: 38) y RKRRKR (SEQ ID NO: 39) se insertaron en los extremos 5' y 3' del enlazador polipeptídico, respectivamente, para la escisión intracelular mediante proproteína convertasas después de la última Arg en cada secuencia. En consecuencia, las células expresarán un heterodímero FVII-Fc/MB9-Fc de 2 cadenas donde la cadena de FVII-Fc tiene una secuencia RRRRS (SEQ ID NO: 38) en el extremo C, pero el resto del enlazador y la secuencia RKRRKR (SEQ ID NO: 39) se han retirado de cualquier otra manera.

Como una primera etapa se generó una serie de plásmidos intermediarios usando los siguientes cebadores:

HindIII-Sall-BspEI-Fc-F

55 AGTCAAGCTTGTCTCGACTCCGGAACTCCTGGGCGGACC (SEQ ID NO: 51)

BamHI-enlazador-Fc-R

CATCGGATCCCCGCCACCGGAACCTCCACCGCTGATCCACCCCCACCT
GATCCGCCGCCACCTTTACCCGGAGACAGGGAGAGG (SEQ ID NO: 58)

BclI-Fc-F

CAGTCTTGATCAGACAAAACCTCACACATGCCACC (SEQ ID NO: 59)

scFc-EcoRI-R

5 ACTGACGAATTCTCATTTACCCGGAGACAGGGAG (SEQ ID NO: 60)

HmdIII-Kozak-FVII-F:

CGACAAGCTTGCCGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGG (SEQ ID NO: 43)

FVII-HC-BspEI-R:

AGGAGTTCCGGAGCTGGGCACGGTGGGCATGTGTGAGTTTTGTCCGGATCC
CCCGCCACCGGAACCTCCACCGCCTGATCCACCCCCACCTGATCCGCCGC
CACCGGACCCACCTCCGCCGGAGCCACCGCCACCGGGAAATGGGGCTCGC
AGGAGG (SEQ ID NO: 61)

10 Se llevó a cabo una reacción PCR de 50 ul con 25 pmol de HindIII-Sall-BpEI-Fc-F y BamHI-enlazador-Fc-R y la
plantilla pSYN-Fc-001 usando el siguiente ciclo: 95 °C 2 minutos; 30 ciclos de (95 °C 30 segundos, 54 °C 30
segundos, 72 °C 1 minuto). La banda del tamaño esperado (~700 bp) se purificó en gel con un kit Gel Extraction
(Qiagen, Valencia, Calif.) y se clonó en los sitios de restricción HindIII y BamHI de pBUDCE4 (Invitrogen, Carlsbad,
15 Calif.) para generar el intermediario pSYN-FVII-007. Los cebadores HindIII-Sall-BpEI-Fc-F y BamHI-enlazador-Fc-R
amplifica la región Fc comenzando en el aminoácido 221 (numeración UE) y agregan un HindIII y un sitio de enzima
de restricción Sall inmediatamente antes de la región Fc de sitio, así como un fragmento de ADN que codifican
un enlazador (GGGGS)_{4x} (SEQ ID NO: 6) seguido por un sitio BamHI inmediatamente después de la región codificante
Fc. A continuación, se llevó a cabo una reacción de 50 ul con 25 pmol de BclI-Fc-F y scFc-EcoRI-R y la plantilla
20 pSYN-Fc-011 usando los mismos ciclos que anteriormente. La banda de tamaño esperado (~700 bp) se purificó en
gel como anteriormente, se cortó con enzimas de restricción BamHI y EcoRI, y se clonó en los sitios de restricción
BclI/EcoRI de pSYN-FVII-007 para generar el plásmido intermediario pSYN-FVII-008. El par de cebadores BclI-Fc-F
y scFc-EcoRI-R amplifica la región Fc mientras agrega los sitios de restricción BclI y EcoRI inmediatamente antes
y después de la región codificante Fc, respectivamente. Para generar el último plásmido intermediario, se llevó a cabo
25 una reacción PCR de 50 ul con 25 pmol de HindIII-Kozak-FVII-F y FVII-HC-BspEI-R y la plantilla pSYN-FVII-001
usando el siguiente ciclo: 95 °C 2 minutos; 30 ciclos de (95 °C 30 segundos, 55 °C 30 segundos, 72 °C 90
segundos). El par de cebadores amplifica la región codificante de FVII mientras agrega un fragmento de ADN en el
extremo hacia 3' de la molécula que codifica un enlazador polipeptídico (GGGGS)_{6x} (SEQ ID NO: 36) seguido por un
30 fragmento de la región Fc que termina en el aminoácido 221 (numeración UE). El cebador HindIII-Kozak-FVII-F
genera un sitio de restricción HindIII en el extremo hacia 5' de la molécula seguido por una secuencia Kozak
directamente antes de la región codificante de FVII. El cebador FVII-HC-BspEI-R introduce ADN que codifica el
enlazador polipeptídico, así como la porción Fc. La banda del tamaño esperado (~1500 bp) se purificó en gel como
anteriormente y se clonó en los sitios HindIII/BspEI de pSYN-FVII-008 para generar pSYN-FVII-011.

A continuación, se sintetizaron 2 fragmentos de ADN: Genescript-FVII-027-1 y Genescript-FVII-026-2. Genescript-
FVII-027-1 consiste en un fragmento de ADN que codifica una porción de la región Fc (que comienza en el
35 nucleótido 1306, numeración UE) seguida por la secuencia RRRRS-(GGGGS)_{6x}-RKRRKR (SEQ ID NO: 50) seguida
por una porción de MB9 scFv (los residuos 1-142). Un sitio EcoRI se introdujo en la secuencia codificante de MB9
usando la degeneración del código genético para conservar la secuencia de aminoácidos adecuada y se superpone
con las últimas 6 bases de Genescript-FVII-027-1. Además, las primeras 6 bases en 5' incluyen un sitio SapI que se
40 encuentra dentro de la región Fc. Genescript-FVII-026-2 consiste en un fragmento de ADN que codifica una porción
de MB9 (residuos 143-273) seguida por el enlazador polipeptídico (GGGGS)_{6x} (SEQ ID NO: 36) seguido por la
región Fc y un sitio EcoRI. Un sitio EcoRI se introdujo en la secuencia codificante de MB9 usando la degeneración
del código genético para conservar la secuencia de aminoácidos adecuada y se superpone con las primeras 6 bases
de Genescript-FVII-026-2.

45 Genescript-FVII-027-1 se clonó en los sitios SapI y EcoRI de pSYN-FVII-011 para generar pSYN-FVII-036. A
continuación, se clonó Genescript-FVII-026-2 en el sitio EcoRI de pSYN-FVII-036 para generar pSYN-FVII-027. El
sentido correcto de la última etapa de clonación se confirmó mediante análisis con enzima de restricción y
secuenciación de ADN. La estructura final de traducción de pSYN-FVII-027 se ilustra en la Figura 1B.

Ejemplo 4. Transfecciones transitorias de células

Las células HEK-293-F se cultivaron en suspensión en medios Freestyle (Invitrogen) complementado con vitamina K3 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) hasta 2 µg/litro (medios de cultivo) como células en suspensión a 37 °C/CO₂ al 10 %. Las células se subcultivaron cada tres a cuatro días mediante sembrado a una densidad celular de 5x10⁵ células/ml.

5 Veinticuatro horas antes de la transfección, las células se sembraron a una densidad de 7x10⁵ células/ml en medios de cultivo complementados con LONG™R3IGF-1 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) hasta 20 µg/litro (medios de transfección). El día de la transfección, se produjo una disolución de transfección con un volumen igual a 5 % del volumen total del cultivo celular a transfectar. En la disolución de transfección se agregó ADN (concentración final de 20 mg/L) a una disolución recientemente producida de PEI (60 mg/L) en medios de transfección. La disolución se
10 agitó durante 30 segundos y se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente antes de agregarla directamente al cultivo celular. Cuatro horas después se agregó a las células un volumen igual al volumen del cultivo celular de OptiCHO (Invitrogen) complementado con vitamina K3 (cuando se transfectaron las construcciones de FIX o FVII)(LONG™R3IGF-1 y 200 mM de L-glutamina. El cultivo celular se dejó crecer como se mostró anteriormente y se tomaron diariamente muestras de medios para evaluar la expresión proteica.

15 Ejemplo 5. Análisis de proteína generado a partir de transfecciones transitorias

Para el análisis de proteína a partir de transfecciones transitorias, los medios acondicionados a partir de las transfecciones se sometieron a inmunoprecipitación de proteína A. En resumen, el sobrenadante del cultivo celular se mezcló con aproximadamente 50 µl de suspensión de proteína A-Sepharose al 50 % y se incubó a 4 °C con agitación durante 1 hora, a continuación, se centrifugó para aglomerar las perlas de proteína A. Las perlas se
20 lavaron dos veces al resuspenderlas en 1 ml de PBS, agitarlas y aspirarlas. Las perlas se resuspendieron con electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras o no reductoras, se calentaron durante 5 minutos a 100 °C, se agitaron y cargaron sobre geles de SDS-PAGE y se analizaron según los protocolos estándares. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se llevaron a cabo transferencias Western para detectar la región Fc o la cadena ligera de FVII. Para la detección de Fc, se usó un anticuerpo anti-IgG humana de cabra (específico para Fc) conjugado con peroxidasa de rábano picante (anticuerpo de Pierce ImmunoPure, n.º de catálogo 31413). Para la detección de la cadena ligera de FVII, se usó un anticuerpo monoclonal anticadena ligera (Green Mountain, clon 6MA-219). Los anticuerpos se diluyeron 1:15.000 (para la detección de Fc) o 1:200 (para la detección de la cadena ligera) en PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %) con leche desnatada seca al 5 % y se incubaron con la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la
25 membrana se lavó en PBST 3 veces durante 10 minutos y se detectó la señal mediante un método quimioluminiscente para la detección de Fc. Para la detección de la cadena ligera de FVII, la membrana se incubó adicionalmente durante una hora en una disolución que contenía anticuerpo anti-ratón de cabra etiquetado con HRP (Southern Biotech, n.º 1010-05) diluido 1:5000 en PBST. La membrana también se lavó en PBST 3 veces durante 10 minutos y se detectó la señal mediante un método quimioluminiscente. La detección quimioluminiscente se llevó a
30 cabo usando ECL Plus Western Blotting Detection System (n.º de catálogo de Amersham Biosciences RPN2132) según el protocolo del fabricante. La señal se visualizó en un Storm 840 Phosphorimager (Molecular Devices). Alternativamente, los geles de proteína se podrían haber analizado mediante tinción con Coomassie Blue.

Ejemplo 6. La generación de construcciones que comprenden sitios de procesamiento alternativos

40 Clonación del intermediario pSYN-FIX-056: La síntesis del fragmento de ADN Genscript-FVII-043 se tercerizó (Genscript). Este fragmento consistía en una molécula de ADN que codifica una porción de la región Fc (residuos 232 a 447, numeración UE) seguida por un enlazador polipeptídico (GGGGS)4x (SEQ ID NO: 6) y otra porción de la región Fc (residuos 221 a 238, numeración UE). Este fragmento de ADN se digirió con BspEI y RsrII y se subclonó en los sitios BspEI/RsrII de pSYN-FIX-044 para generar pSYN-FIX-049. El fragmento HindIII/EcoRI de pSYN-FIX-049 que comprende la región codificante de FIX seguido por la región codificante de Fc de cadena simple se
45 subclonó en los sitios HindIII/EcoRI de pBUDCE4.1 (Invitrogen) para generar pSYN-FIX-056.

Clonación de pSYN-FIX-050, -052 y -053: La síntesis de los fragmentos de ADN Genscript-FIX-050, -052, -053 se tercerizó (Genscript). Estos fragmentos comprenden una porción de la región Fc (desde el sitio Sall en pSYN-FIX-056), una secuencia RRRRS (SEQ ID NO: 38), un polipéptido (GGGGS)4x (SEQ ID NO: 6), un sitio de escisión por propéptido convertasa variable y una porción de la región Fc (hasta el RsrII en la segunda Fc de pSYN-FIX-056).
50 Cada fragmento de ADN codifica un sitio de escisión por propéptido convertasa variable diferente: genscript-FIX-050, RAGR; genscript-FIX-052 RSKR; y genscript-FIX-053, RKRRKR (SEQ ID NO: 39) (por lo tanto, son idénticos a 044 con la excepción de estas secuencias; 044 comprende el sitio RRRR(SEQ ID NO: 40)). Los fragmentos Sall/RsrII de Genscript-FIX-050, -052 y -053 se subclonaron en los sitios Sall/RsrII de pSYN-FIX-056 para generar pSYN-FIX--050, -052 y -053, respectivamente.

55 Ejemplo 7: Construcciones de FIXFc con enlazador cscFc

Se produjo la construcción FIX-044 (Figura 3A) que comprenden una molécula de FIX seguida por una región Fc con un enlazador cscFc que conecta ambos restos Fc según se describe en la Figura 3A. La Figura 3B muestra los datos de transferencia western (western de Fc) para FIX-044 después de la transfección y la precipitación de la proteína A. FIX-044 se cotransfectó con Kex2, PC7, PACE o PC5.

Clonación de PC5

La secuencia de clonación para PC5 humano se obtuvo por RT-PCR. Se usaron los siguientes cebadores (las áreas que se aparean con el ADNc se indican en negrita):

Cebadores	SEQ ID NO	Secuencias
PC5-KpnI-F:		5'- ATCTACACCATCTCCATCAGCAGC -3'
PC5-NotI-R:		5'-AAGGCGGCCGCT CAGCCTT GAAATGTACATGTTTTGC-3'
PC5-UTR-F:		5'- AGCGAGGGAGCAGCGAGG -3'
PC5-HindIII-R:		5'- GGTAGTTGACATGGCGGTTGG -3'
PC5-Afl2-F:		5'-CAGCGACTTAAGCCACCATGGGCTGGGGGAGCCG-3'
PC5-KpnI-R:		5'- GTAGGTTGTGGCCAGCGTGG -3'

5 La secuencia codificante para PC5 humano (n.º de acceso de GenBank NM-006200) se obtuvo en dos partes. Los ~1750 bp hacia 3' se obtuvieron usando los cebadores PC5-KpnI-F y PC5-NotI-R con RT-PCR de Invitrogen SUPERSCRIPT™ con el kit PLATINUM™ Taq según el protocolo estándar del fabricante, a partir de ARNm de hígado humano. El ciclo que se usó para la transcripción inversa fue de 30 min a 50 °C seguido por desnaturalización a 94 °C durante 2 min y 35 ciclos de 94 °C durante 15 seg, 54 °C durante 30 seg, 72 °C durante 3 min, seguido por extensión de 10 min a 72 °C y después almacenamiento a 4 °C. Esto produjo un fragmento del sitio KpnI interno en la secuencia codificante de PC5 a través del codón de terminación, con un sitio NotI agregado en el extremo 3'. Este fragmento a continuación se clonó en pCR2.1 TOPO según el protocolo del fabricante para generar pSYN-PC5-001 (pCR2.1/PC5 (KpnI-NotI)). A continuación, este fragmento se subclonó en pcDNA3.1/hygro usando los sitios de restricción KpnI y NotI para generar pSYN-PC5-002 (pcDNA3.1/hygro/PC5 (KpnI-NotI)).

15 Los ~1100 bp hacia 5' de PC5 se obtuvieron en dos etapas. Primero se amplificó mediante RT-PCR usando los cebadores PC5-UTR-F y PC5-HindIII-R para amplificar un fragmento de ~1520 bp del ARNm de hígado humano, usando condiciones similares a las anteriores, con una temperatura de apareamiento de 57 °C. Estos cebadores tienen homología completa con la secuencia de PC5 natural, en la secuencia hacia 5' y la secuencia hacia 3' no traducida desde el sitio HindIII interno único, respectivamente. Cabe señalar que este sitio HindIII no está presente en la construcción final debido a una sustitución de nucleótido silenciosa. Este fragmento de ADN a continuación se purificó en gel y se usó como plantilla para una segunda reacción PCR con PC5-Afl2-F, que agrega un sitio de clonación AflII seguido por una secuencia Kozak a la secuencia codificante en el extremo N hacia el extremo 5' y PC5-KpnI-R, que se aparean hacia 3' con el sitio KpnI interno único, para generar un fragmento de ~1100 bp. La reacción se llevó a cabo con el EXPAND™ High Fidelity Sistema según el protocolo estándar del fabricante en un MJ Thermocycler usando los siguientes ciclos: 94 °C, 2 min; 14 ciclos de (94 °C, 30 seg, 57 °C, 30 seg, 72 °C, 2 min), seguido por 72 °C, 10 min. A continuación, este fragmento se subclonó en pSYN-PC5-002 usando los sitios de restricción AflII y KpnI para generar pSYN-PC5-003 (pcDNA3.1/hygro/PC5).

ES 2 739 503 T3

La secuencia de nucleótidos que codifica PC5 en pSYN-PC5-003 tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO):

```

atgggctggg      ggagccgctg      ctgctgcccg      ggacgttttg      acctgctgtg
cgtgctggcg      ctgctcgggg      gctgectgct      ccccgtgtgt      cggacgcgcg
tctacaccaa      ccaactgggca      gtcaaaatcg      cggggggctt      cccggaggcc
aacggtatcg      ccagcaagta      cggattcatc      aacataggac      agataggggc
cctgaaggac      tactaccact      tctaccatag      caggacgatt      aaaaggtcag
ttatctcgag      cagagggacc      cacagtttca      tttcaatgga      accaaaggtg
gaatggatcc      aacagcaagt      ggtaaaaaag      cggacaaaga      gggattatga
cttcagtcgt      gccagtcta      cctatttcaa      tgatcccaag      tggcccagta
tgtggtatat      gcactgcagt      gacaatacac      atccctgcca      gtctgacatg
aatatcgaag      gagcctggaa      gagaggtac      acgggaaaga      acatttgtgt
cactatcctg      gatgacggaa      ttgagagaac      ccatccagat      ctgatgcaaa
actacgattc      tctgcaagt      tgcgacgtga      atgggaatga      cttggacca
atgctcgtt      atgatgcaag      caacgagaac      aagcatggga      ctgctgtg
tggaagaagt      gcagccgctg      caaacaattc      gcactgcaca      gtcggaattg
ctttcaacgc      caagatcgg      ggagtgcga      tgctggacgg      agatgtcacg
gacatggtt      aagcaaaatc      agttagctt      aacccccagc      acgtgcacat
ttacagcgcc      agctggggcc      cggatgatga      tggcaagact      gtggacggac
cagccccct      caccoggcaa      gcctttgaaa      acggcgttag      aatggggcgg
agaggcctcg      gctctgtgtt      tgtttgggca      tctggaaatg      gtggaaggag
caaagaccac      tgctcctgtg      atggctacac      caacagcatc      tacaccatct
cctcagcag      cactgcagaa      agcggaaaga      aacctggta      cctggaagag
tgttcatcca      cgctggccac      aacctacagc      agcggggagt      cctacgataa
gaaaatcatc      actacagat      tgaggcagcg      ttgcacggac      aaccacactg
ggacgtcagc      ctgagcccc      atggctgcag      gcatcattgc      gctggccctg
gaagccaatc      cgtttctgac      ctggagagac      gtacagcatg      ttattgtcag
gacttcccg      gcgggacatt      tgaacgctaa      tgactggaaa      accaatgctg
ctggtttta      ggtgagccat      ctttatggat      ttggactgat      ggacgcagaa
gccatggtga      tggaggcaga      gaagtggacc      accgttcccc      ggcagcacgt
gtgtgtggag      agcaaacagc      gacaatcaa      gataatccgc      cctaacagtg
cagtgcgctc      catctacaaa      gcctcagget      gctcagataa      ccccaaccgc
catgtcaact      acctggagca      cgtcgttgtg      cgcatcacca      tcaccacccc
caggagagga      gacctggcca      tctacctgac      ctgcccctct      ggaactaggt
ctcagctttt      ggccaacagg      ctatttgatc      actccatgga      aggatcaca
aactgggagt      tcatgacoat      tcattgctgg      ggagaaagag      ctgctggtga
ctgggtcctt      gaagtttatg      ataactcctc      tcagtaagg      aactttaaga
ctccaggtaa      attgaaagaa      tggtctttgg      tccctacgg      cacctccgtg
cagccatatt      caccaccaa      tgaatttccg      aaagtggaac      ggttccgcta
tagccgagtt      gaagaccca      cagacgacta      tggcacagag      gattatgcag
gtcctgcga      ccctgagtgc      agtgaggttg      gctgtgacgg      gccaggacca
gaccactgca      atgactgttt      gcactactac      tacaagctga      aaaacaatac
caggatctgt      gtctccagct      gccccctgg      ccaactaccac      gccgacaaga
agcgtgcag      gaagtgtgcc      cccaactgtg      agtccctgctt      tgggagccat
ggtgaccaat      gcatgtcctg      caaatatgga      tactttctga      atgaagaaac
caacagctgt      gttactcact      gccctgatgg      gtcatatcag      gataccaaga
aaaatctttg      ccgaaatgc      agtgaaaact      gcaagacatg      tactgaattc

cataactgta      cagaatgtag      ggatgggtta      agcctgcag      gatcccgggtg
ctctgtctcc      tgtgaagatg      gacggtattt      caacggccag      gactgccagc
cctgccaccg      ctctgcgcc      acttgtgctg      gggcaggagc      tgatgggtgc
attaactgca      cagagggcta      ctccatggag      gatgggagat      gcgtgcagag
ctgtagtatc      agctattact      ttgaccactc      ttcagagaat      ggatacaaat
cctgcaaaaa      atgtgatatc      agttgtttga      cgtgcaatgg      cccaggattc
aagaactgta      caagctgcc      tagtgggtat      ctcttagact      taggaatgtg
tcaaatggga      gccatttgc      aggatgcaac      ggaagagtcc      tgggcggaag
gaggctctg      tatgcttgtg      aaaaagaaca      atctgtgcca      acggaaggtt
cttcaacaac      tttgctgcaa      aacatgtaca      tttcaaggc

