

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.05.06	(73) Titular(es): BIOGEN HEMOPHILIA INC. 250 BINNEY STREET CAMBRIDGE MA 02142 US
(30) Prioridade(s): 2003.05.06 US 468837 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2011.03.23	(72) Inventor(es): DANIEL S. RIVERA US ROBERT T. PETERS US ALAN J. BITONTI US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.09.30 020/2016	(74) Mandatário: MANUEL BASTOS MONIZ PEREIRA RUA DOS BACALHOEIROS, 4 1100-070 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE FATOR DE COAGULAÇÃO PARA O TRATAMENTO DE UM DISTÚRBO HEMOSTÁTICO**

(57) Resumo:

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE UM DISTÚRBO HEMOSTÁTICO, COMPREENDENDO UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA, E UM TRANSPORTADOR FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL OU EXCIPIENTE, EM QUE A DITA PROTEÍNA QUIMÉRICA COMPREENDE PELO MENOS UMA PARTE DE UMA REGIÃO CONSTANTE DA IMUNOGLOBULINA, QUE É UM PARCEIRO DE LIGAÇÃO FCRN, UM FATOR DE COAGULAÇÃO SELECIONADOS A PARTIR DO FATOR VIII UM ANÁLOGO DO FATOR VII R FATOR VII-A E ANÁLOGO DO FATOR VIIA E, OPCIONALMENTE, PELO MENOS UM LIGADOR.

DESCRIÇÃO

**PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE FATOR DE COAGULAÇÃO PARA O
TRATAMENTO DE UM DISTÚRPIO HEMOSTÁTICO**

Âmbito da Invenção

A invenção refere-se na generalidade ao campo da terapêutica dos distúrbios hemostáticos. Mais especificamente, a invenção está relacionada com uma proteína quimérica para o tratamento de um distúrbio hemostático.

Antecedentes da Invenção

Os transtornos hemostáticos são caracterizados pelo sangramento descontrolado decorrente da incapacidade, ou redução da capacidade, de formar coágulos de fibrina. Os transtornos hemostáticos podem resultar de um defeito genético ou pode ser adquirido como resultado de uma condição médica não relacionada (p. ex., cancro e quimioterapia relacionada, doença autoimune) (Kasper 2000, Hemophilia 6 (Supp): 13; Cohen et al. 1996, Bailliere's Clinical Hematology 9(2):331). Normalmente, os distúrbios hemostáticos resultam da deficiência de um fator de coagulação do sangue específico. Exemplos clássicos de distúrbios hemostáticos incluem hemofilia A, que resulta de uma deficiência do fator VIII; hemofilia B (doença de Christmas), que resulta de uma deficiência do fator IX; e doença de von Willebrand, que resulta de um defeito no fator de von Willebrand. O fator de von Willebrand circula em associação com o fator VIII e estabiliza-o. Ele medeia a adesão das plaquetas entre si e às paredes dos vasos sanguíneos danificados. Outros, menos comuns distúrbios hemostáticos incluem a deficiência do fator XI (deficiência de PTA), deficiência do fator XII, bem

como deficiências ou anormalidades estruturais do fibrinogénio, protrombina, fator V, fator VII, fator X, ou fator XIII (Kasper 2000, Hemophilia 6 (Supp): 13).

Os fatores de coagulação agem em conjunto uns com os outros numa cascata de coagulação que finalmente resulta na formação de um coágulo de fibrina (Figura 1). Estes fatores podem existir num estado quiescente como uma pró-enzima ou zimogénio ou num estado enzimático ativado quando estimulados a formar um coágulo. A estimulação desses fatores pode ocorrer por duas vias distintas, a via intrínseca e via extrínseca. A via intrínseca refere-se às reações que levam à formação de coágulos através da utilização de fatores presentes apenas no plasma. Em contrapartida, a via extrínseca refere-se às reações que levam à formação de coágulo pela libertação do fator da membrana tecidual através da rutura do endotélio do vaso.

O fator VII participa de ambas as vias fazendo a clivagem do fator X em fator Xa ativado em conjunto com o fator tecidual na via extrínseca ou interagindo com o fator IXa na via intrínseca. O fator VII age em baixo fluxo e independentemente dos fatores VIII e IX, quando atuam através da via extrínseca, ignorando assim a necessidade destes fatores de coagulação. É, portanto, um candidato terapêutico atraente para o tratamento de distúrbios hemostáticos, especialmente hemofilia A e B. (Patentes US 6,310,183; WO 01/58935).

O fator VII é uma vitamina K-dependente da proteína plasmática sintetizada no fígado e segregada no sangue como uma glicoproteína de cadeia simples com um peso molecular de 53 kDa (Broze et al. 1980, J. Biol. Chem. 255:1242). O zimogénio do fator VII é convertido numa forma ativada

(FV11a) por clivagem proteolítica num único sítio, Arg152-Ile153, resultando em duas cadeias, pesada (254 aminoácidos) e leve (154 aminoácidos) ligadas por uma única ponte dissulfeto (Hagen et al. 1986, Proc. Natl. Acad. Sei. (USA) 83:2412). A forma ativada do fator VII liga ao fator de tecidos, que converte o fator X em fator Xa. O fator Xa é necessário para converter a protrombina em trombina, que converte o fibrinogénio em fibrina como um estágio final na formação de um coágulo de fibrina.

O fator VII sofre modificações pós-translacionais, incluindo a carboxilação da vitamina K-dependente, resultando em dez resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico na região N-terminal da molécula. Outras modificações pós-translacionais incluem ligação da metade da molécula de açúcar que ocorrem naturalmente em dois sítios de N-ligação de glicosilação na posição 145 e 322, respetivamente, e dois que ocorrem naturalmente nos sítios O-glicosilação ligados na posição 52 e 60, respetivamente (WO 01/58935).

A terapia tradicional para as doenças hemostáticas assenta na reposição parenteral de deficientes fatores de coagulação, como o fator VII, o fator VIII ou o fator IX (ver, por exemplo, as Patentes US 6,310,183 e 4,784,950). O tratamento geralmente envolve tanto a administração de fatores de coagulação para o tratamento de episódios de sangramento agudo, bem como a administração profilática de fatores de coagulação para impedir a ocorrência de episódios de sangramento futuro. A profilaxia foi encontrada para reduzir o risco de desenvolver problemas nas articulações e artrite associada a episódios de sangramento frequente (Petrini 2001, Hemophilia 7:99; Fischer et al. 2002, Blood 99(7):2337).

As terapias tradicionais têm, no entanto, muitos problemas associados. Atualmente, os fatores de coagulação devem ser administrados por via parentérica, a fim de atingir as doses eficazes porque os métodos não invasivos não foram bem-sucedidos em alcançar níveis terapêuticos. Problemas associados com a administração parenteral incluem oclusão no local da injeção, dor e infecção. O uso de um cateter aumenta o risco de todos estes eventos. Os problemas específicos associados com a administração parenteral de fatores de coagulação para bebês e crianças pequenas incluem o acesso venoso central. Além disso, administração parenteral de fatores de coagulação, corre o risco de precipitar um episódio de sangramento. Estes problemas são particularmente relevantes quando o paciente é submetido a administração profilática regular de um fator de coagulação.

Fatores de coagulação, como o fator VIII e o fator IX devem ser administrados com frequência e em grandes doses resultando no desenvolvimento de anticorpos contra o fator inibidor da coagulação num número significativo de pacientes (ver, por exemplo, Nilsson 1992, *Transfusion Medicine Review* 6(4):285; Cohen et al. 1996, *Bailliere's Clinical Hematology* 9(2):331).

Um aspecto da invenção fornece um tratamento mais seguro e mais eficaz para os distúrbios hemostáticos. Outro aspecto da invenção fornece para maior meia vida sérica e maior biodisponibilidade da terapêutica administrada através de meios não invasivos para o tratamento de distúrbios hemostáticos, reduzindo assim o risco de se sofrer um episódio de sangramento, infecção e oclusão do local da injeção associada à administração parenteral. Outro aspecto da invenção fornece terapia para distúrbios hemostáticos com risco reduzido, em comparação com as terapias atuais, de

desenvolvimento de anticorpos inibidores contra o fator da coagulação. Ainda um outro aspeto da invenção prevê um tratamento profilático de um distúrbio hemostático.

Os aspetos da invenção fornecem uma proteína quimérica, composta por pelo menos um fator de coagulação e pelo menos uma porção de uma região de imunoglobulina constante, onde o fator de coagulação é capaz de promover a coagulação do sangue e/ou formação de coágulo de fibrina.