```

- 5 SEQ ID NO: contiene sustituciones con respecto a la secuencia de GenBank que no afectan la secuencia codificante de aminoácidos. Específicamente, el nucleótido en la posición 399 (correspondiente a la posición 876 del n.º de acceso de GenBank NM-006200) es una T en lugar de una C, pero conserva el aminoácido Ser 133 (correspondiente a la numeración de aminoácidos en el n.º de acceso de GenBank NP-006191); la posición de nucleótido 1473 (posición 1950 de GenBank) es una C en lugar de una T, pero conserva el aminoácido Ala 491; y la posición de nucleótido 1485 (posición 1962 de GenBank) es una A en lugar de una G, pero conserva el aminoácido Ser 496. El cambio de nucleótido en la posición 1473 elimina un sitio de restricción HindIII.
- 10

Clonación de PACE-SOL

La secuencia codificante para PACE humano se obtuvo por RT-PCR. Se usaron los siguientes cebadores (las áreas que se aparean con el ADNc se indican en negrita):

	SEQ ID NO	
PACE-F1:		5'-GGTAAGCTTGCCATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGC-3'
PACE-R1:		5'-GTTTTCAATCTCTAGGACCCACTCGCC-3'
PACE-F2:		5'-GCCAGGCCACATGACTACTCCGC-3'
PACE-R2:		5'-GGTGAATTCTCACTCAGGCAGGTGTGAGGGCAGC-3'

5 El cebador PACE-F1 agrega un sitio HindIII al extremo hacia 5' de la secuencia de PACE que comienza con 3 nucleótidos antes del codón de inicio, mientras que el cebador PACE-R2 agrega un codón de terminación después del aminoácido 715, que se producen en el extremo del dominio extracelular de PACE, así como también agrega un sitio EcoRI en el extremo hacia 3' del codón de terminación. Los cebadores PACE-R1 y PACE-F2 se aparean en los lados hacia 3' y 5' de un sitio BamHI interno, respectivamente. A continuación, se montaron dos reacciones RT-PCR usando 25 pmol cada una de los pares de cebadores de PACE-F1/R1 o PACE-F2/R2 con 20 ng de ARN de hígado humano adulto (Clontech; Palo Alto, Calif.) en una reacción RT-PCR de 50 µl usando la RT-PCR SUPERSRIPT™ One-Step con el sistema PLATINUM® Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA.) según el protocolo del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un MJ Thermocycler usando los siguientes ciclos: 50 °C 30 minutos; 94 °C 2 minutos; 30 ciclos de (94 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos, 72 °C 2 minutos), seguido por 72 °C 10 minutos. Cada uno de estos fragmentos se ligó en el vector pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) y se secuenció completamente. A continuación, el fragmento F2-R2 se subclonó en pcDNA6 V5/His (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando los sitios BamHI/EcoRI, y después el fragmento F1-R1 se clonó en esta construcción usando los sitios HindIII/BamHI. El plásmido final, pcDNA6-PACE, produce una forma soluble de PACE (aminoácidos 1-715), dado que la región transmembranaria se ha eliminado. La secuencia de PACE en pcDNA6-PACE se describe esencialmente en Harrison S et al., (1998) Semin Hematol 35(2 Suppl 2):4-10.

Clonación de Kex2-SOL

20 La secuencia codificante para la endoproteasa de levadura, KEX2, se obtuvo por RT-PCR a partir de ARNm poliA+ de *Saccharomyces cerevisiae* (BD Clontech, n.º de cat. 6999-1) usando los siguientes cebadores (las áreas que se aparean con el ADNc se indican en negrita):

Cebadores	SEQ ID NO	Secuencias
KEX2-F:		5'-GCGCTAGCCGTACGGCCGCCACCATGAAAGTGAGGAAATATATTAC- TTTATGC-3'
KEX2-BglII-F:		5'-GCTATTGATCACAAGATCTACATCCTCC-3 '
KEX2-BglII-R:		5'-GGAGGATGTAGATCTTTGTGATCAATAGC-3'
KEX2-675-R:		5'-GCGAATTCGGTCCGTCATTGCCTAGGGCTCGAGAGTTTTTTAGGA- GTGTTTGGATCAG-3'

25 Estos cebadores se usaron para obtener la secuencia codificante para KEX2 (aminoácidos 1-675), el homólogo de levadura para PACE, en dos partes de manera similar a la usada para PACE-SOL, Ejemplo 3 anterior; de manera similar, la región transmembranaria se retiró para generar la forma soluble de la proteína.

Clonación de PC7-SOL

La secuencia codificante para PC7 se obtuvo por RT-PCR a partir de ARNm de hígado adulto humano usando los siguientes cebadores (las áreas que se aparean con el ADNc se indican en negrita):

	SEQ ID NO	
PC7-BamMut-F:		5'-GCATGGACTCCGATCCCAACG-3'
PC7-BamMut-R:		5'-CGTTGGGATCGGAGTCCATGC-3'
PC7-F:		5'-GGTAAGCTTGCCGCCACCATGCCGAAGGGGAGGCAGAAAG-3'
PC7 -SOL-R:		5'- TTTGAATTCTCAGTTGGGGGTGA TGGTGTAAAC-3'
PC7-Xma-F:		5'-GGCACCTGAATAACCGACGG-3'
PC7-Xma-R:		5'-CGTCACGTTGATGTCCCTGC-3'

Estos cebadores se usaron para obtener la secuencia codificante para PC7 (aminoácidos 1-663) en tres partes de manera similar a la usada para PACE-SOL, anteriormente; de manera similar, la región transmembranaria se retiró para generar la forma soluble de la proteína.

- 5 La escisión más eficaz del enlazador cscFc se observó cuando se cotransfectó con PC5 y PACE (condiciones reductoras, carriles 11 y 12). Se generó una serie de construcciones (FIX-050, FIX-052 y FIX-053) donde el segundo sitio de procesamiento se modificó como se muestra en la Figura 3A. Estas construcciones se transflectaron transitoriamente (con o sin cotransfección de PC5) y las proteínas se analizaron mediante transferencia western de Fc y posterior precipitación de proteína A como se muestra en la Figura 3C. La escisión óptima de cscFc se observó para FIX-052 y -053 con cotransfección de PC5

Ejemplo 7: Procesamiento intracelular del enlazador cscFc en el heterodímero FVIIaFc que resulta en la expresión de proteasa activa

- 15 La Figura 2 revela una construcción de FVIIc (FVII-024) expresada como un heterodímero de dos cadenas donde una cadena consiste en la cadena ligera de FVII seguida por un enlazador (GGGGS)_{6x} seguido por el primer resto Fc, mientras que la otra cadena contiene una cadena pesada de FVII seguida por un enlazador (GGGGS)_{6x} seguido por el segundo resto Fc. El plásmido se diseñó para expresar el heterodímero como un polipéptido simple donde el extremo C de la cadena de cadena pesada de FVII-enlazador-Fc está conectado con el extremo N de la cadena de cadena pesada-enlazador-Fc mediante la siguiente secuencia polipeptídica: RRRRS-(GGGGS)_{6x}-RKRRKR donde las secuencias RRRRS y RKRRKR son sitios de escisión por proproteína convertasa. Se clonó FVII-024, se expresó transitoriamente y se analizó mediante análisis de transferencia western, según se describió en la presente memoria. El plásmido que expresa FVII-024 se cotransfectó con PC5 para procesar completamente el enlazador cscFc, descrito en la secuencia proteica, que conecta el extremo C del primer resto Fc con el extremo N de la cadena pesada. El efecto de PC5 sobre el procesamiento de los sitios de escisión por proproteína convertasa en el enlazador FVII-024 se evaluó como se muestra en la Figura 2. En condiciones no reductoras, el efecto de PC5 sobre el procesamiento del sitio de escisión no se puede detectar porque las subunidades cadena ligera de FVII-Fc y cadena pesada de FVII-Fc permanecen enlazadas a través de 2 uniones disulfuro en la región Fc (carriles 2 y 3). En condiciones reductoras, se observó el procesamiento parcial de FVII-024 generado a partir de células no cotransfectadas con PC5 (carril 4), pero el procesamiento completo cuando las células estaban cotransfectadas con PC5 (carril 5). La escisión completa de los sitios de procesamiento resulta en la generación de la forma activa de FVIIa, que requiere un extremo N libre de la cadena pesada para adoptar una conformación activa

Ejemplo 8: Procesamiento del enlazador cscFc en FVIIIc

- 35 La construcción FVIIIc ilustrada en la Figura 4 se clonó y purificó. En resumen, la secuencia codificante de FVIII con dominio B eliminado recombinante humana se obtuvo mediante transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir de ARN poli A de hígado humano (Clontech) usando cebadores específicos para FVIII. La secuencia de FVIII incluye la secuencia señal natural para FVIII. La eliminación del dominio B comienza después de la serina 743 (S743; 2287 bp) y termina antes de la glutamina 1638 (Q1638; 4969 bp) para una eliminación total de 2682 bp (versión SQ).

- 40 La secuencia codificante para Fc recombinante humano se obtuvo por RT-PCR a partir de una biblioteca de ADNc de leucocitos humanos (Clontech) usando cebadores específicos para Fc. Los cebadores se diseñaron de manera que la secuencia FVIII con el dominio B eliminado se fusionara directamente con el extremo N de la secuencia Fc sin enlazador intercalado. La secuencia de ADN de FVIIIc se clonó en el vector de expresión doble de mamífero pBUDCE4.1 (Invitrogen) bajo el control de un promotor de CMV.

Una segunda secuencia de Fc idéntica que incluía la secuencia señal de Igk de ratón se obtuvo mediante RT-PCR y se clonó después del segundo promotor, EF1 α , en el vector de expresión pBUDCE4.1. Se diseñó esta construcción final pSYN-FVIII-013.

5 Se creó un segundo plásmido con construcciones similares usando PCR y técnicas de biología molecular estándares, para expresar rFVIII_{BDD}-Fc-Fc en el que la secuencia codificante de rFVIII_{BDD}Fc se fusionó con la segunda secuencia Fc con un enlazador (GGGGS)₄, que permitió la producción de solo el híbrido monómero-dímero rFVIII_{BDD}-Fc en transfección transitoria. Se diseñó esta construcción pSYN-FVIII-041. Para producir pSYN-FVIII-049, se generó el intermediario pSYN-FVIII-048 al clonar el fragmento NheI/XhoI de pBUD-CE4.1 en pSYN-FVIII-013. La síntesis de un fragmento de ADN que comprende la región de RsrII en los sitios XbaI de pSYN-FVIII-049 se tercerizó. Este fragmento se subclonó en los sitios RsrII/XbaI de pSYN-FVIII-048 para generar pSYN-FVIII-049.

10 La proteína se expresó mediante transfección transitoria según se describe en la presente memoria. Se cotransfectó PC5 para procesar completamente el enlazador cscFc, descrito en la secuencia proteica, que conecta el extremo C del primer resto Fc con el extremo N del segundo resto Fc. El análisis SDS PAGE en la Figura 4 revela 3 bandas distintas para FVIII-049 purificado en condiciones reductoras: cadena ligera-Fc (LC-Fc), cadena pesada (HC) y Fc. Esto muestra que el enlazador que conectaba ambos restos Fc se había procesado.

Ejemplo 9 Procesamiento del enlazador cscFc en FVII-Fc

Clonación de pSYN-FVII-064

La síntesis de la secuencia de ADN de HindIII en EcoRI de pSYN-FVII-064 se tercerizó y se clonó en los sitios HindIII/EcoRI de pBUDCE4.1 (Invitrogen)

20 Expresión y purificación de FVII-064

El ADN se transfectó transitoriamente según se describe en la presente memoria. El ADN de transfección contenía PC5 para procesar completamente el enlazador cscFc, descrito en la secuencia proteica, que conecta el extremo C del primer resto Fc con el extremo N del segundo resto Fc.

Caracterización de la escisión del enlazador cscFc de FVII-064

25 Se purificó FVII-064 usando intercambio iónico: Q sepharose 4FF de GE healthcare. La captura secundaria se llevó a cabo usando afinidad con shFcRn (FcRn soluble humano) (shFcRn acoplado a NHS con perlas de sepharose 4FF). Todas las etapas se llevaron a cabo con una velocidad de flujo lineal de 150cm/h. La Figura 5 ilustra el análisis SDS PAGE de FVII-064 después de la expresión transitoria (cotransfectado con PC5) y purificación. En condiciones reductoras, observamos 2 bandas distintas para FVII-Fc y Fc, lo que demuestra la escisión completa del enlazador cscFc

Ejemplo 10. Procesamiento de cscFc de una proteína FVIIc con una construcción dirigida a plaquetas

35 En este ejemplo, se expresó transitoriamente FVII-027 (Figura 6) con cotransfección de PC5 para eliminar el enlazador cscFc descrito en la secuencia proteica. La construcción se clonó, se expresó y purificó según se describe en la presente memoria. El análisis SDS PAGE de la proteína purificada en la Figura 6 reveló dos bandas distintas para FVII-Fc y MB9-Fc en condiciones reductoras, lo que muestra que el enlazador cscFc se procesó completamente.

Ejemplo 11 Procesamiento de cscFc de una proteína de fusión Interferón-beta Fc

40 En este ejemplo, generamos una construcción (IFN-beta-018) que expresa interferón-beta seguido por un enlazador y una región Fc, donde ambos restos Fc están conectados mediante un enlazador cscFc. La construcción se clonó de la siguiente manera: la síntesis de un fragmento de ADN de BsiWI/BspEI de pSYN-IFN-b-018 se tercerizó y subclonó en los sitios BsiWI/BspEI de pSYN-FIX-053 para generar pSYN-IFN-b-018. La Figura 10 ilustra el análisis de transferencia Western de especie IFN-beta-018 después de la transfección transitoria de células HEK 293 (con o sin cotransfección de PC5) y la precipitación de proteína A. Los datos de la transferencia Western revelaron la escisión completa de los enlazadores cscFc cuando se cotransfectaron con PC5.

45 Ejemplo 12. Intentos adicionales de expresión de construcciones activadas

Se hicieron diversas construcciones adicionales con el objetivo de expresar FVII activado y se ilustran en la Figura 7. Sin embargo, estas construcciones no expresaron satisfactoriamente moléculas activadas.

Clonación de pSYN-FVII-010

50 La construcción FVII-010 es una en la que la cadena pesada del factor VII se expresó en el contexto de un cóntigo scFc y la cadena ligera se expresó por separado.

Se amplificó por PCR con los pares de cebadores FVII-HC-Hind3-IggKss-F/FVII-HC-BspEI-R, usando pSYN-FVII-001. Se clonó en los sitios BspEI/HindIII de pSYN-FVII-008 (véase supra) y generó pSYN-FVII-009.

Se amplificó por PCR la cadena ligera de FVII a partir de pSYN-FVII-003 (consultar P0830) con los cebadores FVII-LC-NotI-F/ FVII-LC-XhoI-R y se clonó en pSYN-FVII-009 para generar pSYN-FVII-010

5 Cebadores

FVII-HC-BspEI-R

AGGAGTCCGGAGCTGGGCACGGTGGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGGATCCCCGCCACCGGAACCTCCA
CCGCTGATCCACCCACCTGATCCGCCGCCACCGGACCCACCTCCGCCGGAGCCACCGCCACCGGGA
AATGGGGCTCGCAGGAGG

FVII-HC-Hind3-IggKss-f

ACTGACAAGCTTGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTGCTGGGTCCA
GGTCCACTGGTATTGTGGGGGCAAGGTGTGC

10 **FVII-LC-NotI-F**

ACTGACGCGGCCGCGCCGCCACCATGGTCTCCCAGG

FVII-LC-XhoI-R

ACTGACCTCGAGTTATCGGCCTTGGGGTTTGCTGG

Clonación de pSYN-FVII-013

15 La construcción FVII-013 es una en la que la cadena ligera se expresó en el contexto de un cóntigo scFc y la cadena pesada se expresó por separado.

Se amplificó por PCR con los pares de cebadores FVII-LC-enlazador-BamHI-R/ HindIII-Kozak-FVII-F a partir de pSYN-FVII-001. La secuencia codificante de FVII se obtuvo mediante transcripción inversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa a partir de una biblioteca de ARNm de hígado humano (Ambion, Austin, Texas) usando los siguientes cebadores:

20

FVII-F1

GGAATGTCAACAGGCAGGG

FVII-R1

CTTGGCTTTCTCTCCACAGGC

25 Se llevó a cabo una reacción de 50 µl con 10 pmol de cada cebador usando la RT-PCR Superscript One-step con el sistema Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) según el protocolo estándar del fabricante en un termociclador MJ. El ciclo usado fue 50 °C durante 30 minutos para la transcripción inversa con posterior desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos y 30 ciclos de (94 °C 30 segundos, 53 °C 30 segundos, 72 °C 90 segundos) posteriormente 10 minutos a 72 °C. El tamaño de banda esperado (~1400 bp) se purificó en gel con kit de Gel Extraction (Qiagen, Valencia, Calif.) y se clonó en pCR2.1 TOPO usando el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) para producir el plásmido intermediario pSYN-FVII-001 y se clonó en los sitios BamHI/HindIII de pSYN-FVII-011, para generar pSYN-FVII-012. Se amplificó por PCR FVII-HC a partir de pSYN-FVII-009 usando el par de cebadores FVII-HC-NotI-F/FVII-HC-XhoI-R y se subclonó en pSYN-FVII-012 para generar pSYN-FVII-013

30

Cebadores

35 **FVII-LC-6xenzalador-BamHI-**

RCTGACGGATCCCCGCCACCGGAACCTCCACCGCTGATCCACCCACCTGATCCGCCGCCACCGG
ACCCACCTCCGCCGGAGCCACCGCCACCTCGGCTTGGGGTTTGCTGGC

HindIII-Kozak-FVII-F

CGACAAGCTTGCCGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGG

FVII-HC-NotI-F

ACTGACGCGGCCGCGCCGCCACCATGGAGACAGAC

FVII-HC-XhoI-R

ACTGACCTCGAGTTAGGGAAATGGGGCTCGCAGGAG

Clonación de pSYN-FVII-018

40 Para la construcción FVII-018, la cadena pesada de FVII se expresó como una proteína de fusión Fc y la cadena ligera de FVII se expresó por separado como una proteína de fusión Fc separada.

Se usaron los cebadores FVII-HC-Hind3-IggKss-F/scFc-EcoRI-R para amplificar por PCR HCFVII-enlazador-Fc, usando pSYN-FVII-010 como plantilla. Se subclonó en los sitios HindIII/EcoRI de pBUDCE4. Esto produjo pSYN-FVII-017. A continuación, se amplificó por PCR pSYN-FVII-013 con los cebadores FVII-LC-NotI-F/FC-XHOI-R y se subclonó en los sitios XhoI/NotI de FVII-017. Esto produjo PSYN-FVII-018

5 Cebadores

scFc-EcoRI-R
ACTGACGAATTCTCATTACCCGGAGACAGGGAG

Fc-XhoI-R
AGCTCTCGAGTCATTACCCGGAGACAGGG

10 La Figura 8 ilustra el análisis de transferencia Western de especies de FVIIFc después de la transfección transitoria de células HEK 293 y la precipitación de proteína A de las moléculas ilustradas en la Figura 7. Los datos de transferencia Western muestran que la cadena pesada de FVII no se puede expresar con extremo N libre usando un método común de fusionar un péptido señal heterólogo con el extremo N de la cadena pesada.

Ejemplo 13. Intentos alternativos para expresaron construcciones de FVII-Fc activadas

15 La incapacidad para expresar la cadena pesada de FVII con un extremo N libre nos llevó a generar las construcciones descritas en la Figura 11. Aquí, FVIIFc se expresa como un heterodímero, donde una subunidad comprende la cadena ligera de FVII y un resto Fc, y la otra subunidad comprende la cadena pesada precedida por un sitio de procesamiento RKRRKR (FVII-019) o por un fragmento de extremo C de cadena ligera y un sitio de procesamiento RKRRKR (FVII-020). Nuestra hipótesis es que esto puede facilitar la expresión de la subunidad de
20 cadena pesada-resto Fc dado que la cadena pesada no adoptaría la conformación activa hasta la escisión del sitio de procesamiento en el Golgi. Estas construcciones se analizaron mediante transferencia western de Fc y posterior precipitación de proteína A del material transfectado transitoriamente. Se usó FVII-011 (FVIIFc con un Fc de cadena simple) como testigo. Solo se observó la cadena ligera-Fc, lo cual sugiere que la cadena pesada Fc no se puede expresar a partir de FVII-019 ni FVII-020

25 Ejemplo 14. Expresión de proteínas FVIIFc activadas en las estructuras de monómero y heterodímero

Clonación de pSYN-FVII-025.

La síntesis de un fragmento de ADN que comprende la región codificante de FVII de XbaI a BsiWI con una inserción de aminoácidos RKRRKR entre R152 y I153 (numeración de secuencia madura) se tercerizó. El fragmento de ADN se subclonó en los sitios XbaI/BsiWI de pSYN-FVII-011 (cuya secuencia se incluye en la presente memoria) para
30 generar pSYN-FVII-025

La Figura 9 ilustra una construcción de cscFc heterodimérica (FVII-024) y una construcción de Fc monomérica (FVII-025). Estas construcciones se produjeron y se llevaron a cabo transferencias western con posterior precipitación de proteína A y la expresión transitoria con o sin cotransfección de PC5. Los datos muestran que la activación intracelular en el contexto del heterodímero o el monómero permitió la expresión de la cadena pesada separada,
35 pero que la activación intracelular es más eficaz en el contexto del heterodímero (FVII-024) que el monómero (FVII-025).

Ejemplo 15: Purificación proteica

Purificación proteica de FVII-064

Las moléculas de FVII-064 se purificaron a partir de medios acondicionados 1) cromatografía de intercambio aniónico con elución de pseudo-afinidad (p. ej., Q sepharose 4FF (GE Healthcare) con posterior elución con niveles variables de CaCl₂ para eluir selectivamente las especies más activas), posteriormente 2) cromatografía de afinidad por shFcRn (FcRn soluble humano) (shFcRn acoplado a NHS con perlas de sepharose 4FF), unión de proteínas que contienen Fc a pH bajo (p. ej., pH 6,2) y elución a pH neutro (p. ej., pH 8,0). Estas etapas de purificación usaron métodos estándares conocidos para los expertos en la técnica para generar proteínas purificadas de >95 % de
45 pureza mediante análisis SEC y SDS-PAGE.

Purificación de FVII-049

Se purificó FVIII-049 a partir de medios de cosecha clarificados y químicamente definidos usando un proceso de purificación de dos columnas, incluida una etapa de purificación por afinidad específica para FVIII (McCue 2009 Journal of Chromatography A. 1216:7824) con posterior intercambio aniónico con elución de NaCl estándar. Estas etapas de purificación usaron métodos estándares conocidos para los expertos en la técnica para generar proteínas purificadas de >95 % de pureza mediante análisis SEC y SDS-PAGE.
50

Listado de secuencias informal

Secuencia de nucleótido de pSYN-FVII-024

```

atggtctccc aggcacctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct
gcagttctcg taaccacagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac
gcgttctctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtg
tccttcgagg aggcctcgga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt
tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctccctgcaag
gaccagctcc agtccatata ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag
acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc
agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca
gacgggggtg cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa
aaaagaaatg ctagcaaac ccaaggccga ggtggcggtg gctccggcgg aggtgggtcc
ggtggcggcg gatcaggtgg ggggtgatca ggcggtggag gttccggtag cgggggatca
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gctccggaac tcctggggcg accgtcagtc
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtactggac
ggcgtggagg tgcataatgc caagcaaaag ccgcgggagg agcagtaaaa tgaatggcaa ggagtacaag
cgtgtggtca catgctcctc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa
tgcaaggtct ccaacaagc gagaaaccaca ggtgtacacc ctgccccatc cccgggatga gctgaccaag
gggcagcccc aaccaggtca cctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat gcctcggag
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca accgtggaca agagcaggtg
gacggctcct tcttctctca gatgcattgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
aacgtcttct ctccgggtaa acggcgccgc cggagcggtg gcggcggatc aggtgggggt
ctctccctgt ctccgggtaa acggcgccgc cggagcggtg gcggcggatc aggtgggggt
ggatcaggcg gtggaggttc cgggtgcccgg ggatccggcg gtggaggttc cgggtgggggt
ggatcaagga agaggagga gaggattgtg gggggcaagg tgtgccccaa aggggaggtg
ccatggcaga tccgtgtgtt ggtgaatgga gctcagttgt gtggggggac cctgatcaac
accatctggg tgggtctccgc ggcccactgt ttcgacaaaa tcaagaactg gaggaacctg
atcgcggtgc tgggcagca cgacctcagc gacacgacg gggatgagca gagccggcg
gtggcgagg tcatcatccc cagcacgtac gtcccgggca ccaccaacca cgacatcgcg
ctgctccgcc tgcaccagcc cgtggtcctc actgaccatg tgggtcccct ctgctgccc
gaacggacgt tctctgagag gacgtggccc ttctgctgct tctcattggt cagcggctgg
ggccagctgc tggaccgtgg ccceacggcc ctggagctca tggtectcaa cgtgccccg
ctgatgaccc aggactgcct gcagcagtea cggaaaggtg gagactcccc aaatatcacg
gagtacatgt tctgtgccc ctactcggat ggcagcaagg actcctgcaa gggggacagt
ggaggcccc atgccaccga ctaccggggc acgtggtacc tgacgggcat cgtcagctg
ggccagggtc gcgcaaccgt gggccacttt ggggtgtaca ccagggtctc ccagtacatc
gagtggctgc aaaagctcat gcgctcagag ccacgcccag gagtctcct cggagcccc
tttccgggtg cgggtggttc cggcgagggt gggtcgggtg gcggcggatc aggtgggggt
ggatcaggcg gtggaggttc cgggtgcccgg ggatcagaca aaactcacac atgccaccg
tgcccagcac ctgaaactcct gggaggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag
gacacctca tggatctccc gaccctgag gtcacatgag tgggtggtgga cgtgagccac
gaagacctg aggtcaagtt caactggtac gttggacggcg tggaggtgca taatgccaa
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggatcagcgt cctcaccgtc
ctgcaccagg actgctgtaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc
ccagccccc tgcagaaaac catctccaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg
tacacctgc ccccatcccc ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgctg
gtcaaaagg tctatcccag gcacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag
aacaactaca agaccacgcc tcccgtgttg gactccgacg gctcctctt cctctacagc
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaaac tcttctcatg ctccgtgatg
catgaggtc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctc cctgtctcc gggtaaatga

```

5 Secuencia de aminoácidos de FVII-024. La secuencia señal se muestra en subrayado punteado, el propéptido tiene doble subrayado, la región de enlazador que conecta la cadena ligera o cadena pesada de FVII con la región Fc está subrayada, la región Fc se muestra en cursiva y el enlazador con sitios de procesamiento por proproteína convertasa se muestra en negra

```

MVSQAHRLLG...LLGLHGGLA AVFVTOEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
THKDDQLICV NENGCEQYC SDHTGTRKRC RCHEGYSLLA DGVSTPTVE YPCGKIPILE
KRNASKPQGR GGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS DKTHTCPPCP APELLGGPSV
FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK KVSNKALPA PIEKTI SKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD DSGFFLYSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSSLSPGKRRR RSGGGSGGG GSGGGSGGG GSGGGSGGG
GSRKRRKRIV GGKVC PKGEC PWQVLLLVNG AQLCGGTLIN TIWVSA AHC FDKIKNWRNL
IAVLGEHDLN EHDGDEQSR VAQVI IPSTY VPGTNHDIA LLRLHQ PVVL TDHVPLCLP
ERTFSERTLA FVRFSLVSGW GQLLD RGATA LELMVLN VPR LMTQDCL QQS RKVGDS PNIT
EYMFACAGYS DGSKDSCKGDS GGPHATHYRG TWYLTG I VS W GQC ATVGHF GVYTRV SQYI
EWLQKLMRSE PRPGVLLRAP FPGGGSGGG GSGGGSGGG GSGGGSGGG GSDKTH THCPP
CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMS RTPE VTCVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
TKPREEQYNS TYRIVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTI ISK AKGQPREPQV
YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFP SDIA VEWESNGQPE NNYKTPPV L DSG FFLYS
KLTVDKSRWQ QGNVFS CSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

```

Secuencia de ADN de pSYN-FVII-027

```

atggtctccc aggcacctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct
gcagtcctcg taaccacagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac
ggttcctcgg aggagctcgc gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtg
tccttcgaggg agggccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt
tcttacagtg atggggacca gtgtgectca agtccatgcc agaatggggg ctctgcaag
gaccagctcc agtccatata tctgttctgc ctccctgect tcgagggccg gaactgtgag
accgacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc
agtgaccaca cgggcaccaa gcgctectgt cgggtgccag aggggtactc tctgctggca
gacgggggtg cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa
aaaagaaatg ccagcaaac ccaaggccga attgtggggg gcaagggtgt ccccaaaggg
gagtgccat ggcaggtcct gttgttgggt aatggagctc agtgtgtgg ggggaccctg
atcaaacacca tctgggtggt ctcccgggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg
aacctgatcg cgggtgctggg cgagcacgac ctacgcgagc acgacgggga tgagcagagc
cggcggggtg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac
atcgcgctgc tccgctgca ctcccgctg gtcctcaact accatgtggt gccctctgc
ctgcccgaac ggagctttct tgagaggacg ctggcctteg tgcgcttctc attggtcagc
ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc ctggcctgca agctcatggt cctcaactgc
cccgggctga aacccagga ctgcctgcag cagtcaaggga agtggggaga ctccccaaat
atcacggagt acatgttctg tgccggctac tccgatggca gcaaggactc ctgcaagggg
gacagtggag gccacatgc caccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc
agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctccag
tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgccc tcagagccac gcccaggagt cctctgcca
gccccatttc ccggtggcgg tggctccggc ggaggtgggt cccggtggcg cggatcaggt
gggggtggat agggcgggtg aggttccggt ggcgggggat cccgacaaaac tcaacatgc
ccaccgtgcc cagctccgga actcctgggc ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa
cccaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgctggt ggtggactg
agccacgaag accctgaggt caagtcaac tggtactgag acggcgtgga ggtgcataat
gccaagacaa agccggggga ggagcagtac aacagcagct accgtgtggt cagcgtcctc
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaac agtgcaaggt ctccaacaaa
gcctcccag ccccctcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca
caggtgtaca ccctgcccc atccccggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc
tgctgtgca aaggctteta tcccagcgac atcgcctggt agtgggagag caatgggcag
ccgagaaaca actacaagac cagcctccc gtgttggact cccagcggtc tcttctctc
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaactctt ctcatgctcc
gtgatgcatg aggtctctga caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt
aaaccggcgc ccctggagcg tggcgcgga tcaggtgggg gtggatcagg cgggtggagg
tccggtggcg ggggatccgg cgggtggagg tccggtgggg gtggatcaag gaagaggagg
aagagggcgg aagtgcagct ggtgcagctc ggagctgagg tgaataagcc tggggcctca
gtgaaggtct cctgcaagg gcttgatac accttaccg gctactatc gcactgggtg
cgacaggccc ctggacaagg gcttgagtgg atgggatgga tcaacctaa cagtggtggc
acaaactatg gcaggaagtt tcagggctgg gtcaccatga ccagggacac gtccatcagc
accgctaca tggagttag cagctgaga tctgacgaca cggccgtgta ttactgtgcg
agagccctg ctttgtataa cgggaacgac cggccccca actggttca cccctggggc
caggaacccc ttgtcaccgt ctccctcagg agtgcatccg ccccaacct taagcttga
gaaggtgaat tctcagaagg acgcgtacag gctgtgctga ctacgccc ccggtgtca
gtggccccag gacagacggc caggattacc tgtgggggaa acaacattg aagtaaaagt
gtgcagtggt accagcagaa gccaggccag tgtgggggaa tggctgctc tgatgatagc
gaccggcct cagggatccc tgagcgatc actctgggaa catggccacc
ctgaccatca gcaggttca agccggggat gaggccgact attactgtc ggtgtgggat
agttagtagt atcatgtggt attcggcgga gggaccaagc tgaccgtcct aggtcagccc
aaggtgccc cctcggtcac ccgtccgcg ggtgcccag cgcgtggtgg cgggtgctcc
ggcgagggtg ggtccggtgg cggcggatca ggtgggggtg gatcaggcgg tggaggttc
ggtggcgggg gatcagacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg
ggaggaccgt cagtcttct cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg
accctgagg tcacatgct ggtggtggac gtgagccaag aagacctga ggtcaagttc
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac cagccccat cgagaaaacc
atctccaag ccaagggca gccccgagaa ccacaggtgt cccatcccgc
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcct acctgcctg tcaaaggett ctatcccagc
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgct
cccgtgttg actccgacgg ctctctctc ctctacagca agctaccgt ggacaagagc
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatg tccgtgatgc atgaggctc gcaaacacc
tacacgcaga agagcctct cctgtctcc ggtaaatga

```

- 5 Secuencia de aminoácidos de FVII-027. La secuencia señal se muestra en subrayado punteado, el propéptido tiene doble subrayado, la región de enlazador que FVII o MB9 con la región Fc está subrayada y el enlazador con sitios de procesamiento por proproteína convertasa se muestra en negrita

MVSOALRLIC	ILIGLOGCIA	<u>AVFVTOEEAH</u>	<u>GVLHRRRRAN</u>	AFLEELRPGS	LERECKEEQC
SFEAREIFK	DAERTKLEWI	SYSDGDQCAS	SPCQNGGSC	DQLQSYICFC	LPAFEGRNCE
THKDDQLICV	NENGGCEQYC	SDHTGTKRSC	RCHEGYSLLA	DGVSCTPIVE	YPCGKIPILE
KRNASKPQGR	IVGGKVC PKG	ECPWQVLLLV	NGAQLCGGTL	INTIWVSAA	HCFDKIKNWR
NLIAVLGEHD	LSEHDGDEQS	RRVAQVI IPS	TYVPGTTHND	IALLRLHQFV	VLTDHVPLC
LPERTF SERT	LAFVRFSLVS	GWGQLLDRGA	TALELMVLNV	PRLMTQDCLQ	QSRKVGDSFN
ITEYMF CAGY	SDGSKDSCKG	DSSGPHATHY	RGTWYLTGIV	SWGQGCATVG	HFGVYTRVSQ
YIEWLQKLMR	SEPRPGVLLR	APFPGGGGSG	GGGSGGGSG	GGGSGGGSG	GGGSDKTHTC
PPCPAPPELLG	GPSVFLFFPK	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVKFN	WYVDGVEVHN
AKTKPREEQY	NSTYRVVSVL	TVLHQDWLNG	KEYKCKVSNK	ALPAPIEKTI	SKAKGQPREP
QVYTLPPSRD	ELTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTTPP	VLDSGGSFFL
YSKLTVDKSR	WQQGNVFS	VMHEALHNHY	TQKSLSLSPG	KRRRRSGGGG	SGGGSGGGGG
SGGGSGGGGG	SGGGSRKRR	KRAEVQLVQS	GAEVNKP GAS	VKVSCKASGY	TFTGYMHVNV
RQAPGGGLEW	MGWINPNSGG	TNYAQKFGW	VTMTRDTSIS	TAYMELSLR	SDDTAVYYCA
RGRALYNRND	RSPNWFDPWG	QGTLVTVSSG	SASAPT LKLE	EGEFSEARVQ	AVLTQPPSVS
VAPGQTARIT	CGGNIGSKS	VQWYQKPGQ	APVLVVYDDS	DRPSGIPERF	SGNSNGMAT
LTISRVEAGD	EADYYCQVWD	SSSDHVVF GG	GTKLTVLQGP	KAAPSVTLFP	<u>PSAAAAGGGGS</u>
<u>GGGGSGGGGS</u>	<u>GGGGSGGGGS</u>	<u>GGGGSDKTHT</u>	CPPCPAPELL	GGPSVFLFFP	KPKDTLMISR
TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	ITVLHQDWLN
GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS
DAVEWESNG	QPENNYKTTP	PVLDSGGSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFS	SVMHEALHNH
YTQKSLSLSP	GK*				

Secuencia de ADN de pSYN-FIX-044

```

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatacccat ctgcctttta
ggatatctac tcagtgctga atgtacaggt ttgtttcctt ttttaaaata cattgagtat
gcttgccctt tagatataga aatatctgat gctgtcttct tcactaaatt ttgattacat
gatttgacag caatattgaa gagtctaaca gccagcacgc aggttggtta gtactgtggg
aacatcacag attttgctc catgccctaa agagaaaatt gcttccagat tatttgatt
aaaaaacaag actttcttaa gagatgtaaa attttcatga tgttttctt tttgctaaaa
ctaagaatt attcttttac atttcagttt ttcttgatca tgaacacgcc acaaaaattc
tgaatcgccc aaagaggtta aattcaggtta aattggaaga gtttgttcaa gggaactctag
agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt ttgaagaagc acgagaagtt ttgaaaaca
ctgaaagaac aactgaattt tggaaagcag atgttgatgg agatcagttg gactccaatc
catgttttaa tggcggcagt tgcaaggatg acattaattc ctatgaatgt tgggtccct
ttggatttga aggaagaac tgtgaattag atgtaacatg taacattaag aatggcagat
gcgagcagtt ttgtaaaaat agtgcagata acaagggtgt ttgctcctgt actgagggat
atcgacttgc agaaaaccag aagtcctgtg aaccagcagt gccatttcca tgtggaagag
tttctgtttc acaacttct aagctcacc gtgctgagac tgttttctc gatgtggact
atgtaaatte tactgaagct gaaaccattt tggataacat cactcaaagc acccaatcat
ttaatgactt cactcgggtt aagatgccc aaatgccc aaatgccc aaatgccc
aggttgtttt gaatggtaaa gttgatgcat tctgtggagg ctctatcgtt aatgaaaaat
ggattgtaac tgtgcccac tgtgtgaaa ctggtgttaa aattacagtt gtcgcaggtg
aacataaatg tagggagaca gacataacag agcaaaagc aaatgtgat cgaattattc
ctcaccacaa ctacaatgca gctattaata agtacaacca tgacattgcc cttctggaac
tggacgaacc cttagtgtta aacagctacg ttacacctat ttgcattgct gacaaggaat
acacgaacc cttctcctg tttggatctg gctatgtaag tggctgggga agagtcttc
acaaaaggag atcagcttta gttctcagt accttagagt tccacttgtt gaccgagcca
catgtcttcg atctacaaag ttcaccatct ataacaacat gttctgtgct ggcttccatg
aaggagtag agattcatgt caaggagata gtgggggacc ccatgttact gaagtggaag
ggaccagttt cttactgga attattagct ggggtgaaaga gtgtgcaatg aaaggcaaat
atggaatata taccoaggtta tcccgggatg tcaactggat taaggaaaaa acaagctca
ctgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagctccgga actcctggga ggaccgtcag
tcttctctt ccccacaaa cccaaggaca cctcatgat cctccggacc cctgaggtca
catgctggt ggtggcagtg agccaagaa accctgaggt caagttcaac tggtaactgg
acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcgga ggagcagta acagcacgt
accgtgtggt cagcgtctc accgtctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca
agtcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaacctc tccaagcca
aagggcagcc cggagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccggat gagctgacca
agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggctteta tcccagcagc atcgccgtg
agtgggagag caatgggcag cgggagaaca actacaagac cagcctccc gtgtggact
ccgacggctc cttctctc t tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg
ggaaactgct ctcatgctc gtgatgcat aggtctgca caaccactac acgcagaaga
gcctctccct gtctcgggtt aaacgggcgc gccggagcgg tggcggcgga tcaggtggg
gtggatcagg cgggtggaggt tccggtggcg ggggatccc cggcggcgcc gacaaaactc
acacatgccc accgtgccc gaecgggaa tectgggccc accgteagtc tctctcttc
ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtg
tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggag
tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaaca cagcacgtac cgtgtggtca
gcgtctcacc cgtcctgca caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct
ccaacaaag cctcccagcc cccatcagaga aaacctctc caaagccaaa ggcagcccc
gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca
gcctgacctg cctggtcaaa ggtctctatc ccagcgacat cgcctggag tgggagagca
atgggcagcc ggaagaacct tacaagacca cgctcccgt gttggactcc gacggctct
tcttctctc cagaagaatc accgtggaca agagcaggtg gcagcaggg aactctctt
catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctcctgt
ctcgggtaa atga
    
```