Proteínas quiméricas compreendendo uma porção Fc de uma imunoglobulina são conhecidas (ver, por exemplo, as Patentes US 6,030,613, 6,086,875, 6,485,726 e o Pedido PT US/02/21335) e enquanto as proteínas quiméricas compostas por fatores de coagulação mutantes sem atividade de coagulação, e imunoglobulinas têm sido descritas previamente (WO01/02439), proteínas quiméricas que compreendem um fator de coagulação (isto é, tem atividade de coagulação) e pelo menos uma parte da região constante de imunoglobulina só foram descritos para a tromboplastina. Fator de coagulação, tal como definido abaixo e aqui utilizado refere-se a qualquer molécula com atividade de coagulação, tal como definido neste documento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente divulgação, incluindo a presente invenção, está relacionada com uma proteína quimérica melhorada, para tratamento de distúrbios hemostáticos. A presente divulgação, incluindo a presente invenção, fornece uma proteína quimérica, tal como descrito nas reivindicações 1 e 10 para tratar um distúrbio hemostático que pode ser administrada por via parenteral ou não invasiva (por exemplo, através de uma via pulmonar, nasal ou oral). A presente

divulgação refere-se, incluindo a presente invenção, portanto, a uma proteína quimérica, compreendendo pelo menos um fator de coagulação e pelo menos uma porção de uma região constante da imunoglobulina.

A presente divulgação refere-se também a um método de tratamento de um distúrbio hemostático compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína quimérica, compreendendo pelo menos um fator de coagulação, tal como descrito nas reivindicações 1 e 10 e pelo menos uma porção de uma região constante da imunoglobulina.

A presente divulgação refere-se também a um método de fazer uma proteína quimérica, tal como descrito nas reivindicações 1 e 10, compreendendo pelo menos um fator de coagulação e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina; compreendendo o referido método a transfecção de uma célula com uma construção de ADN que compreende uma primeira sequência de ADN codificando pelo menos um fator de coagulação operativamente ligado a uma segunda sequência de ADN codificando pelo menos uma parte da imunoglobulina; cultivando as ditas células em condições tais que a proteína quimérica é expressa; e isolando a dita proteína quimérica da dita célula.

A presente divulgação refere-se também a uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de codificação de, pelo menos, um fator de coagulação, e pelo menos uma porção de uma região constante da imunoglobulina.

A presente descrição também se refere a uma construção de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ADN que codifica pelo menos um fator de coagulação e, pelo menos,

uma porção de uma região constante de imunoglobulina. Com base na divulgação contidas neste documento, o presente invento proporciona uma proteína quimérica que compreende uma primeira cadeia e uma segunda cadeia, em que a referida primeira cadeia compreende uma região constante de imunoglobulina ou uma sua porção, que é um recetor Fc neonatal (FcRn) parceiro de ligação, e um fator de coagulação, e em que a dita segunda cadeia compreende uma região constante de imunoglobulina ou uma sua porção, que é um parceiro de ligação FcRn, sem um fator de coagulação.

A presente invenção também fornece para a proteína quimérica da invenção, para utilização num método de tratamento, por exemplo, para uso no tratamento de um distúrbio hemostático.

A presente invenção proporciona ainda um primeiro constructo de ADN e uma segunda construção de ADN que, em conjunto codificam a proteína quimérica da invenção, em que a primeiro constructo de ADN codifica a primeira cadeia do referido quimérico proteína e a segunda construção de ADN codifica a segunda cadeia da referida proteína quimérica. A presente invenção também proporciona um vetor compreendendo referida primeira e segunda construções de ADN da invenção, ou um primeiro vetor que codifica o referido primeiro constructo de ADN e um segundo vetor que codifica para a referida segunda construção de ADN.

A presente invenção ainda proporciona adicionalmente uma célula hospedeira compreendendo a referida primeira e segunda construções de ADN de a invenção, ou uma célula hospedeira compreendendo o referido vetor ou vetores da invenção, bem como um método de fazer o quimérico proteína da invenção, em que o método compreende a cultura de uma célula hospedeira da invenção.

Além disso, a presente invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo a proteína quimérica da invenção e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Ainda adicionalmente, o presente invento proporciona uma proteína quimérica possuindo uma porção monomérica e dimérica uma porção, em que a porção dimérica compreende duas regiões constantes de imunoglobulina ou suas porções, cada uma das quais é um recetor Fc neonatal (FcRn) parceiro de ligação, e a porção monomérica compreende um fator de coagulação, que está ligada a uma das duas regiões constantes de imunoglobulinas ou suas porções.

Outros objetivos e vantagens da invenção serão apresentados em parte na descrição que se segue, e em parte serão óbvios a partir da descrição, ou podem ser aprendidos pela prática da invenção. Os objetos e vantagens da invenção serão realizados e atingidos por meio dos elementos e combinações particularmente apontados nas reivindicações anexas.

É para ser entendido que tanto a descrição geral anterior como a descrição detalhada que se segue são exemplares e apenas explicativas e não são restritivas da invenção, tal como reivindicado.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um diagrama que mostra a via extrínseca e intrínseca da cascata de coagulação.

A Figura 2 é um diagrama das formas ativas e inativas do fator VIIa-Fc.

A Figura 3A é a sequência de aminoácidos de uma proteína quimérica, que compreende o fator Vila e um fragmento Fc de uma imunoglobulina (SEQ ID NO: 1).

A Figura 3B é a sequência de aminoácidos de um fragmento Fc de uma imunoglobulina (SEQ ID NO: 2).

A Figura 3C é a sequência de ácido nucleico de um fragmento Fc de uma imunoglobulina (SEQ ID NO: 3).

A Figura 3D é a sequência de ácido nucleico de uma proteína quimérica que compreende fator Vila e um fragmento Fc de uma imunoglobulina (SEQ ID NO: 4).

A Figura 4 é um diagrama de resultados de um ensaio STA-CLOT mostrando que o fator VIIa-Fc tem uma atividade significativa de coagulação.

A Figura 5 é um diagrama mostrando a ligação do fator VIIa-Fc ao recetor Fc humano solúvel neonatal (shFcRn).

A Figura 6 demonstra os níveis plasmáticos com o tempo de administração oral do fator VIIa-Fc em ratos recém-nascidos.

A Figura 7 compara a absorção oral em ratos recém-nascidos do fator Vila- Fc monómero/dímero híbrido composto por duas cadeias polipeptídicas, cada cadeia, compreendendo pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e onde o fator VII está ligado a apenas uma das duas cadeias versus homodímeros compreendendo duas cadeias polipeptídicas em que ambas as cadeias compreendem pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e ambas as correntes também incluem o fator VII.

A Figura 8A mostra os níveis plasmáticos com o tempo de fator VIIa-Fc administrado por via intravenosa em porcos chineses, onde o fator VIIa-FC é um monómero/dímero híbrido composto por duas cadeias polipeptídicas, cada cadeia, compreendendo pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e onde o fator VII está ligado a apenas uma das duas cadeias.

A Figura 8B mostra a atividade ao longo do tempo de coagulação do fator VIIa-Fc administrado por via intravenosa em porcos chineses onde o fator VIIa-FC é um monómero/dímero híbrido composto por duas cadeias polipeptídicas, cada cadeia compreendendo, pelo menos, uma porção de uma região constante de imunoglobulina e onde o fator VII é relacionado apenas com uma das duas cadeias.

A Figura 9A é a sequência de aminoácidos da proteína quimérica Fator IX-Fc. Incluído na sequência é o peptídeo sinal (sublinhado) que é clivado pela célula e o propéptido (negrito) que é reconhecido pela vitamina K- dependente γ carboxilase que modifica o Fator IX para atingir plena atividade. A sequência é posteriormente clivada por PACE para render Fator IX-Fc.

A Figura 9B é a sequência do ácido nucleico da proteína quimérica Fator IX-Fc. Incluído na sequência é o peptídeo sinal (sublinhado) e o pro-peptídeo (negrito), que é reconhecido pela vitamina K- dependente γ carboxilase que modifica o Fator IX para atingir plena atividade. Sequência traduzida é subsequentemente clivada por PACE para render Fator de madura IX-Fc.

SUMÁRIO DAS SEQUÊNCIAS

Seq ID N°	Figura	Descrição
1	3A	sequência de aminoácidos de uma proteína quimérica que compreende o fator Vila e um fragmento Fc de IgG
2	3B	sequência de aminoácidos de um fragmento Fc de IgG
3	3C	sequência de ácido nucleico correspondente à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2
4	3D	sequência de ácido nucleico correspondente à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1

DESCRIÇÃO DE FORMAS DE REALIZAÇÃO

A. Definições

Etiqueta de Afinidade, como usado aqui, significa uma molécula ligada a uma segunda molécula de interesse, capaz de interagir com um parceiro específico obrigatório com a finalidade de isolar e identificar a dita segunda molécula de interesse.