5

Secuencia de aminoácidos de FIX-044. La secuencia señal se muestra en subrayado punteado, el propéptido tiene doble subrayado y el enlazador con sitios de procesamiento por proproteína convertasa se muestra en negrita

MORVNMIMAF..SPGLITICLL..GYLLSAECTV..FLDHENANKI..LNRPKRYNSG..KLEEFVQGNL
 ERECMEEKCS..FEEAREVFEN..TERTTEFWKQ..YVDGDQCESN..PCLNGGGSCKD..DINSYECWCP
 FGFEGKNCCEL..DVTCNIKNGR..CEQFCKNSAD..NKVVCSCTEG..YRLAENQKSC..EPAVFPFCGR
 VSVSQTSKLT..RAETVFPDVD..YVNSTEAEI..LDNITQSTQS..FNDFTRVVGG..EDAKPGQFPW
 QVVLNGKVIDA..FCGGSIVNEK..WIVTAAHCVE..TGVKITVVAG..EHNIEETEHT..EQKRNVIIRI
 PHHNYNAAIN..KYNHDIALLE..LDEPLVLSY..VTPICIADE..YTNIFLKFSG..GYVSGWGRVF
 HKGRSALVLQ..YLRVPLVDRA..TCLRSTKFTI..YNNMFCAGFH..EGGRDSCQGD..SGGPHVTEVE
 GTSFLTGIIS..WGEECAMKKG..YGIYTKVSRV..VNWIKEKTKL..TDKHTTCPPC..PAPELLGGPS
 VFLFPPKPKD..TLMISRTPEV..TCVVVDVSHV..DPEVKFNWYV..DGVEVHNAKT..KPREEQYNST
 YRVVSVLTVL..HQDWLNGKEY..KCKVSNKALP..APIEKTISKA..KGQPREPQVY..TLPPSRDEL
 KNQVSLTCLV..KGFYPSDIAV..EWESNGQPEN..NYKTTTPVLD..SDGSFFLYSK..LTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMH..EALHNNHYTQK..SLSLSPGKRR..RRSGGGGSGG..GGSGGGGSGG..GGRRRRDKT
 HTCPCCPAPE..LLGGPSVFLF..PPKPKDTLMI..SRTPEVTCVV..VDVSHEDPEV..KFNWYVDGVE
 VHNAKIKPRE..EQYNSTYRVV..SVLTVLHQDW..LNGKEYKCKV..SNKALPAPIE..KTISKAKGQP
 REPQVYTLPP..SRDELTKNQV..SLTCLVKGFY..PSDIAVEWES..NGQFENNYKT..TPPVLDSDGS
 FFLYSLKLTVD..KSRWQQGNVF..SCSVMHEALH..NHYTQKLSL..SPGK*

Secuencia de ADN de Genscript-FIX-044

tccggaactc ctgggaggac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaaccca aggacacct
 catgatctcc cggaccctct aggtcacatg cgtggtgggt gacgtgagcc acgaagacc
 tgaggtcaag ttcaactggg acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc
 gccggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tccctgacca
 ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc
 catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct
 gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg
 cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta
 caagaccacg cctcccgtgt tggactccga cggtcctctc ttcctctaca gcaagctcac
 cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtctctca tgctccgtga tgcattgaggc
 tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctcccgtctc ccgggtaaac ggcgcgcgg
 gagcgggtgc ggcggatcag gtgggggtgg atcaggcggg ggaggttccg gtggcggggg
 atcccgcggg cggcgcgaca aaactcacac atgcccaccc tgcccacgac cggaaactcct
 gggcggaccg

5

Secuencia de ADN de Genscript-FVII-027-1

gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaacg gcgcccggg agcgggtggc gcggtatcag
 tgggggtgga tcaggcgggt gaggttccgg tggcggggga tccggcggtg gaggttccgg
 tgggggtgga tcaaggaga ggaggaagag ggcggaagt cagctggtgc agtctggagc
 tgaggtgaat aagcctgggg cctcagtgaa ggtctctgc aaggcttctg gatacacctt
 caccggctac tatatgcact ggtgcgaca ggcccctgga caaggcttg agtggatggg
 atggatcaac cctaacagtg gtggcacaaa ctatgcacag aagtttcagg gctgggtcac
 catgaccagg gacacgtcca tcagcaccgc ctacatggag ctgagcagge tgagatctga
 cgacacggcc gtgtattact gtgagagagg ccgtgctttg tataaccgga acgaccggtc
 ccccaactgg ttcgacctc ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct cagggagtg
 atccgcccac acccttaagc ttgaagaagg tgaattc

Secuencia de ADN de Genscript-FVII-026-2

gaattctcag aagcacgcgt acaggtgtg ctgactcagc cgccctcggg gtcagtggcc
 ccaggacaga cggccaggat tacctgtggg ggaaacaaca ttggaagtaa aagtgtgcag
 tggtagcagc agaagccagg ccaggcccct gtgctggtcg tctatgatga tagcgaccgg
 cctcagggga tccctgagcg attctctggc tccaactctg ggaacatggc caccctgacc
 atcagcaggg tgaagccgg ggatgaggcc gactattact gtcaggtgtg ggatagtagt
 agtgatcatg ttggtattcgg cggagggacc aagctgaccg tcctaggtca gcccaggct
 gcccctcgg tcaactctgt cccgcccgtc gcggccgctg gtggcgggtg ctcggcgga
 ggtgggtccg gtggcggcgg atcaggtggg ggtggatcag gcgggtgagg tccgggtggc
 gggggatcag acaaaactca cacatgcccc cccaaaaccc aaggacacc tcatgatctc
 ccgtcagtc tctcttccc ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg
 tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaagc gcgaggagga gcagtacaac
 agcacgtacc gtgtggctcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggaactggct gaatggcaag
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc
 aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc cccgcatgag
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg
 ttgactccg acggtcctct ctccctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg
 cagcagggga acgtctctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg
 caaaagacc tctcctctc tccqqttaa tqaqaattc

10 Secuencia de aminoácidos de FVIII con dominio B eliminado: El péptido señal está subrayado; el enlazador de 14 aminoácidos (que contiene el dominio B restante) entre la secuencia HC y LC tiene doble subrayado, con el sitio de fusión S743/Q1638 indicado en negra

1	<u>MQIELSTCFF</u>	<u>LCLLRFCFSA</u>	TRRYYLGA	VE	LSWDYMQSDL	GELPVDARFP
51	PRVPKSFFPN	TSVVYKKTFL	VEFTDHLFNI	AKPRPPWMGL	LGPTIQAEVY	
101	DTVVITLKNM	ASHPVSLHAV	GVSYWKASEG	AEYDDQTSQR	EKEDDKVFPG	
151	GSHTYVWQVL	KENGPMSADP	LCLTYSYLSH	VDLVKDLNSG	LIGALLVCRE	
201	GSLAKEKTQT	LHKFILLFAV	FDEGKSWHSE	TKNSLMQDRD	AASARAWPKM	
251	HTVNGYVNRS	LPGLIGCHRK	SVYWHVIGMG	TTPEVHSIFL	EGHTFLVRNH	
301	RQASLEISPI	TFLTAQTLML	DLGQFLLFCH	ISSHQHDGME	AYVKVDSCEP	
351	EPQLRMKNNE	EAEDYDDDLT	DSEMDVVRFD	DDNSPSFIQI	RSVAKKHPKT	
401	WVHYIAAEEE	DWDYAPLVLA	PDDRSYKSQY	LNNGPQRIGR	KYKKVRFMAY	
451	TDETFKTREA	IQHESGILGP	LLYGEVGDTL	LIIFKNQASR	PYNIYPHGIT	
501	DVRPLYSRRL	PKGVKHLKDF	PILPGEIFKY	KWTVTVEDGP	TKSDPRCLTR	
551	YSSSFVNMER	DLASGLIGPL	LICYKESVDQ	RGNQIMSDKR	NVILFSVFDE	
601	NRSWYL TENI	QRFLPNPAGV	QLEDPEFQAS	NIMHSINGYV	FDSLQLSVCL	
651	HEVAYWYILS	IGAQTDFLSV	FFSGYTFKHK	MVYEDTLTLF	PFSGETVFMMS	
701	MENPGLWLIG	CHNSDFRNRG	MTALLKVSSC	DKNTGDYED	SYEDISAYLL	
751	SKNNAIEPRS	<u>FSQNPVLRK</u>	<u>HQREITRRTL</u>	QSDQEEIDYD	DTISVEMKKE	
801	DFDIYDEDEN	QSRSFQKKT	RHYFIAAVER	LWDYGMSSSP	HVLRNRAQSG	
851	SVPQFKKVV	QEFDTGSFTQ	PLYRGELNEH	LGLLGPYIRA	EVEDNIMVTF	
901	RNQASRPYSF	YSSLISYEED	QRQGAEPKRN	FVKPNETKTY	FWKVQHHMAP	
951	TKDEFDCKAW	AYFSDVDLEK	DVHSGLIGPL	LVCHTNTLNP	AHGRQVTVQE	
1001	FALFFTIFDE	TKSWYFTENM	ERNCRAPCNI	QMEDPTFKEN	YRFHAINGYI	
1051	MDTLPGLVMA	QRFLPNPAGV	SMGSNENIHS	IHFSGHVFTV	RKKEEYKMAL	
1101	YNLYPGVFET	VELMPSKAGI	WRVECLIGEH	LHAGMSTLFL	VYSNKCQTPL	
1151	GMASGHIRDF	QITASGQYGO	WAPKLARLHY	SGSINAWSTK	EPFSWIKVDL	
1201	LAPMI IHGK	TQGARQKFSS	LYISQFIIMY	SLDGKKWQTY	RGNSTGTLMV	
1251	FFGNVDSSGI	KHNIFNPII	ARYIRLHPTH	YSIRSTLRME	LMGCDLNSCS	
1301	MPLGMESKAI	SDAQITASSY	FTNMFATWSP	SKARLHLQGR	SNAWRPQVNN	
1351	PKEWLQVDFQ	KTMKVTGVT	QGVKSLLTSM	YVKEFLISSS	QDGHQWTLFF	
1401	QNGKVKVDFQ	NQDSFTPVVN	SLDPPLLTRY	LRIHPQSVWH	QIALRMEVLG	
1451	CEAQDLY					

Secuencia de aminoácidos de FVIII de longitud completa: Péptido señal subrayado

1	<u>MQIELSTCFF</u>	<u>LCLLRFCFSA</u>	TRRYYLGA	VE	LSWDYMQSDL	GELPVDARFP
51	PRVPKSFFPN	TSVVYKKTFL	VEFTDHLFNI	AKPRPPWMGL	LGPTIQAEVY	
101	DTVVITLKNM	ASHPVSLHAV	GVSYWKASEG	AEYDDQTSQR	EKEDDKVFPG	
151	GSHTYVWQVL	KENGPMSADP	LCLTYSYLSH	VDLVKDLNSG	LIGALLVCRE	
201	GSLAKEKTQT	LHKFILLFAV	FDEGKSWHSE	TKNSLMQDRD	AASARAWPKM	
251	HTVNGYVNRS	LPGLIGCHRK	SVYWHVIGMG	TTPEVHSIFL	EGHTFLVRNH	
301	RQASLEISPI	TFLTAQTLML	DLGQFLLFCH	ISSHQHDGME	AYVKVDSCEP	
351	EPQLRMKNNE	EAEDYDDDLT	DSEMDVVRFD	DDNSPSFIQI	RSVAKKHPKT	
401	WVHYIAAEEE	DWDYAPLVLA	PDDRSYKSQY	LNNGPQRIGR	KYKKVRFMAY	
451	TDETFKTREA	IQHESGILGP	LLYGEVGDTL	LIIFKNQASR	PYNIYPHGIT	
501	DVRPLYSRRL	PKGVKHLKDF	PILPGEIFKY	KWTVTVEDGP	TKSDPRCLTR	
551	YSSSFVNMER	DLASGLIGPL	LICYKESVDQ	RGNQIMSDKR	NVILFSVFDE	
601	NRSWYL TENI	QRFLPNPAGV	QLEDPEFQAS	NIMHSINGYV	FDSLQLSVCL	
651	HEVAYWYILS	IGAQTDFLSV	FFSGYTFKHK	MVYEDTLTLF	PFSGETVFMMS	
701	MENPGLWLIG	CHNSDFRNRG	MTALLKVSSC	DKNTGDYED	SYEDISAYLL	
751	SKNNAIEPRS	<u>FSQNSRHPST</u>	<u>RQKQFNATTI</u>	PENDIEKTD	WFAHRTMPK	
801	IQNVSSDDL	MLLRQSPTPH	GLSLSDLQEA	KYETFSDDPS	PGAIDSNNSL	
851	SEMTHFRPQL	HHSYDMVFTP	ESGLQLRLNE	KLGTAAATEL	KKLDFKVSST	
901	SNNLISTIPS	DNLAAGTDNT	SSLGPPSMPV	HYDSQLDTTL	FGKKSPLTE	
951	SGGPLSLSEE	NNSDKLLESG	LMNSQESSWG	KNVSSTESGR	LFKKGKRAHGP	
1001	ALLTKDNALF	KVISLILKTN	KTSNNSATNR	KTHIDGPSLL	IENSPSVWQN	
1051	ILESDETFKK	VIPLIHDRML	MDKNATALRL	NHMSNKTSS	KNMEMVQKK	
1101	EGPIPPDAQN	PDMSFFKMLF	LPESARWIQR	THGKNSLNSG	QGSPSPKQLVS	
1151	LGPEKSVGGQ	NLSSEKNKVV	VKGGEFTKDV	GLKEMVFPSS	RNLFLTNLDN	
1201	LHENNTHNQE	KKIQEEIEKK	ETLIQENVVL	PQIHTVTGTK	NFMKNLFLLS	
1251	TRQNVESYD	GAYAPVLQDF	RSLNDSTNRT	KKHTAHFSKK	GEEENLEGLG	
1301	NQTKQIVEKY	ACTTRISPNT	SQQNFVTQRS	KRALKQFRLP	LEETELEKRI	
1351	IVDDTSTQWS	KNMKHLTPST	LTQIDYNEKE	KGAITQSPLS	DCLTRSHSIP	
1401	QANRSPLPFA	KVSSFPSTIRP	IYLRVLFQD	NSSHLPAAASY	RKKDSGVQES	
1451	SHFLQGAKNM	NLSLAILTLE	MTGDQREVGS	LGTSATNSVT	YKKVENTVLP	
1501	KPDLPKTSGK	VELLPKVHIY	QKDLFPPTETS	NGSPGHLDLV	EGSLLQGTGEG	
1551	AIKWNEANRP	GKVPFLRVAT	ESSAKTPSKL	LDPLAWDNHY	GTQIPKEEWK	
1601	SQEKSPKTA	FKKKTILSL	NACESNHAIA	AINEGQNKPE	IEVTWAKQGR	
1651	TERLCSQNP	VLKRHQREIT	RTTLQSDQEE	IDYDDTISVE	MKKEDFDIYD	
1701	EDENQSPRSF	QKKTQHYFIA	AVERLWDYGM	SSSPHVLNRN	AQSGSVFPQFK	
1751	KVVFQEFTDG	SFTQPLYRGE	LNEHLGLLGP	YIRAEVEDNI	MVIFRNQASR	
1801	PYSFYSSLIS	YEEDQRQGA	PRKNFVKPNE	TKTYFWKVQH	HMAPTKDEFD	
1851	CKAWYFSDV	DLEKDVHSG	IGPLLVCHTN	TLNPAHGRQV	TVQEFALFFT	
1901	IFDETKSWYF	TENMERNCR	PCNIQMEDPT	FKENYRFHAI	NGYIMDTLPG	
1951	LVMADQQRIR	WYLLSMGSNE	NIHSIHFSGH	VFTVRKKEEY	KMALYNLYPG	
2001	VFETVEMLPS	KAGIWRVECL	IGEHLHAGMS	TLFLVYSNKC	QTPLGMASGH	
2051	IRDFQITASG	YQGWAPKLA	RLHYSGSINA	WSTKEPFSWI	KVDLLAPMII	
2101	HGIKTQGARQ	KFSSLYISQF	IIMYSLDGKK	WQTYRGNSTG	TLMVFFGNVD	
2151	SSGIKHNIFN	PPIIARIYIRL	HPTHYSIRST	LRMELMGCDL	NSCSMPLGME	
2201	SKAISDAQIT	ASSYFTNMFA	TWSPSKARLH	LQGRSNAWRP	QVNNPKEWLQ	
2251	VDFQKTMKVT	GVTTQGVKSL	LTSMYVKEFL	ISSSQDGHQW	TLFFQNGKVK	
2301	VFQGNQDSFT	PVVNSLDPPL	LTRYLRTHPQ	SVWHQIALRM	EVLGCEAQDL	
2351	Y					

Secuencia de aminoácidos de FIX. La secuencia señal se muestra en subrayado punteado, el propéptido tiene doble subrayado

MQRVNMIMAE...SPGLITICLL...GYLISAEQTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG KLEEFVQGNL
 ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN PCLNGGCKD DINSYECWCP
 FGFEGKNCEL DVCNICNKR CEQFCKNSAD NKVVCSTEG YRLAENQKSC EPAVFPFCGR
 VSVSQTSKLT RAETVFPDVD YVNSTEAEIT LDNITQSTQS FNDFTRVVG EDAKPGQFPW
 QVVLNGKVDA FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVAVG EHNIEETEHT EQKRNVIIRLI
 PHHNYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIAKKE YTNIFLKFGS GYVSGWGRVF
 HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE
 GTSFLTGIIIS WGECEAMKKG YGIYTKVSRY VNNWIKETKL T

Secuencia de ADN de FIX

5

atgcagcgcg tgaacatgat catggcgaaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta
 ggatatctac tcagtgtctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc acaaaatt
 ctgaatcggc caaagaggtta taattcaggt aaattggaag agtttggtca agggaatcta
 gagagagaa gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag caccgagaagt tttgaaaac
 actgaaaaga caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat
 ccatgtttta atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt ccatgaatg ttggtgtccc
 tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacatta gaatggcaga
 tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgcctgat aacaaggctg tttgctcctg tactgagggg
 tatcgacttg cagaaaacca gaagtctctg gaaccagcag tgcatttcc atgtggaaga
 gtttctgttt cacaaactc taagctcacc cgtgctgaga ctgttttcc tgatgtggac
 tatgtaaaat tctactgaagc tgaaccatt ttggataaca tcaactcaa caccaatca
 tttaatgact tcaactcgggt tgttgggtgga gaagatgcca aaccagggtca attccttgg
 caggttgatt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaa
 tggattgtaa ctgctgcccaga actggttgtaa aaattacagt tgcgcaggt tgccaggt
 gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tccaattatt
 cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc cctctgtgaa
 ctggacgaac ccttagtgc aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa
 tacacgaaca tcttctctca atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc
 cacaaagggg gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccactgt tgaccgagcc
 acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat
 gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa
 gggaccaggt tcttaactgg aattattagc tggggtgaa agtgtgcaat gaaaggcaaa
 tatggaatat ataccaaggt atcccggat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaagctc
 acttga

Secuencia de aminoácidos de FX. La secuencia señal se muestra en subrayado punteado, el propéptido tiene doble subrayado

MGRPLHLVLL...SASLAGLILL...GESLEIREQ ANNILARVTR ANSFLEEMKK GHLERECMEE
 TCSYEEAREV FEDSDKINEF WNKYKDGDCQ ETSPCQNQ GK CKDGLGEYTC ICLEGFEGKN
 CELFTRRLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVC S CARGYTLADN GKACIPTGYP CGKQTLERR
 KRSVAQATSS SGEAPDSITW KPYDAADLDP TENPFDLDF NQTQPERGDN NLTRIVGGQE
 CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE
 AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVP ACLPERDWAE STLMTQKTGI
 VSGFGRTHEK GRQSTRKLML EVPYVDRNSC KLSSSFITQ NMFCAGYDTK QEDACQGD SG
 GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGYG IYTKVTAFLK WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE
 VITSSPLK