Análogos a, ou de proteínas ou peptídeos ou substancialmente idênticos à proteína quimérica da invenção, tal como utilizado aqui, significa que uma sequência relevante de aminoácidos de uma proteína ou um peptídeo é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a uma determinada sequência. A título de exemplo, estas sequências podem ser variantes derivadas de várias espécies, ou podem ser derivadas da sequência dada por truncamento, exclusão, substituição ou adição de aminoácidos. A percentagem de identidade entre as duas sequências de aminoácidos é determinada por algoritmos de alinhamento padrão, tais como, por exemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST) descrito em Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol.,

215:403-410, o algoritmo de Needleman et al. (1970) J. Mol. Bio., 48:444-453; o algoritmo de Meyers et al. (1998) Comput. Appl. Biosci., 4:11-17; ou Tatusova et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett., 174:247-250, etc. Tais algoritmos são incorporados aos programas BLASTN, BLASTP e "Sequências BLAST 2" (ver [wt/w. ncbi . nlm. nih. gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) Ao utilizar esses programas, os parâmetros padrão podem ser utilizados. Por exemplo, para sequências de nucleotídeos as seguintes configurações podem ser usadas para "Sequências BLAST 2": programa BLASTN, a recompensa para o jogo 2, penalidade por incompatibilidade -2, penalidades de espaço aberto e extensão 5 e 2, respetivamente, espaço de x_queda 50, esperar 10, tamanho de palavra 11, filtro ON. Para sequências de aminoácidos as seguintes configurações podem ser usadas para "Sequências BLAST 2": programa BLASTP, matriz BLOSUM62, penalidades de espaço aberto e extensão 11 e 1, respetivamente, espaço de x_queda 50, esperar 10, tamanho de palavra 3, filtro ON.

Biodisponibilidade, como usado aqui, significa a extensão e a taxa na qual uma substância é absorvida num sistema vivo ou seja disponibilizada no local da atividade fisiológica.

A proteína quimérica, como utilizada aqui, refere-se a qualquer proteína composta de uma primeira sequência de aminoácido derivado de uma primeira fonte, ligada, covalente ou não covalente para uma segunda sequência de aminoácido derivada de uma segunda fonte, em que a primeira e a segunda fonte não são as mesmas. Uma primeira fonte e uma segunda fonte que não são as mesmas podem incluir duas entidades biológicas diferentes, ou duas proteínas diferentes da mesma entidade biológica, ou uma entidade biológica e uma entidade não-biológica. A proteína quimérica pode incluir, por exemplo, uma proteína derivada de pelo menos 2 fontes

biológicas diferentes. Uma fonte biológica pode incluir qualquer ácido nucleico produzido não-sinteticamente ou de sequência de aminoácido (por exemplo, uma sequência genômica ou de cADN, um vetor plasmídeo ou virai, um vírion nativo ou um mutante ou análogo, como descrito em alguma das situações acima). Uma fonte sintética pode incluir uma proteína ou uma sequência de ácido nucleico produzido quimicamente e não por um sistema biológico (por ex. síntese em fase sólida de sequências de aminoácidos). A proteína quimérica pode também incluir uma proteína derivada de pelo menos 2 fontes sintéticas diferentes ou proteínas derivadas de pelo menos uma fonte biológica e pelo menos uma fonte sintética.

Fator de coagulação, tal como utilizado aqui, significa qualquer molécula, que ocorre naturalmente ou produzida de forma recombinante, que impede ou diminui a duração de um episódio de sangramento num sujeito com um distúrbio hemostático como aqui descrito.

Atividade de coagulação, como usado aqui, significa a possibilidade de participar numa cascata de reações bioquímicas que culmina na formação de um coágulo de fibrina e/ou reduz a gravidade, da duração ou da frequência de episódios de hemorragia ou sangramento.

Construção de ADN, como usado aqui, significa que uma molécula de ADN, ou um clone de uma molécula, única ou dupla, que tenha sido modificada através da intervenção humana para conter segmentos de ADN combinado de forma que, como um todo, não exista na natureza. As construções de ADN contêm a informação necessária para direcionar a expressão de polipeptídeos de interesse. As construções de ADN podem incluir promotores, melhoradores e terminadores da transcrição. As construções de ADN contendo as informações

necessárias para orientar a secreção de um polipeptídeo também irão conter pelo menos uma sequência de sinais secretores.

Um fragmento, tal como aqui utilizado, refere-se a um péptido ou polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos de pelo menos 2 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 5 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 10 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 15 contíguos resíduos de aminoácidos, de pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 25 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 40 aminoácidos contíguos adicionar resíduos, de pelo menos 50 resíduos de aminoácidos contíguos, de pelo menos 100 aminoácidos contíguos adicionar resíduos, ou de, pelo menos, 200 resíduos de aminoácidos contíguos adicionar ou qualquer deleção ou truncagem de uma proteína.

Hemostasia, como usado aqui, significa a paralisação do sangramento ou hemorragia, ou a interrupção do fluxo sanguíneo através de um vaso sanguíneo ou parte do corpo.

Distúrbio hemostático, como usado aqui, significa uma condição herdada geneticamente ou adquirida caracterizada por uma tendência à hemorragia, tanto espontaneamente ou como resultado de um trauma, devido a uma diminuição da capacidade ou incapacidade para formar um coágulo de fibrina.

Vinculadas, como utilizado aqui, refere-se a uma primeira sequência de ácido nucleico covalentemente unido a uma segunda sequência de ácido nucleico. A primeira sequência de ácido nucleico pode ser diretamente ligada ou justaposta à segunda sequência de ácido nucleico ou, alternativamente, uma sequência de intervenção pode juntar-se covalentemente

à primeira sequência para a segunda sequência. Ligados, como utilizado aqui, também pode referir-se a uma primeira sequência de aminoácidos covalentemente unida a uma segunda sequência de aminoácidos. Vinculado também pode referir-se a uma primeira sequência de aminoácidos não-covalentemente ligada a uma segunda sequência de aminoácidos. Ligado, como utilizado aqui também pode referir-se a uma primeira sequência de aminoácidos covalentemente ligada a uma sequência de ácido nucleico ou a uma pequena molécula orgânica ou inorgânica.

Operativamente ligado, como usado aqui, significa uma primeira sequência de ácido nucleico ligado a uma segunda sequência de ácido nucleico de tal modo que ambas as sequências são capazes de ser expressas como um polipeptídeo biologicamente ativo.

Pequena molécula inorgânica, como utilizado aqui, significa uma molécula não contendo átomos de carbono e não sendo maior que 50 kD.

Pequena molécula orgânica, como usado aqui, significa uma molécula que contenha pelo menos um átomo de carbono e não seja maior que 50 kD.

Alta severidade, como utilizado aqui, inclui condições facilmente determinadas pelo perito, baseadas, por exemplo, no comprimento do ADN. Geralmente, essas condições são definidas como condições de hibridização, como referido acima, e com lavagem a cerca de 68°C, 0,2 X SSC, 0,1% SDS. O perito irá reconhecer que a temperatura e a concentração de sal da solução de lavagem e podem ser ajustadas como necessário de acordo com fatores como o comprimento da sonda.

Severidade moderada, como utilizado aqui, inclui condições que podem ser facilmente determinadas pelos peritos, baseadas, por exemplo, no comprimento do ADN. As condições básicas são estabelecidas por Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed., Vol. 1, pp. 1: 101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). E incluem o uso de uma solução de pré-lavagem dos filtros de nitrocelulose 5X SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), as condições de hibridização de 50%, formamida, 6X SSC a 42°C (ou outra solução de hibridação similar, como a solução de Stark, em formamida 50% a 42°C), e as condições de lavagem a 60 °C, 0.5x SSC, 0,1% SDS.

Polipeptídicos, como utilizado aqui, refere-se a um polímero de aminoácidos e não se refere a um período específico do produto, assim, peptídeos, oligopeptídeos e proteínas estão incluídos na definição de polipeptídeo. Este termo não exclui modificações pós-expressão do polipeptídeo, por exemplo, glicosilação, acetilação, fosforilação, peguilação, adição de uma molécula de lipídios, ou a adição de uma molécula orgânica ou inorgânica. Incluídas na definição, são, por exemplo, os polipeptídeos contendo um ou mais aminoácidos análogos (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais) e polipeptídeos com ligações substituídas, bem como outras modificações conhecidas na técnica, tanto ocorrendo de forma natural como não natural.

Tratar, tratamento, tratando, como usado aqui, significa qualquer dos seguintes elementos: a redução da gravidade de um distúrbio hemostático; a profilaxia de um ou mais sintomas associados a um distúrbio hemostático, por exemplo, um episódio de sangramento; a redução na duração de um curso da doença de um distúrbio hemostático; a melhoria de um ou mais sintomas associados a um distúrbio hemostático; a redução da

duração de um episódio de sangramento associado a um distúrbio hemostático; a redução do título de um anticorpo contra um anticorpo inibidor do fator de coagulação; a prestação de efeitos benéficos para um sujeito com um distúrbio hemostático, sem necessariamente a cura da desordem hemostática.