10

Secuencia de ADN de FX

atggggcgcc cactgcacct cgtcctgctc agtgcctccc tggctggcct cctgctgctc
 ggggaaagtc tgttcatccg cagggagcag gccacaaca tccctggcag ggtcacgagg
 gccaatctct ttcttgaaga gatgaagaaa ggacacctcg aaagagagtg catggaagag
 acctgctcat acgaagaggc ccgagggctc tttgaggaca ggcacaagac gaatgaattc
 tggaaataat acaaagatgg cgaccagtgat gagaccagtc cttgccagaa ccaggggcaaa
 tgtaaaagac gcctcgggga atacacctgc acctgtttag aaggattcga agggcaaaaac
 tgtgaattat tcacacggaa gctctgcagc ctggacaacg gggactgtga ccagtctgctc
 caccgaggaac agaactctgt ggtgtgctcc tggcctcggc ggtacacctt ggctgacaac
 ggcaaggcct gcattcccac agggccttac cctctgagg aacagacctt ggaacgcagg
 aagaggtcag tggcccaggc caccagcagc agcggggagg cccctgacag catcacatgg
 aagccatatg atgcagccga cctggacccc accgagaacc ccttcgacct gcttgacttc
 aaccagacgc agcctgagag gggcgacaac aacctcaca ggatcgtggg agggcaggaa
 tggcaaggac gggagtgctc ctggcaggcc ctgctcatca atgaggaaaa cgagggttcc
 tgtggtggaa ccattctgag cgagttctac atcctaaccg cagcccactg tctctaccaa
 gccaaagatg tcaaggtgag ggtaggggac cggaacacgg agcaggagga gggcggtgag
 ggggtgacag aggtggaggt ggtcatcaag cacaaccggt tcacaagga gacctatgac
 ttcgacatcg ccgtgctccg gctcaagacc cccatcacct tccgcatgaa cgtggcgctc
 gcctgcctcc ccgagcgtga ctgggcccag tccacgctga tgaccgagaa gacggggatt
 gtgagcggct tcggggcgcac ccacgagaag ggccggcagt ccaccaggct caagatgctg
 gagggtccct acgtggaccg caacagctgc aagctgtcca gcagcttcat catcaccag
 aacatgttct gtgcccgtta cgacaccaag caggaggatg cctgccaggg ggacagcggg
 ggcccgcacg tcaccgcgtt caaggacacc tacttctgta caggcatcgt cagctgggga
 ggggctgtg cccgtaaagg gaagtacggg atctacacca aggtcaccgc ctctctcaag
 tggatcgaca ggtccatgaa aaccaggggc ttgcccagg ccaagagcca tggcccggag
 gtcataacgt cctctccatt aaagtga

Secuencia de ADN para pSYN-FIX-053

```

1 ATGCAGCGCG TGAACATGAT CATGGCAGAA TCACCAGGCC TCATCACCAT CTGCCTTTTA
61 GGATATCTAC TCAGTGTGTA ATGTACAGGT TTGTTTCCTT TTTTAAAAATA CATTGAGTAT
121 GCTTGCCTTT TAGATATAGA AATATCTGAT GCTGTCTTCT TCACATAAAT TTGATTACAT
181 GATTTGACAG CAATATTGAA GAGTCTAACA GCCAGCACGC AGGTTGGTAA GTACTGTGGG
241 AACATCACAG ATTTTGGCTC CATGCCCTAA AGAGAAATTG GCTTTCAGAT TATTGGATT
301 AAAAACAAG ACITTTCTTA GAGATGTAAT ATTTTCATGA TGTTCCTTT TTTGCTAAAA
361 CTAAGAAGAT ATCTTTTAC ATTTTCAGTT TTCTTGATCA TGAACACGCC AACAAAAATC
421 TGAATCGGCC AAAGAGGTAT AATTCAGGTA AATTGGAAGA GTTTGTTCAA GGGAACTAG
481 AGAGAGAATG TATGGAAGAA AAGTGTAGTT TTGAAGAAGC ACGAGAAGTT TTTGAAAAACA
541 CTGAAAGAAC AACTGAATTT TGGAAAGCAGT ATGTTGATGG AGATCAGTGT GAGTCCAATC
601 CATGTTTAAA TGGCGGCAGT TGCAAGGATG ACATTAATTC CTATGAATGT TGGTGTCCCT
661 TTGGATTTGA AGGAAAGAAC TGTGAATTAG ATGTAACATG TAACATTAAG AATGGCAGAT
721 GCGAGCAGTT TTGTAATAAT AGTGTGATA ACAAGGTGGT TTGCTCCTGT ACTGAGGGAT
781 ATCGACTTGC AGAAAACCAG AAGTCTGTG AACCAGCAGT GCCATTTCCA TGTGGAAGAG
841 TTCTGTGTTT ACAAACTTCT AAGCTCACCC GTGCTGAGAC TGTTCCTTCT GATGTGGACT
901 ATGTAATTC TACTGAAGCT GAAACCATTT TGGATAACAT CACTCAAAGC ACCCAATCAT
961 TTAATGACTT CACTCGGGTT GTTGGTGGAG AAGATGCCAA ACCAGGTCAA TTCCTTGGC
1021 AGGTTGTTTT GAATGGTAAA GTTGTATGAT TCTGTGGAGG CTCTATCGTT AATGAAAAAT
1081 GGATTGTAAC TGCTGCCAC TGTGTTGAAA CTGGTGTAA AATTACAGTT GTCGCAGGTG
1141 AACATAATAT TGAGGAGACA GAACATACAG AGCAAAAGCG AAATGTGATT CGAATTATTC
1201 CTCACCCAAA CTACATGCA GCTATTAATA AGTACAACCA TGACATTGCC CTCTCGGAAC
1261 TGGACGAAAC CTTAGTGCTA AACAGTACG TTACACCTAT TTGCATTGCT GACAAGGAAT
1321 ACACGAACAT CTTCCTCAA TTTGATCTG GCTATGTAAG TGGCTGGGA AGACTCTTCC
1381 ACAAAGGGAG ATCAGCTTTA GTTCTCAGT ACCTTAGAGT TCCACTTGT GACCGAGCCA
1441 CATGTCTTCG ATCTACAAAG TTCACCATCT ATAACAACAT TTCTGTGCT GGCCTCCATG
1501 AAGGAGGTAG AGATTCATGT CAAGGAGATA GTGGGGGACC CCATGTTACT GAAGTGGAAAG
1561 GGACCAAGTT CTTAAGTGA ATTATTAGCT GGGGTGAAGA GTGTGCAATG AAGGGCAAT
1621 ATGGAATATA TACCAGGTG TCCCGGTATG TCAACTGGAT TAAGGAAAAA ACAAGGCTCA
1681 CTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTCCC CAGCTCCGGA ACTCCTGGGA GGACCGTCAG
1741 TCTTCTCTTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
1801 CATGGGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
1861 ACGCGGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
1921 ACCGTGTGGT CAGCGTCTC ACCGTCTGTC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
1981 AGTGCAGGTG CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAGGCCA
2041 AAGGGCAGCC CCGAAGACCA CAGGTGTACA CCTGCCCC ATCCCGGGAT GAGTGTACCA
2101 AGAACCAGT CAGCCTGACC TGCTGTGTC AAGGCTTCTA TCCCAGGCAC ATCGCCGTGG
2161 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CAGCCCTCCC GTGTGGACT
2221 CCGACGGCTC TTTCTTCTC TACAGCAAGC TCACCGTCTGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
2281 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
2341 GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAACGGCGCC GCGGAGCGG TGGCGGGGGA TCAGGTGGGG
2401 GTGGATCAGG CGGTGGAGT TCCGTTGGG GGGGATCCAG GAAGAGGAGG AAGAGGGACA
2461 AAACCTCACAC ATGCCACCG TGCCACGAC CCGAACTCT GGGCGGACCG TCAGTCTTCC
2521 TCTTCCCCCC AAAACCCAAG GACACCCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGGC
2581 TGGTGGTGA CGTGAGCCAC GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGTTAC GTGGACGGCG
2641 TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAGGCCGC GGGAGGAGCA GTACAACAGC ACGTACCGTG
2701 TGGTCAAGCT CCTCACCGT CTGCACCAG ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA
2761 AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC CCAGCCCCCA TCGAGAAAAA CATCTCCAAA GCCAAAAGGGC
2821 AGCCCGGAGA ACCACAGGTG TACACCCCTGC CCCCATCCCG GGATGAGCTG ACCAAGAACC
2881 AGGTTCAGCT GACCTGCTG GTCAAAGGCT TCTATCCAG CGACATCGCC GTGGAGTGGG
2941 AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCAGGCC TCCGTGTTG GACTCCGAGC
3001 GCTCCTCTTT CCTCTACAG AAGCTCACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG GAGGGGAAAG
3061 TCTTCTCATG CTCCGTATG CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACCGAG AAGAGCCTCT
3121 CCCTGTCTCC GGGTAAATGA

```

5 Secuencia de aminoácidos de FIX-053. La secuencia señal se muestra en subrayado punteado, el propéptido tiene doble subrayado y el enlazador con sitios de procesamiento por proproteína convertasa se muestra en negrita

```

1 MORVNMIMAE..SPGLITICLL..GYLLSAECTV..FLDHENANKI..LNRPKRYNSG KLEEFVQGNL
61 ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN PCLNGGSKCD DINSYECWCP
121 FGFEGKNCLE DVTGNIKNGR CEQFCNKNSAD NKVVCSTEG YRLAENQKSC EPAPVFPFCGR
181 VSVSQTSKLT RAETVFPDVD YVNSTEAETI LDNITQSTQS FNDFTRVVG EDAKPGQFPW
241 QVVLNKGKVA FCGGSIVNEK WIVTAAHCEV TGVKILVVG EHNIEETEHT EQKRNVIRII
301 PHHNYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VPICIADKE YTNIFLKFSG GYVSGWGRVF
361 HKGRSALVLC YLRVFLVDR TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE
421 GTSFLTGLIS WGEBCAMRKG YGIYTKVSRV VNWIKETKL TDKTHTCPPC PAPELLGGPS
481 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH EPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
541 YRVVSVLTVL HQDWLNGREY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL
601 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKITPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
661 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSPSPGRRR RRSGGGGSGG GGSGGGGSGG GGSRKRRKRD
721 KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
781 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
841 QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGFENNY KTTPPVLDS
901 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK*

```

Secuencia de ADN para pSYN-FVII-064

1 ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GTCCTCTGCG CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
 61 GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GGCCTCCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
 121 GCGTTCCCTGG AGGAGCTGCG GCCCGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
 181 TCCTTCCAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACCGGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
 241 TCTTACAGTG ATGGGGAGCA GTGTGCCICA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCGCAAG
 301 GACCAGCTCC AGTCTATAT CTGCTTCTGC CTCCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
 361 ACGCACAAAG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
 421 AGTGACCACA CGGGCAACAA GCGCTCCTGT CCGGTGCCAG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
 481 GACGGGGTGT CCGTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATCTAGAA
 541 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA ATTGTGGGGG GCAAGGTGTG CCCCAGGGG
 601 GAGTGTCCAT GGCAGTTCCT GTTGTGGTG AATGGAGCTC AGTTGTGTGG GGGGACCCCTG
 661 ATCAACACCA TCTGGTGGT CTTCCGCGGCC CACTGTTTCG AAAAAATCAA GAACTGGAGG
 721 AACCTGATCG CCGTGTGGG CGAGCACGAC CTCAGCGAGC ACGACGGGGA TGAGCAGAGC
 781 CCGCGGGTGG CCGAGGTCAT CATCCCGAGC ACGTACGTCC CCGGCACCAC CAACCCAGAC
 841 ATCCGCGTGC TCCGCTGCA CCGCCCGTGC GTCTCACTG ACCATGTGGT GCCCCTCTGC
 901 CTGCCCGAAC GGAGCTTCTC TGAGAGGACG CTGGCCTTCG TGCCTTCTC ATTGGTCAGC
 961 GGCTGGGGCC AGCTGTGGA CCGTGGCGCC ACGGCCCTGG AGTCAATGGT CCTCAACGTG
 1021 CCCCCTGTA TGACCCAGGA CTGCCCTGCA CAGTCAAGGA AGGTGGGAGA CTCCCAAAAT
 1081 ATCAGGAGT ACATGTTCTG TGCCGGCTAC TCGGATGGCA GCAAGGACTC CTGCAAGGGG
 1141 GACAGTGGAG GCCCACATGC CACCCACTAC CCGGGCACGT GGTACCTGAC GGGCATCGT
 1201 AGCTGGGGCC AGGCTGCGC AACCCGTGGG CACTTTGGGG TGTACACCAG GGCTCCCGAG
 1261 TACATCGAGT GGCTGCAAAA GCTCATGCGC TCAGAGCCAC GCCCAGGAGT CCTCCTGGCA
 1321 GCCCCATTC CCGTGTGGG TGCTCCGGC GGAGGTGGGT CCGGTGGCGG CCGATCAGGT
 1381 GGGGTGGAT CAGGCGGTGG AGGTTCCGGT GCGGGGGAT CCGACAAAAC TCACACATGC
 1441 CCACCGTGCC CAGCTCCGGA ACTCCTGGGA GGACCGTICAG TCTTCTCTT CCCCCAAAA
 1501 CCCAAGGACA CCTCTACAT CACCCGGGAG CCTGAGGTCA CATCGGTGGT GGTGGACGTG
 1561 AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGCGCTGGA GGTGCATAAT
 1621 GCCAAGACAA ACCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCCTCCTC
 1681 ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
 1741 GCCCTCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
 1801 CAGGTGTACA CCTTCCGCC ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAAGT CAGCCTGACC
 1861 TGCCCTGGTA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC ATCCCGGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
 1921 CCGGAGAACA ACTACAAGAC CAGCCTCCC GTGTGGACT CCGACGGCTC CTTCTCTCTC
 1981 TACAGCAAGC TCACCGTCA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCAATGCTC
 2041 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
 2101 AAACGGCGCC GCGGAGCCG TGCCCGCGGA TCAGGTGGGG GTGGATCAGG CCGTGGAGGT
 2161 TCCGTGGCG GGGGATCCAG GAAGAGGAGG AAGAGGGACA AAACCTCACAC ATGCCACC
 2221 TGCCAGCCT CCGAACTCCT GGGCGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCCAAG
 2281 GACACCCCT CATACACCCG GGAGCCTGAG GTACATGCG TGGTGGTGGG CCGTGGCCAC
 2341 GAAGACCCTG AGGTAAGTT CAACTGGTAC GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG
 2401 ACAAGCCCG GGGAGGAGCA GTACAACAGC ACGTACCGTG TGGTACCGT CCTCACCGTC
 2461 CTGCACCAGG ACTGGCTGAA TGCAAGGAG TACAAGTGA AGTCTCCAA CAAAGCCCTC
 2521 CCAGCCCCCA TCGAGAAAA CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA ACCACAGGTG
 2581 TACACCCCTG CCCCATCCG GGATGAGCTG ACCAAGAACC AGGTACGCT GACCTGCGCT
 2641 GTCAAAGGCT TCTATCCAG CGACATCGCC GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG
 2701 AACAACTACA AGACCAGCC TCCCGTGTG GACTCCGAGC GCTCCTCTT CCTCTACAGC
 2761 AAGCTCACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAAAC TCTTCTCATG CTCCGTGATG
 2821 CATGAGGCTC TGCAACAACA CTACACGCA AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC GGGTAAATGA

5 Secuencia de aminoácidos de FVII-064. La secuencia señal se muestra en subrayado punteado, el propéptido tiene doble subrayado, el enlazador que conecta FVII a Fc está subrayado y el enlazador con sitios de procesamiento por propeptina convertasa se muestra en **negrita**

1 MVSQALRLLC...LLGLGQGLIA AVFVIOEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 61 SFEEAREIFK DAERTKLEFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 121 THKDDQLICV NENGGCEQYC SDHTGTRKRC RCHEGYSLLA DGVSCPTPVE YPCGKIPILE
 181 KRNASKPQGR IVGKVCVCPKG ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIIVVVSAA HCFDKIKNWR
 241 NLI AVLGEHD LSEHDGDEQS RRVAQVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLTDHVVPLC
 301 LPERTFSERT LAFVRFSLVS GWGQLDRGA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ QSRKVGDSFN
 361 ITEYMFCAGY SDGSKDCKG DSGGFHATHY RGTWYLTGIV SWGQGCATVG HFGVYTRV9Q
 421 YIEWLQKLMR SEPFRGVLLR APFPGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSDKTHTC
 481 PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLYITRE PEVTCVVDV SHEDPEVKFN WVVDGVEVHN
 541 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 601 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTIPT VLDSDGSFFL
 661 YSKLTVDKSR WQGNVFSVCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG **KRRRRSGGGG** **SGGGSGGGG**
 721 **SGGGSRKRRR** **KRDKTHTCPP** CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK DTYITREPE VTCVVDVSH
 781 EDPEVKFNWY VDGVEVHNK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL
 841 PAPIEKTIISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
 901 NNYKTIPTFVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSVCSVM HEALTHHYTQ KSLSLSPGK*

Secuencia de ADN para pSYN-FVIII-049

1 ATGCAAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGAATCTG CTTTAGTGCC
 61 ACCAGAAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCAATGGG ACTATATGCA AAGTGTCTC
 121 GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCCT CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTC AAC
 181 ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTGTGT GTAGAATTC ACGATCACCT TTTCAACATC
 241 GCTAAGCCAA GGCCACCCTG SATGGGCTCG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
 301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCACTCT TCATGCTGTT
 361 GGTGTATCCT ACTGGAAGGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG
 421 GAGAAAGAAAG ATGATAAAGT CTTCCTGGT GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG
 481 AAAGAGAAATG GTCCAAATGGC CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT
 541 GTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
 601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT TTTTGCTGTA
 661 TTTGATGAAG GGAAGAAATG GCACCTAGAA ACAAAAGAACT CCTTGATGCA GGTAGGGAT
 721 GCTGCATCTG CTCGGGCCCTG GCTAAAATG CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT
 781 CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAAATGGC
 841 ACCACTCCTG AAGTGCACCT AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAAACCAT
 901 CGCCAGGCGT CCTTGGCAAT CTGCGCAATA ACTTTCCCTTA CTGCTCAAAAC ACTCTTGATG
 961 GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCTAT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA
 1021 GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AATAATGAA
 1081 GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGTAT
 1141 GATGACAACCT CTCCCTTCCCT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAAGCA TCCTAAAATC
 1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCTCGCC
 1261 CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCTCAGCG GATTTGGTGT
 1321 AAGTACAAAA AAGTCCGATG TATGGCATA CACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT
 1381 ATTCAGCATG AATCAGGAAT CTTGGGACCT TTACTTTTAT GGGAAAGTTG AGACACACTG
 1441 TTGATTATAT TTAAGAAATC AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCCTCA CGGAATCACT
 1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAAAGGTG TAAAACATTT GAAGGATTTT
 1561 CCAATTTCTG CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG TGACTGTAGA AGATGGGCCA
 1621 ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCCT TATTACTCTA GTTTTCGTTAA TATGGAGAGA
 1681 GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAAGAACT TGTAGATCAA
 1741 AGAGGAAACC AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCTATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
 1801 AACCAGAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCAATCC AGCTGGAGTG
 1861 CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT
 1921 TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTGTT CATGAGGTTG CATACTGGTA CATTCTAAGC
 1981 ATTGGAGCAG AGACTGACTT CTTTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA
 2041 ATGGTCTATG AAGACAACAT CACCCTATTC CCATTTCTCAG GAGAAAAGTGT CTTTATGTCG
 2101 ATGGAAAACC CAGGTCATAG GATTTCTGGG TGCCACAACCT CAGACTTTCC GAACAGAGGC
 2161 ATGACCCGCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC
 2221 AGTTATGAAG ATATTTCCAG ATACTTGCTG AGTAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC
 2281 TTCTCTCAA ACCCCAGT CTTGAAACGC CATCAACGGG AAATAACTCG TACTACTCTT
 2341 CAGTCAGATC AAGAGGAAAT TGACTATGAT GATACCATAT CAGTTGAAAT GAGAAAGGAA
 2401 GATTTGACA TTTATGATGA GGATGAAAA CAGAGCCCCC GCAGCTTTCA AAAGAAAACA
 2461 CGACACTATT TTATTGCTGC AGTGGAGAGG CTCTGGGATT ATGGGATGAG TAGCTCCCA
 2521 CATGTTCTAA GAAACAGGGC TCAGAGTGGC AGTGTCCCTC AGTTCAAGAA AGTTGTTTTT
 2581 CAGGAATTTA CTGATGGCTC CTTTACTCAG CCCTTATACC GTGGAGAACT AAATGAACAT
 2641 TTGGGACTCC TGGGGCCATA TATAAGAGCA GAAGTTGAAG ATAATATCAT GGTAACTTTC
 2701 AGAAATCAGG CCTCTGCTAT CTATTCTTTC TATTTCTAGCC TTATTTCTTA TGAGGAAGAT
 2761 CAGAGGCAAG GAGCAGAACC TAGAAAAAAC TTTGTCAAGC CTAATGAAC CAAAACCTTAC
 2821 TTTTGGAAAG TGCAACATCA TATGGCACCC ACTAAAGATG AGTTTACTG CAAAGCCCTG
 2881 GCTTATTTCT CTGATGTTGA CCTGGAAAAA GATGTGCACT CAGGCCCTGAT TGGACCCCTT
 2941 CTGGTCTGCC ACACATACAC ACTGAACCCCT GCTCATGGGA GACAAGTGAC AGTACAGGAA
 3001 TTTGCTCTGT TTTTACCAT CTTTGTGAG ACCAAAAGCT GTTACTTCC TGRAAAATATG
 3061 GAAAGAAACT GCAGGGCTCC CTGCAATATC CAGATGGAAG ATCCCCTTT TAAAGAGAA
 3121 TATCCCTTCC ATGCAATCAA TGCTACATA ATGGATACAC TACCTGGCTT AGTAATGGCT
 3181 CAGGATCAA GGATTCGATG GTATCTGCTC AGCATGGGCA CCAATGAAAA CATCCATTCT
 3241 ATTCATTTCA GTGGACATGT GTTCACTGTA CGAAAAAAG AGGAGTATAA AATGGCACTG
 3301 TACAATCTCT ATCCAGGTGT TTTTGAACA GTGGAAATGT TACCATCCAA AGCTGGAAT
 3361 TGGCGGGTGG AATGCCTTAT TGGCGAGCAT CTACATGCTG GGATGAGCAC ACTTTTCTG
 3421 GTGTACAGCA ATAAGTGTCA GACTCCCTCG GGAATGGCTT CTGGACACAT TAGAGATTTT
 3481 CAGATTACAG CTTCAGGACA ATATGGACAG TGGGCCCCAA AGCTGGCCAG ACTTCATTAT
 3541 TCCGGATCAA TCAATGCCIG GAGCACCAG GAGCCCTTTT CTTGGATCAA GGTGGATCTG
 3601 TTGGCACCAA TGAATTTTCA CGGCATCAA ACCCAGGCTG CCGTCAAGAA GTTCTCCAGC
 3661 CTCTACACT CTCACTTTAT CATCATGTAT AGTCTTGATG GGAAGAAGTG GCAGACTTAT
 3721 CGAGGAAATT CCACCTGGAAC CTTAATGGTC TTCTTTGGCA ATGTGGATT C ATCTGGGATA
 3781 AAACACAATA TTTTAAACCC TCCAATTATT GCTCGATACA TCCGTTTGA CCAACTCAT
 3841 TATAGCATTG CGAGCACTCT TCGCATGGAG TTGATGGGCT GTGATTTAAA TAGTTGCAGC
 3901 ATGCCATTGG GAATGGAGAG TAAAGCAATA TCAGATGCAC AGATTACTGC TTCATCCTAC
 3961 TTTACCAATA TGTTTGCCAC CTGGTCTCCT TCAAAAAGCTC GACTTCACTT CCAAGGGAGG
 4021 AGTAATGCCT GGAGACCTCA GGTGAATAAT CCAAAAAGAGT GGTGCAAGT GGACTTCCAG
 4081 AAGACAATGA AAGTACACAG AGTAACTACT CAGGGAGTAA AATCTCTGCT TACCAGCATG
 4141 TATGTGAAGG AGTTCTCAT CTCCAGCAGT CAAGATGGCC ATCAGTGGAC TCTCTTTTTT
 4201 CAGAAATGGCA AAGTAAAGGT TTTTCAAGGA AATCAAGACT CCTTACACC TGTGGTGAAC
 4261 TCTTAGACCC CACCGTTACT GACTCGTAC CTTCGAATTC ACCCCAGAG TTTGGTGCAC
 4321 CAGATTGCC TGAGGATGGA GTTCTGGGC TGGAGGACAG AGGACCTCTA CGACAAAATC
 4381 CACACATGCC CACCGTCCAC AGCACCTGAA CTCTGGGAG GACCGTCACT CTTCTCTTC
 4441 CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGT
 4501 GTGGACGTGA GCCACGAAAG CCTTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGCGTGGAG
 4561 GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCCGGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC
 4621 AGCGTCTCTA CCTCTCTGCA CCAGGACTGG CTGAAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC
 4681 TCCAACAAAG CCGTCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAGCCAA AGGCCAGCC
 4741 CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC

ES 2 739 503 T3

```

4801 AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGIGGA GTGGGAGAGC
4851 AATGGGCAGC CCGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TGTGGACTC CGACGGCTCC
4921 TTCTTCTCTT ACAGCAAGCT CACCCGTCGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC
4981 TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG
5041 TCTCCGGGTA AACGGCCCG CCGGAGCGGT GCGCGCGGAT CAGGTGGGGG TGGATCAGCG
5101 GGTGGAGGTT CCGGTGGCCG GGGATCCGGC GGTGGAGGTT CCGGTGGGGG TGGATCAAGG
5151 AAGAGGAGGA AGAGGGACAA AACTCACACA TGCCCAACCGT GCCCAGCTCC AGAACTCCTG
5221 GGCGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCGCCCA AAACCCAAGG ACACCCCTCAT GATCTCCCGG
5281 ACCCCTGAGG TCACATGCCG GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC
5341 AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG
5401 TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTACGCGTC CTCACCGTCC TGACCAGGA CTGGCTGAAT
5451 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC
5521 ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA CCACAGTGT ACACCCCTGCC CCCATCCCGG
5581 GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTACGCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC
5641 GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCC
5701 CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCTCTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC
5751 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTCTCATGC TCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC
5821 TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCGTCTCCG GGTAAATGA
    
```

Secuencia de aminoácidos de FVIII-049. La secuencia señal se muestra en subrayado punteado y el enlazador con sitios de procesamiento por proproteína convertasa se muestra en negra

```

1 MQIELLSTGCF...LCLLRCEFSR TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP PRVPKSFFFN
61 TSVVYKKILF VEFTHLFLNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY DTVVITLKNM ASHEVSLHAV
121 GVSYYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPQ GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSLSH
181 VDLVKDLNSG LIGALLVCRE GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD
241 AASARAWPKM HTVNGYVNRSLPGLIGCHRR SVYWHVIGMG TPEVHSIFL EGHFVLRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCEP EPQLRMKNNE
361 EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DNSSPSFIQI RSVAKKHPKT WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA
421 PDDRSYKSYQY LNNQPQRIGR KYKKVRFMAY TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDIL
481 LIIFKNQASR PNYIYPHGIT DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTIVIVEDGP
541 TKSDPRCLTR YSSVFNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601 NRSWYLTEINI QRFLNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL HEVAYWYILS
661 IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLLTLE PFSGETVFMS MENPGLWILG CHNSDFRNRG
721 MTALLKVSSC DRNTGDYDED SYEDISAYLL SKNNAIEPRS FSQNPPVLRK HREIITRITL
781 QSDQEEIDYD DIIIVEMKKE DFDIYDEDED QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
841 HVLNRNAQSG SVFPQKVVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
901 RNQASRPYSE YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP TKDEFDCXAW
961 AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE FALFFTFIDE TKSWFYFENM
1021 ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI MDTLPLGLVMA QDQIRIRWYLL SMGSNENIHS
1081 IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL YNLYPGVFET VEMLPKAGI WRVECLIGEHLHAGMSTLFL
1141 VYSNKCQTPG GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1201 LAPMIIHGPK TQGARQKFSY LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV FFGNVDSSGI
1261 KHNIENPPII ARYIRLHPTH YSTRSTLRME LMGCDLNSCS MPLGMESKAI SDAQITASSY
1321 FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN PKEWLQVDFQ KIMKVIGVIT QGVKSLTSM
1381 YVKEFLISSS QDGHQWTLFF QNGKVKVFQG NQDSFTFVFN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH
1441 QIALRMEVLG CEAQDLYDKT HTCCPPCAPE LGGPSVFLF PPKPKDLM I SRTPEVTCVV
1501 VDVSHEDPEV FENWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV
1561 SNKALPAPIE KTIISKAKGQP REFQVYTLPP SRDELTKNOV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
1621 NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NYHTQKSLSL
1681 SPGKRRRRSG GGGSGGGSG GGGSGGGSGR KRRKRDKTHT CPPCPAPELL
1741 GGPSVFLFPP KPKDLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
1801 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GREYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSR
1861 DELTKNOVSL TCLKVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
1921 RWQQGNVFC SVMHEALHNY YTKSLSLSP GK*
    
```

5 Secuencia de ADN para IFN-b-018

ES 2 739 503 T3

1 ATGACCAACA AGTGTCTCCT CCAAAATTGCT CTCCTGTGTG GCTTCTCCAC TACAGCTCTT
61 TCCATGAGCT ACAACTTGTCT TGGATTCCCTA CAAAGAAGCA GCAATTTTCA GTGTCAGAAG
121 CTCCTGTGGC AATTGAATGG GAGGCTTGAA TATTGCCTCA AGGACAGGAT GAACTTTGAC
181 ATCCCTGAGG AGATTAAAGCA GCTGCAGCAG TTCCAGAAGG AGGACGCCGC ATTGACCATC
241 TATGAGATGC TCCAGAACAT CTTTGCTATT TTCAGACAAG ATTCATCTAG CACTGGCTGG
301 AATGAGACTA TTGTTGAGAA CCTCCTGGCT AATGTCTATC ATCAGATAAA CCATCTGAAG
361 ACAGTCCTGG AAGAAAAACT GGAGAAAGAA GATTTTACCA GGGGAAAACT CATGAGCAGT
421 CTGCACCTGA AAGATATTA TGGGAGGATT CTGCATTACC TGAAGGCCAA GGAGTACAGT
481 CACTGTGCCT GGACCATATG CAGAGTGGAA ATCCTAAGGA ACTTTTACTT CAITAACAGA
541 CTTACAGGTT ACCTCCGAAA CGGTGGCCGC GGCTCCGGTG GAGGCCGGTC CGGCGGTGGA
601 GGGAGCGACA AAACTCACAC ATGCCACCCTG TCCCCAGCTC CGGAACTCCT GGGAGGACCG
661 TCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCTGAG
721 GTCACATGCG TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC
781 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAGCCCGC GGGAGGAGCA GTACAACAGC
841 ACGTACCGTG TGGTACCGCT CCTCACCGTC CTGCACCAGG ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG
901 TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC CCAGCCCCA TCGAGAAAA CATCTCCAAA
961 GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGATGAGCTG
1021 ACCAAGAAC AGGTACAGCT GACCTGCCTG GTCAAAAGCT TCTATCCAG CGACATCGCC
1081 GTGGAGTGGG AGACCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACGCC TCCCCTGTTG
1141 GACTCCGAGG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG TCGACAAGAG CAGGTGGCAG
1201 CAGGGGAAAG TCTTCTCATG CTCCGTGATG CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG
1261 AAGAGCCTCT CCTTGTCTCC GGGTAAACGG CGCCGCCGGA GCGGTGGCGG CGGATCAGGT
1321 GGGGGTGGAT CAGGCGGTGG AGGTTCGGGT GGGGGGGGAT CCAGGAAGAG GAGGAAGAGG
1381 GACAAAACCT ACACATGCC ACCGTGCCCA GCACCCGAAC TCCTGGGCGG ACCCTCAGTC
1441 TTCCCTTCTC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCCG TGAGGTACAA
1501 TGCCTGGTGG TGCACGTGAC CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
1561 GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGGAG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
1621 CGTGTGGTCA GGTCTCTCAC CGTCCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAA
1681 TGCAAGGTCT CCAACAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCACTC CAAAGCCAAA
1741 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCAT CCGGGATGA GCTGACCAAG
1801 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAA GGCITCTATC CCAGGCACAT CGCCGTGGAG
1861 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GTTGGACTCC
1921 GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
1981 AACGICTTCT CATGCTCCGT ATGTCATGAG GCICTGCACA ACCACTACAC GCAGAAAGAC
2041 CTCTCCCTGT CTCGCGGTAA ATGA

5 Secuencia de aminoácidos de IFN-b-018. La secuencia señal se muestra en subrayado punteado, la región de enlazador que conecta IFN-b con la región Fc está subrayada y el enlazador con sitios de procesamiento por proproteína convertasa se muestra en negrita

1 MINKLLQIA..LLLCEFTIAL..SMSYNLLGFL QRSSNFQCQK LLWQLNGRLE YCLKDRMNF
61 IPBEIKQLQQ FQKEDAALTI YEMLQNI FAI FRQDSSTGW NETIVENLLA NVYHQINHLK
121 TVLEEKLEKE DFTRGKLMSS LHLKRYGRI LHYLKAKEYS HCAWTIVRVE ILRNFYFINR
181 LTGYLRNGGG GSGGGGGGGG GSDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DILMISRTPE
241 VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVSVLTV LHQDWLNGKE
301 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
361 VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSQSVM HEALTHYHTQ
421 KSLSLSPGK **RRRS**GGGGGG **GGGS**GGGGGG **GGGS**RKRRKR DKTHTCPPCP APELLGGPSV
481 FLFPPKPRDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
541 RYVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALFA PIEKTIKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK
601 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLD DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
661 NVFCSQVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende
 - (i) al menos un resto biológicamente activo que comprende un factor de coagulación,
 - (ii) una región Fc que comprende al menos dos restos Fc, y
- 5 (iii) un enlazador scFc escindible (cscFc) intercalado entre los dos restos Fc, en donde el enlazador cscFc está flanqueado por un sitio de escisión enzimática antes y después del enlazador cscFc, que resulta en la escisión del enlazador cscFc.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende un segundo resto biológicamente activo.
- 10 3. El polipéptido de la reivindicación 2, en donde el segundo resto biológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en: una porción de unión a antígeno de un anticuerpo, una molécula de unión distinta de inmunoglobulina, una porción de unión de un ligando, una porción de unión de un receptor y un factor de coagulación.
4. El polipéptido de la reivindicación 2 o 3, en donde el polipéptido tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en: A-F1-B-P1-L-P2-F2; A-F1-P1-L-P2-B-F2; A-F1-P1-L-P2-F2; y F1-P1-L-P2-B-F2; en secuencia lineal desde el extremo amínico al carboxílico, y
- 15 en donde A es el al menos un resto biológicamente activo;
- B es el segundo resto biológicamente activo;
- P1 es un primer sitio de escisión enzimática;
- P2 es un segundo sitio de escisión enzimática;
- L es un enlazador cscFc; y
- 20 F1 y F2 son los restos Fc.
5. El polipéptido de la reivindicación 4, en donde al menos uno de P1 o P2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: TQSFNDFTR, SVSQTSKLTR, DFLAEGGGVR, TTKIKPR, LVPRG y ALRPR.
6. El polipéptido de la reivindicación 4, en donde al menos uno de P1 o P2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: RRRR, RKRRKR y RRRRS.
- 25 7. El polipéptido de la reivindicación 2, en donde:
 - (i) el primer resto biológicamente activo comprende una cadena ligera de un factor de coagulación; y
 - (ii) el segundo resto biológicamente activo comprende una cadena pesada de un factor de coagulación;
- 30 en donde la región Fc comprende un primer resto Fc y un segundo resto Fc; en donde el primer resto Fc está enlazado con la cadena ligera del factor de coagulación y el segundo resto Fc está enlazado con la cadena pesada del factor de coagulación; y en donde la cadena ligera y la cadena pesada se asocian para formar un factor de coagulación enzimáticamente activo.
8. El polipéptido de la reivindicación 3 o 7, en donde el factor de coagulación se selecciona del grupo que consiste en FVII, FVIIa, FIX, FIXa, FX y FXa.
- 35 9. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende, además, un resto de direccionamiento.
10. El polipéptido de la reivindicación 9, en donde el resto de direccionamiento se une a plaquetas en reposo o se une selectivamente a plaquetas activadas.
11. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 40 12. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 11.
13. Una célula hospedante que comprende el vector de la reivindicación 12, en donde la célula hospedante expresa una enzima que escinde el enlazador cscFc, en donde la enzima es endógeno o exógena con respecto a la célula.
14. Un método para fabricar un polipéptido heterodimérico procesado que comprende dos cadenas polipeptídicas, que comprende cultivar la célula hospedante de la reivindicación 13 en un medio de cultivo celular y aislar el polipéptido heterodimérico maduro del medio de cultivo.
- 45

15. Una composición que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y un portador farmacéuticamente aceptable.

16. La composición de la reivindicación 15, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en un sujeto.

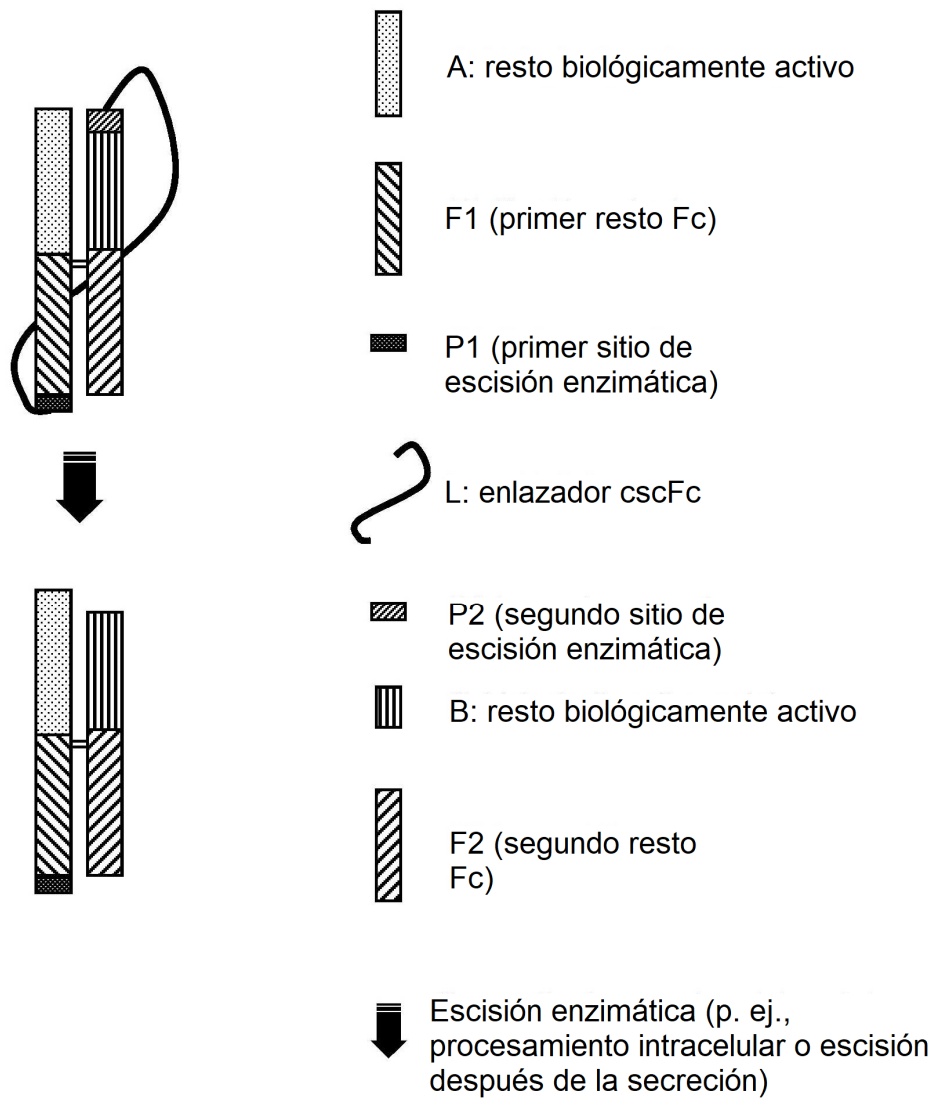


Fig. 1A

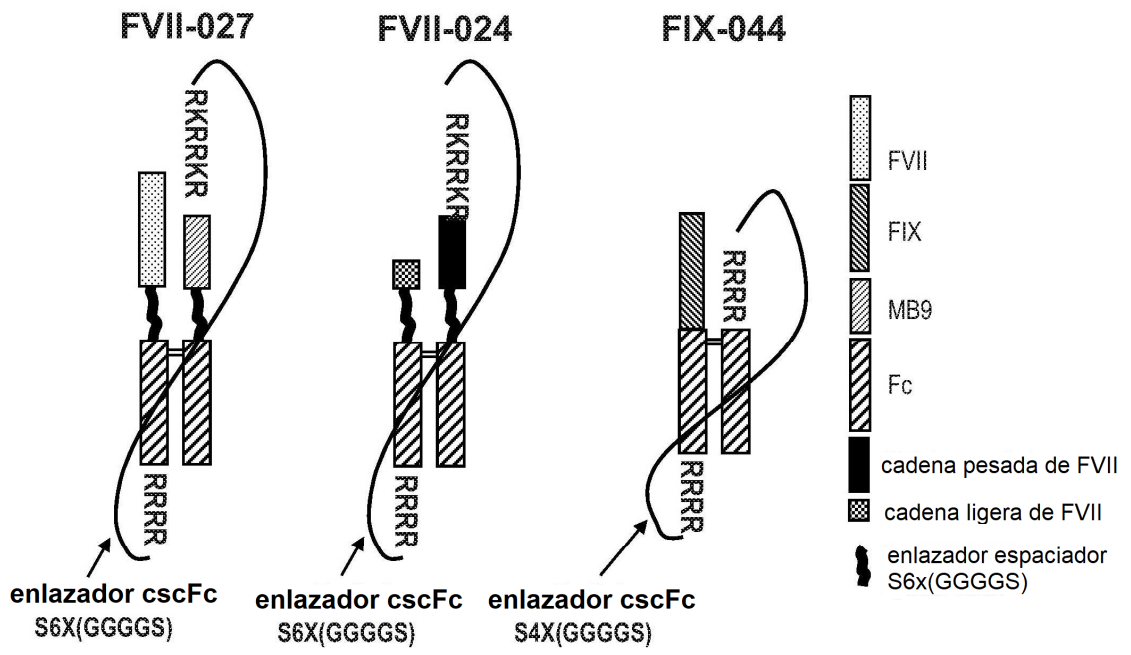


Fig. 1B

Transferencia Western de inmunoprecipitación de proteína A después de transfección transitoria de pSYN-FVII-024 con o sin pSYN-PC5-003. Carril 1, marcador de peso molecular SeeBlue Plus 2; Carril 2, pSYN-FVII-024, no reductor; carril 3, pSYN-FVII-024+pSYN-PC5-003, no reductor; carril 4, pSYN-FVII-024, reductor; carril 5, pSYN-FVII-024+pSYN-PC5-003, reductor.