B. Terapêuticas Melhoradas para Transtornos Hemostáticos

A presente divulgação refere-se geralmente a uma melhor terapêutica para os distúrbios hemostáticos. A invenção, portanto, refere-se a uma proteína quimérica, compreendendo pelo menos um fator de coagulação, tal como descrito aqui e pelo menos uma porção de uma região constante da imunoglobulina.

As proteínas quiméricas da invenção têm maior estabilidade e outras propriedades melhoradas quando comparadas aos agentes terapêuticos conhecidos com atividade de coagulação. Elas também podem ser administradas por via parentérica ou não invasiva. Assim, a invenção prevê métodos melhorados para a administração de agentes terapêuticos com atividade de coagulação. Embora atualmente os fatores de coagulação sejam geralmente administrados por via subcutânea, intramuscular ou endovenosa, as proteínas quiméricas da invenção podem ser administradas utilizando meios menos invasivos, como a administração oral, a administração nasal, ou a administração pulmonar. Numa forma de realização específica, a proteína quimérica da invenção é útil no tratamento profilático de distúrbios hemostáticos.

A presente divulgação, incluindo a presente invenção também se refere geralmente a métodos melhorados de fazer terapêutica de fatores de coagulação. A invenção refere-se

a métodos recombinantes de produção de fatores terapêuticos de coagulação com expressão aumentada e a produtividade melhorada. A invenção, portanto, diz respeito aos métodos de produção de proteínas quiméricas, compreendendo pelo menos um fator de coagulação e pelo menos uma parte da região constante de imunoglobulina por transferência de uma célula com uma construção de ADN, a dita construção compreendendo uma sequência de ADN codificando pelo menos um fator de coagulação e uma sequência de ADN de codificação, de pelo menos, uma parte da região constante de imunoglobulina; cultivar as ditas células em condições tais que a proteína quimérica é expressa pela dita célula e isolar a dita proteína quimérica.

C. Proteínas Quiméricas

A presente divulgação, incluindo a presente invenção refere-se em geral às proteínas quiméricas em geral compreendendo pelo menos um fator de coagulação, tal como descrito acima, pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, e, opcionalmente, um ligador. Os fatores de coagulação do sangue podem estar ligados covalentemente, ou não-covalentemente com a porção de uma região constante da imunoglobulina. A porção de uma região constante de imunoglobulina terá tanto um N, ou um amino-terminal, e um C, ou terminal carboxi. Numa forma de realização, a proteína quimérica da invenção pode ter um fator de coagulação ligado ao terminal N da porção de uma região constante da imunoglobulina.

A proteína quimérica pode opcionalmente incluir pelo menos um ligador, assim, o fator de coagulação não tem de estar diretamente ligado à porção de uma região constante da imunoglobulina. O ligador pode estar relacionado com o

terminal N da porção de uma região constante de imunoglobulina, ou o terminal C de uma porção de uma região constante da imunoglobulina. O ligador pode estar relacionado com o terminal N do fator de coagulação.

A invenção, portanto, refere-se a uma proteína quimérica, composta de pelo menos um fator de coagulação, tal como descrito aqui (X), opcionalmente, um ligador (L), e pelo menos uma porção da região constante de imunoglobulina (F). Numa forma de realização, a invenção está relacionada a uma proteína quimérica, compreendida na fórmula X-La-F

onde X é ligado ao seu terminal C do terminal N de L, e L está ligado ao seu terminal C do terminal N de F e em que é um número inteiro ou zero. Quando um é zero X está diretamente ligado ao seu terminal C da terminal N de F. Por um exemplo, não limitativo, pode ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 ou 20.

Numa forma de realização, a invenção está relacionada a uma proteína quimérica, que compreende a sequência de aminoácidos da Figura 3A (SEQ ID NO: 1).