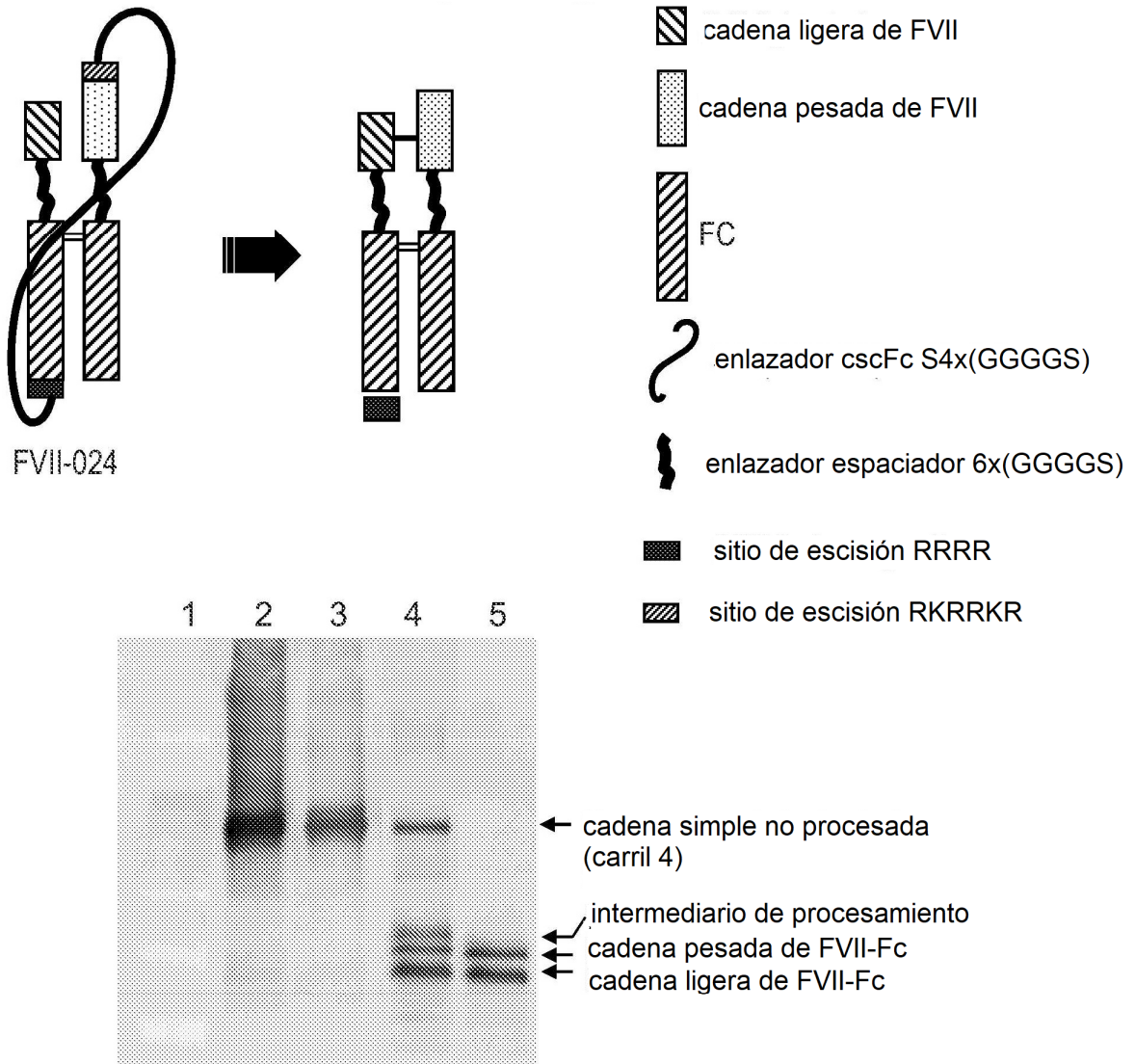


Fig. 2

Posibles productos generados después de la escisión por propéptido convertasa

Secuencia de sitio de procesamiento

FIX-	Secuencia proteica entre Fc
044	RRRRS-enlazador-RRRR
050	RRRRS-enlazador-RAGR
052	RRRRS-enlazador-RSKR
053	RRRRS-enlazador-RKRRKR

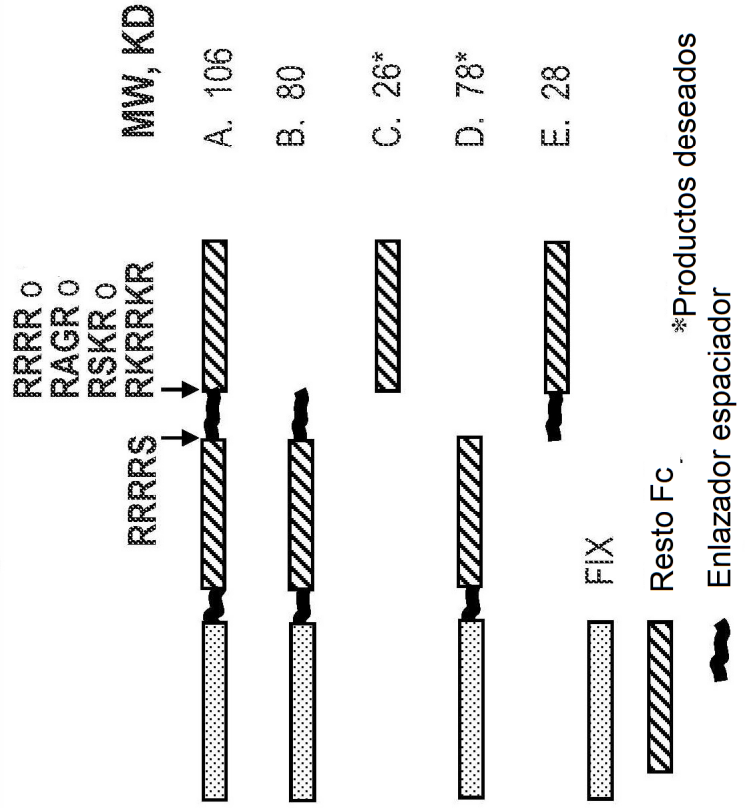


Fig. 3A

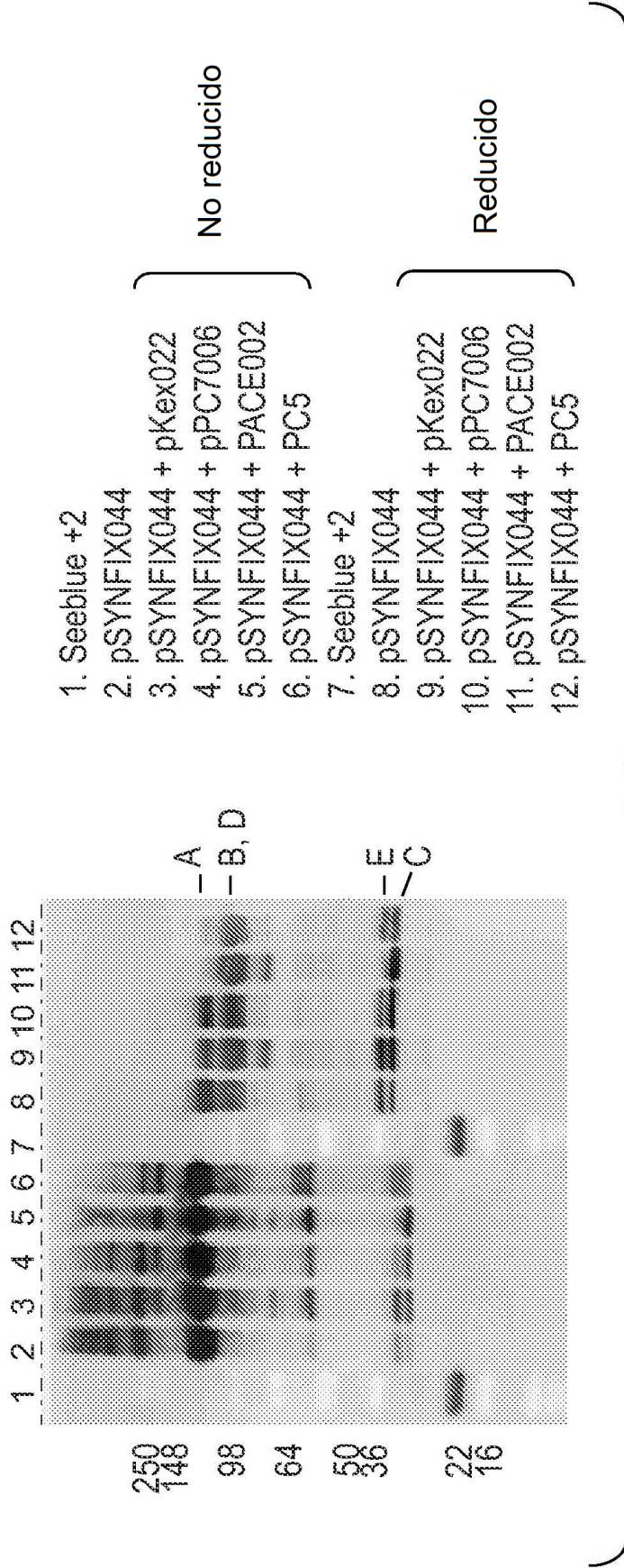


Fig. 3B

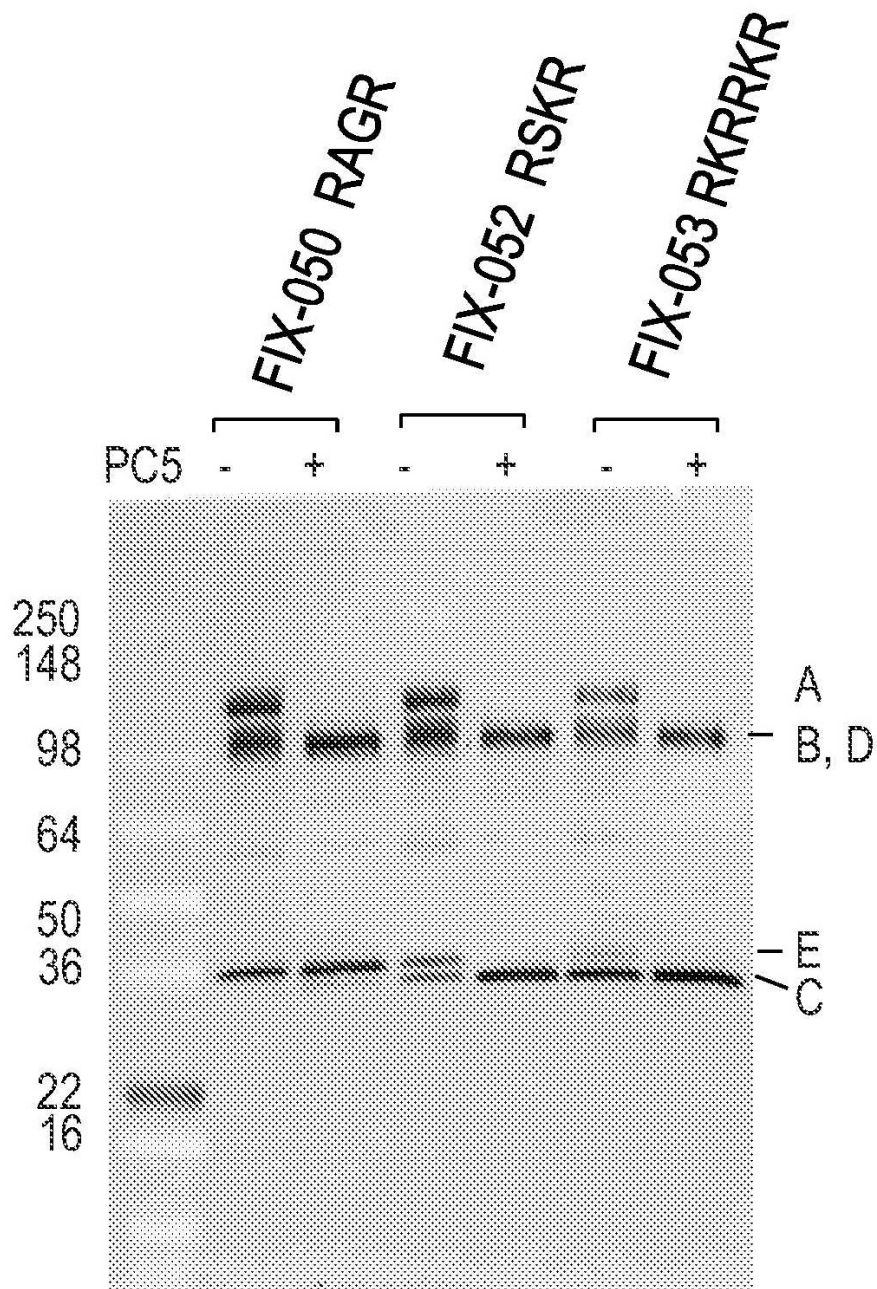


Fig. 3C

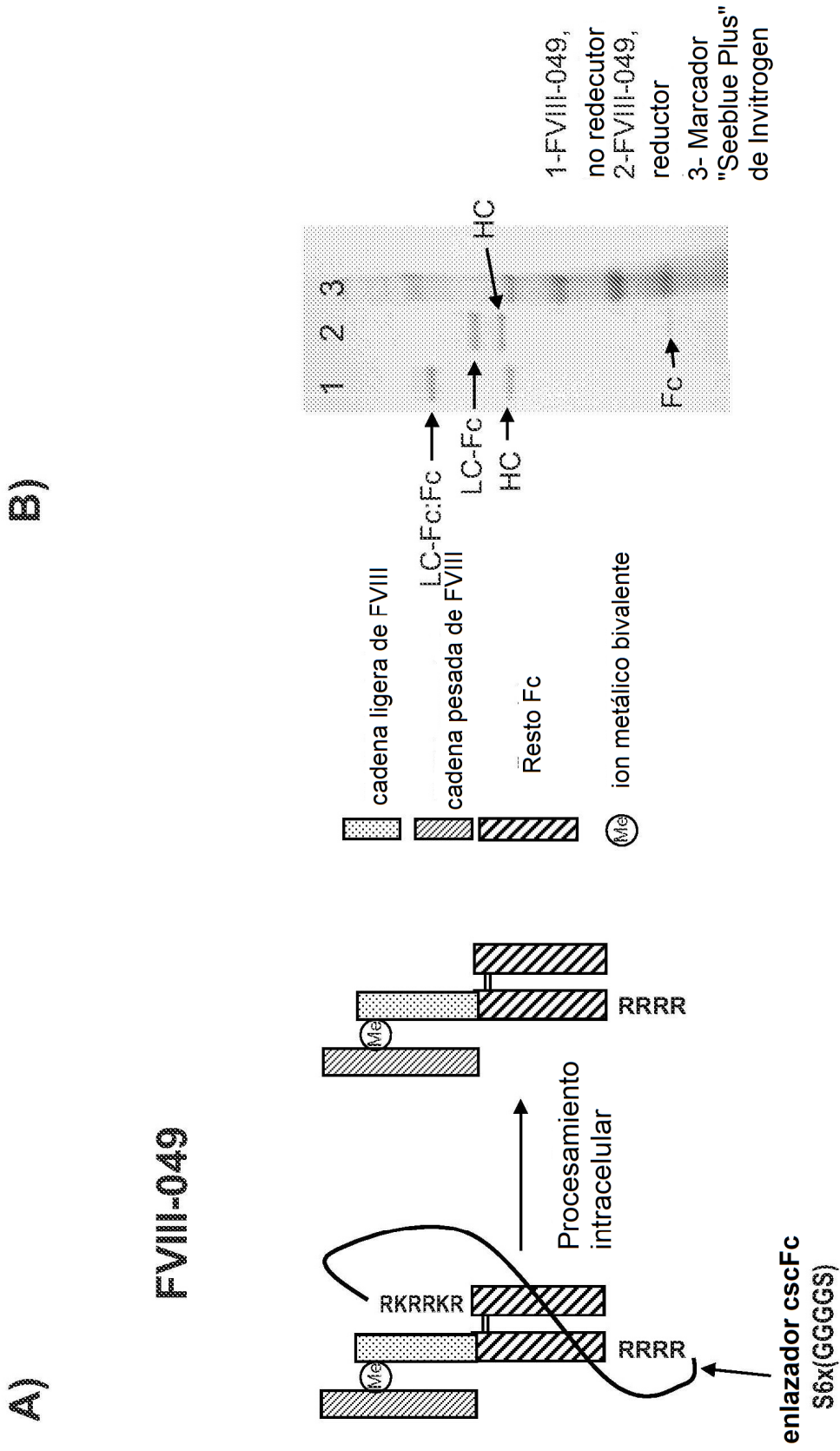


Fig. 4

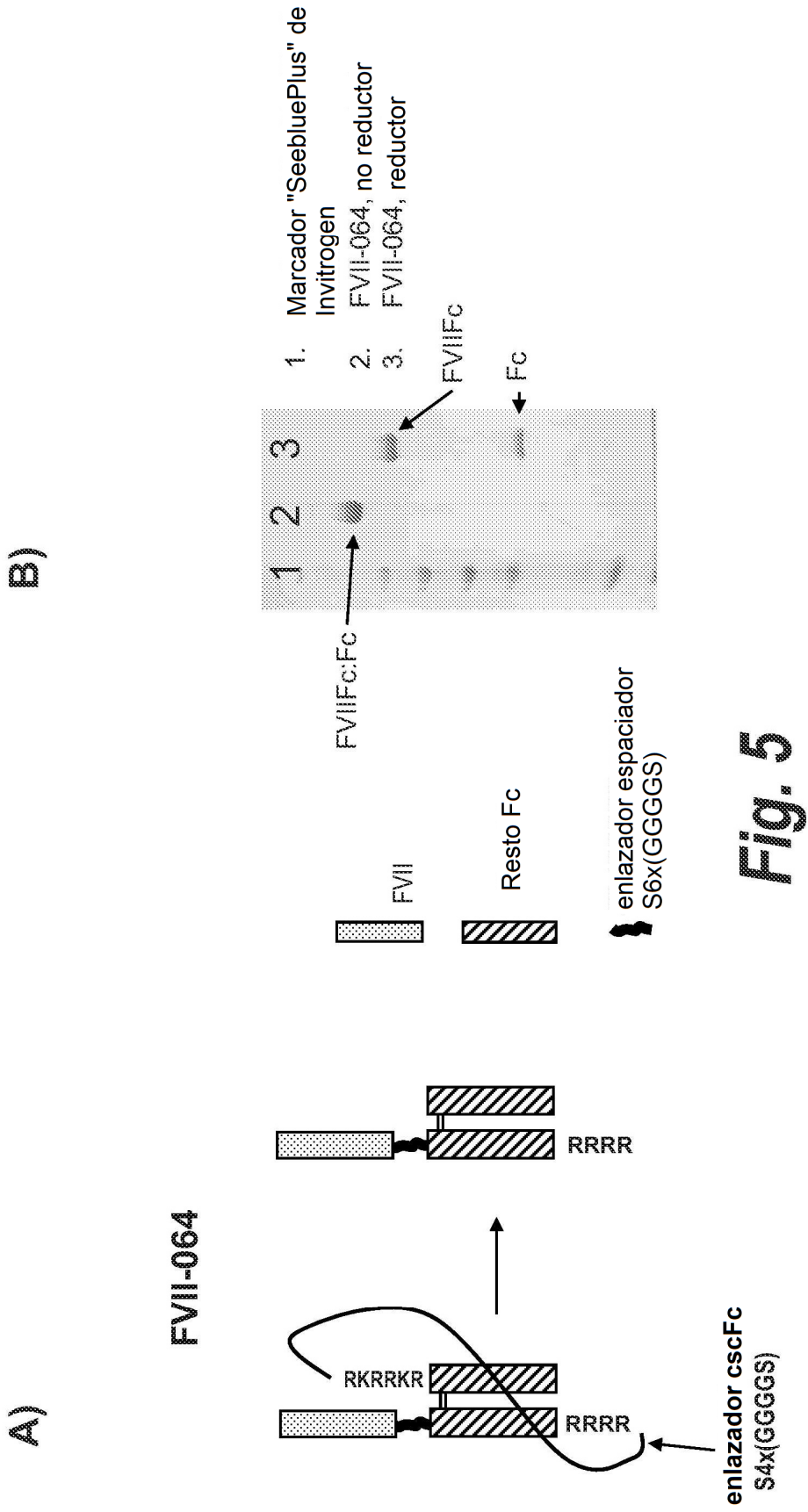


Fig. 5

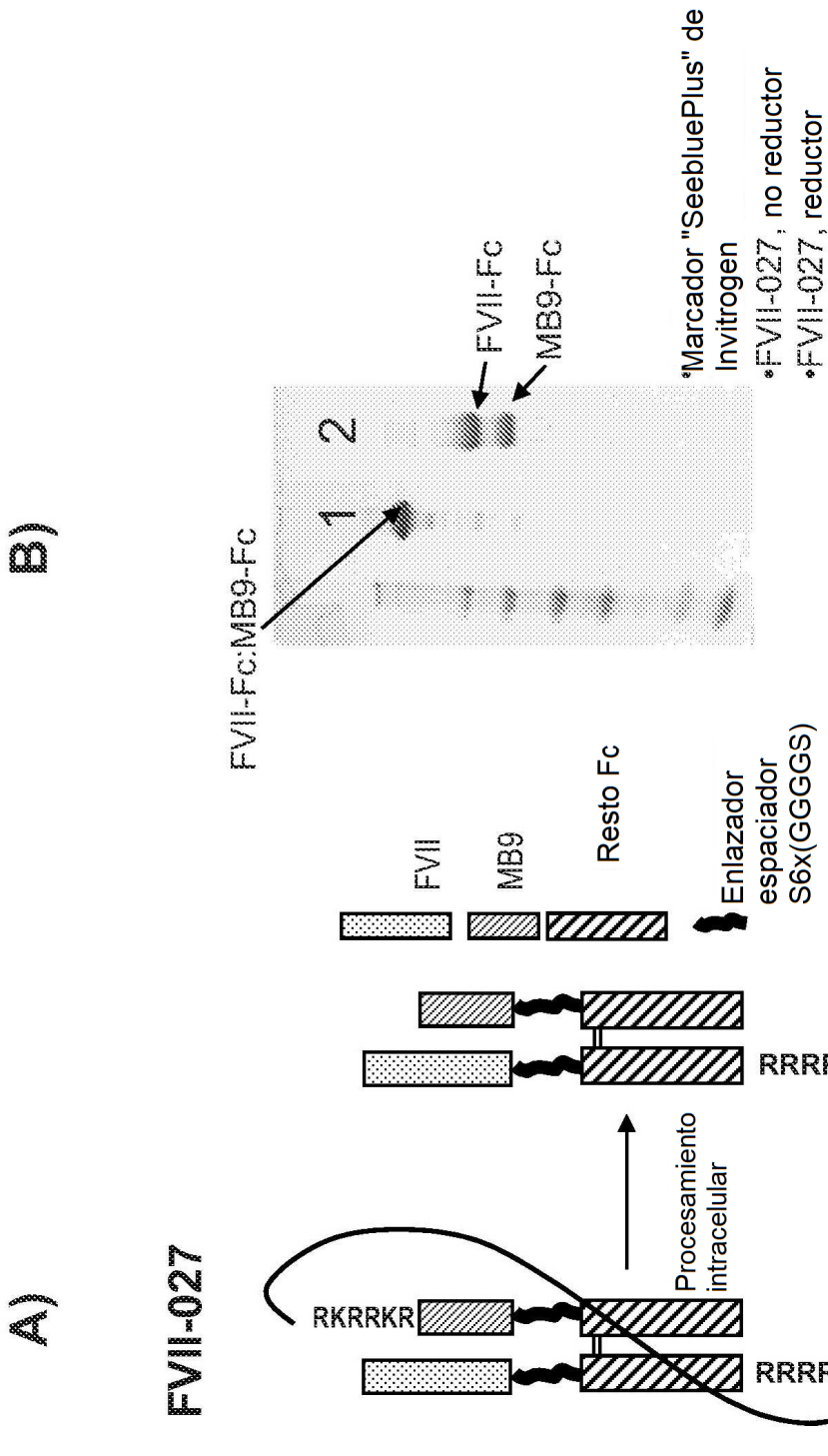


Fig. 6

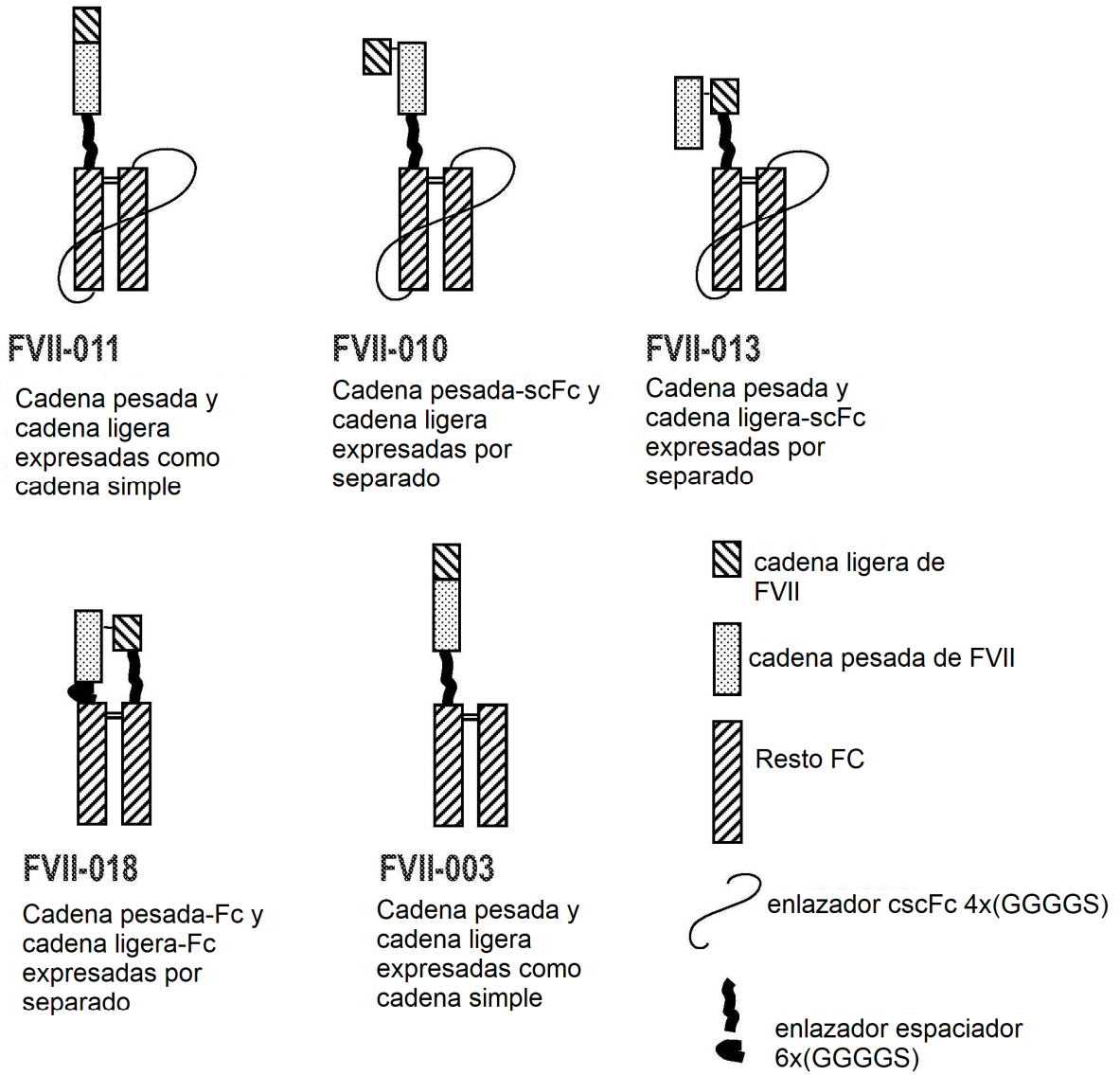
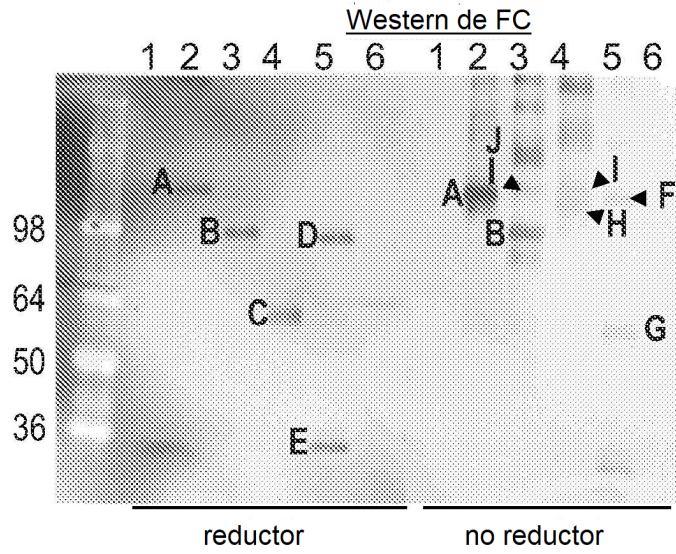
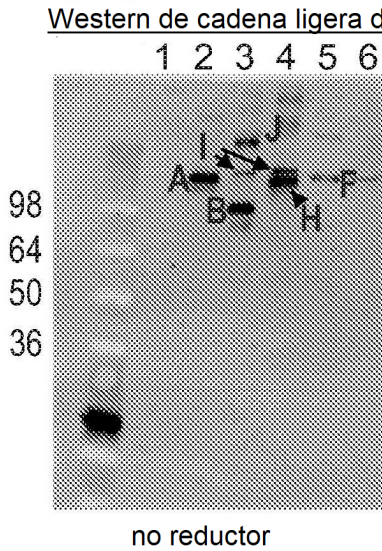


Fig. 7



Interpretación de bandas

- A. FVII-scFc
- B. Cadena ligera-scFc
- C. Cadena ligera-Fc
- D. FVII-Fc
- E. Fc
- F. FVII-Fc:Fc
- G. Dímero de Fc
- H. Cadena ligera-dímero de Fc
- I. Cadena ligera-Fc:HC-Fc
- J. Cadena ligera-dímero de scFc



Proteínas cargadas en gel

- 1. FVII-010
- 2. FVII-011
- 3. FVII-013
- 4. FVII-018
- 5. FVII-003
- 6. Sin ADN en la transfección

Fig. 8

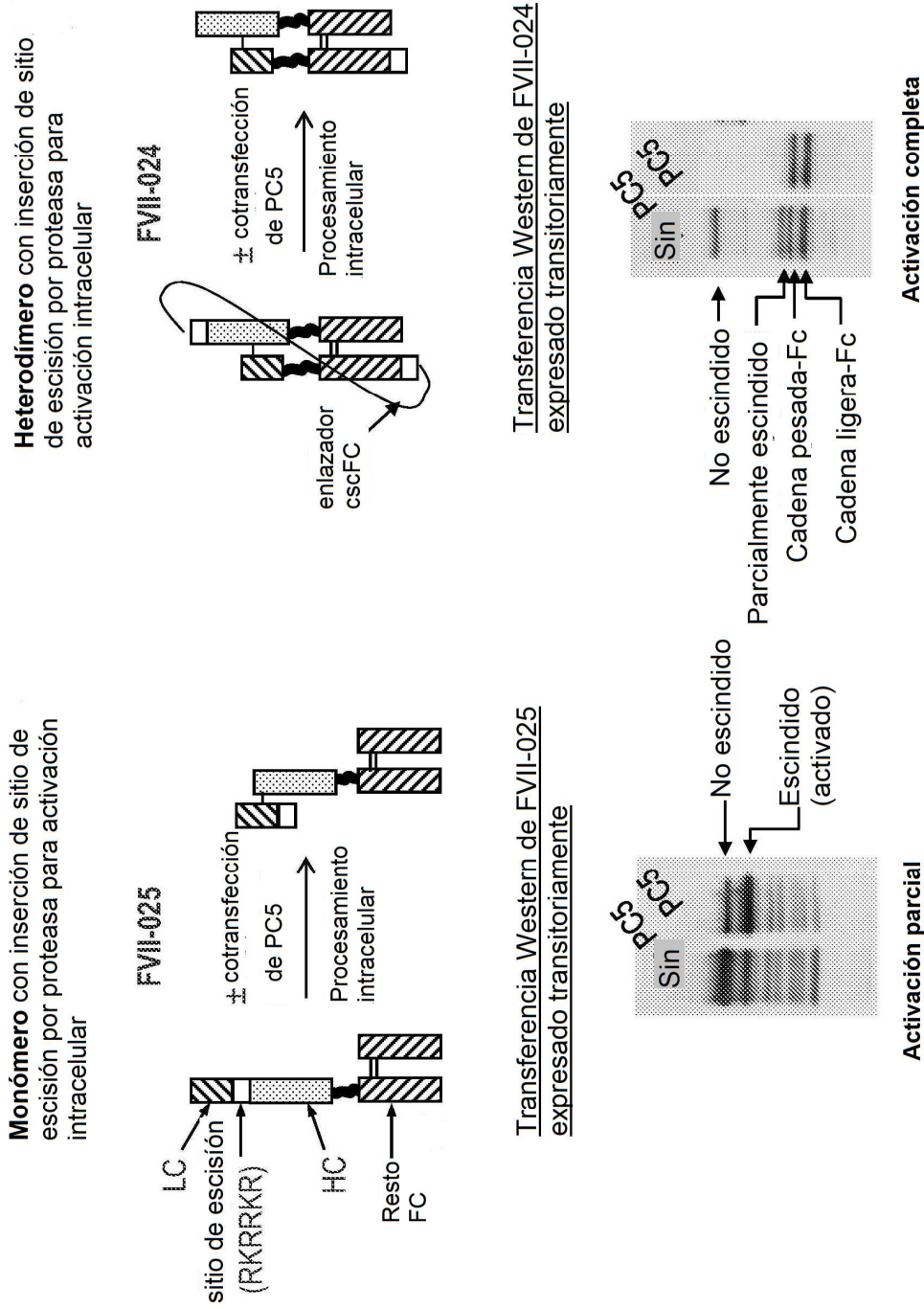
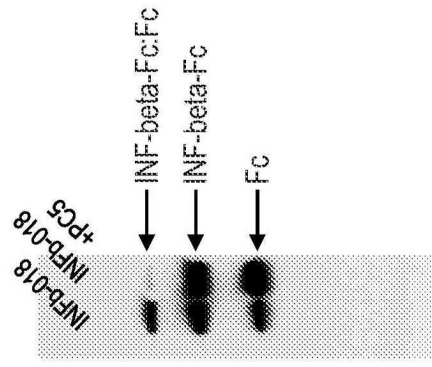
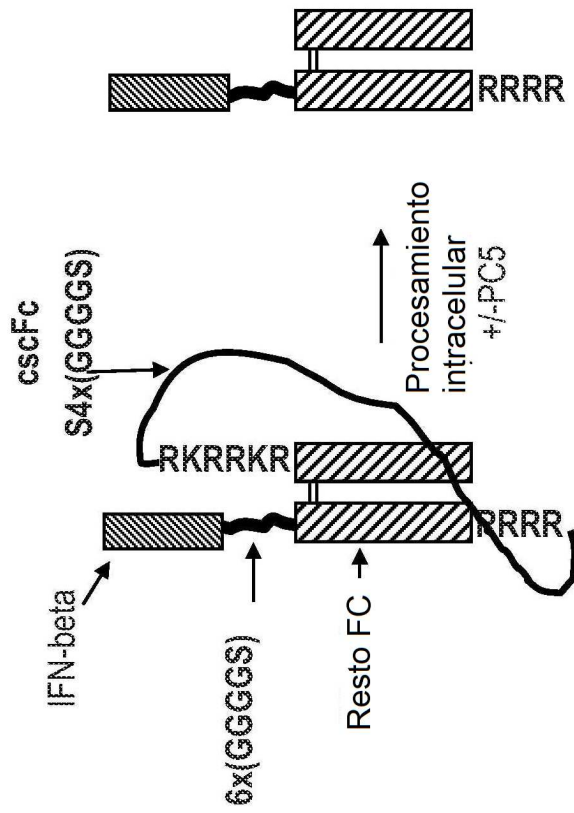


Fig. 9

Precipitación de proteína A de IFNβ-018
 expresado transitoriamente con posterior
 análisis de transferencia Western
 (anticuerpo anti-Fc)



Condiciones reductoras



IFNβ-018

Fig. 10

Análisis de transferencia Western (western de Fc) de especies de FVIIFc después de la transfección transitoria de células HEK 293 y precipitación de proteína A

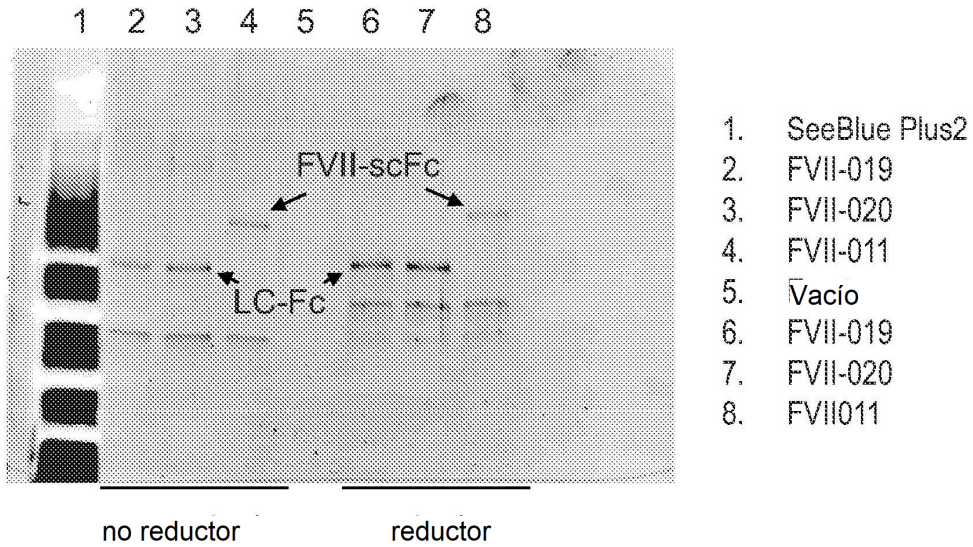
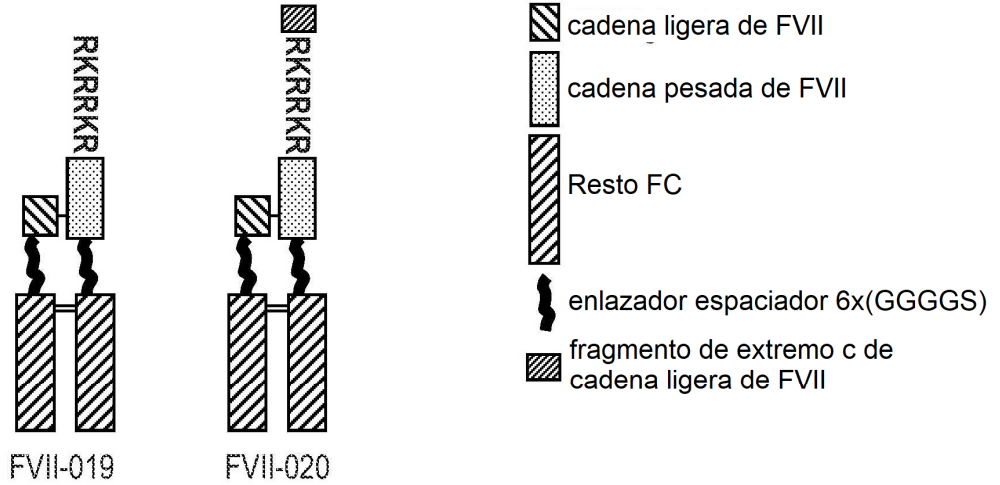


Fig. 11