A proteína quimérica da invenção inclui monómeros, dímeros, bem como multímeros de ordem superior. Numa forma de realização, a proteína quimérica é um monómero que compreende um fator de coagulação e uma porção de uma região constante da imunoglobulina. Em outra forma de realização, a proteína quimérica é um dímero composto por dois fatores de coagulação e duas porções de uma imunoglobulina. Numa forma de realização, os dois fatores de coagulação são os mesmos. Numa forma de realização, os dois fatores de coagulação são diferentes. Numa forma de realização, as duas porções de uma

imunoglobulina são as mesmas. Numa forma de realização, as duas porções de uma imunoglobulina são diferentes. Em outra forma de realização, a proteína quimérica é um monómero/dímero híbrido onde a proteína quimérica, tem um aspecto dimérico em que é composta de pelo menos uma porção de dois polipeptídeos de região constante de imunoglobulina e um aspecto monomérico na medida em que é composta por apenas um fator coagulação ligado a um das duas imunoglobulinas. A invenção, portanto, refere-se a uma proteína quimérica, que compreende uma primeira cadeia e uma segunda cadeia, onde a dita primeira cadeia compreende pelo menos uma porção de uma região constante da imunoglobulina ligada a um fator de coagulação e a dita segunda cadeia compreende pelo menos uma porção da região constante da imunoglobulina sem um fator de coagulação a ela ligada.

Essas proteínas quiméricas podem ser descritas usando as fórmulas estabelecidas na Tabela 1, onde I, L e F são conforme descrito acima, e onde (') indica uma molécula diferente do que sem (') e onde (:) indica uma ligação não peptídica

TABELA 1

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

L-F:F-X

X-F:F-L

O perito vai entender que são possíveis combinações adicionais, incluindo o uso de ligadores adicionais.

1. Variantes de Proteínas Quiméricas

Derivados e análogos das proteínas quiméricas da invenção, anticorpos contra as proteínas quiméricas da invenção e anticorpos contra parceiros de ligação das proteínas quiméricas da invenção são todos contemplados, e pode ser feitos alterando as suas sequências de aminoácidos através de substituições, acréscimos, e/ou supressões/truncamentos ou introduzindo modificações químicas que resultam em moléculas funcionalmente equivalentes. Será entendido por uma das competências normais da técnica que certos aminoácidos numa sequência de qualquer proteína podem ser substituídos por outros aminoácidos sem afetar negativamente a atividade da proteína.

Várias mudanças podem ser feitas nas sequências de aminoácidos das proteínas quiméricas da invenção ou nas sequências de ADN de codificação, portanto, sem perda significativa da sua atividade biológica, função ou utilidade. Derivados, análogos, ou mutantes resultantes de tais mudanças e do uso de derivativos estão no âmbito da presente invenção. Numa forma de realização específica, o derivativo é funcionalmente ativo, i. e., capaz de exibir uma ou mais atividades relacionadas com as proteínas quiméricas da invenção, por exemplo, a formação de coágulos e ativação de um fator de coagulação. A atividade pode ser medida por testes conhecidos na técnica, por exemplo., ensaio de StaClot FVlla-RTF (Johannessen et al. 2000, Blood

Coagulation and Fibrinolysis 11: S159); tempo de protrombina (ensaio PT) ou um ensaio APTT para o fator IX.

Substitutos para um aminoácido na sequência podem ser selecionados a partir de outros membros da classe a que pertence o aminoácido (ver Tabela 2). Além disso, vários aminoácidos são geralmente substituídos por aminoácidos neutros, por exemplo, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, tritofano e metionina (ver, por exemplo, MacLennan et al. (1998) *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67; Sasaki et al. (1998) *Adv. Biophys.* 35:1-24).

TABELA 2

Resíduos originais	Exemplos de substituições	Substituições Típicas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1,4- Diamino-butírico Acid, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr

Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	lie, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

2. Fatores de coagulação

As proteínas quiméricas desta invenção incluem pelo menos um fator de coagulação. O fator de coagulação pode incluir qualquer um dos fatores listados abaixo que tenham atividade de coagulação ou ativem uma molécula com atividade de coagulação. O fator de coagulação pode compreender um polipeptideo, uma pequena molécula orgânica, ou uma pequena molécula inorgânica. O fator de coagulação pode ser um fator de coagulação transformado desde que mantenha pelo menos uma atividade de coagulação. O fator de coagulação é o fator VIII, incluindo o domínio B excluído do fator VIII. Fator IX (Patente US 4,994,371), fator XI, fator XII, fibrinogénio, protrombina, fator V, fator VII, fator X, ou fator XIII. Numa forma de realização, o fator de coagulação é o fator VII ou o fator Vila. Em outra forma de realização, o fator de coagulação é uma mutação do fator VII ou Vila (ver, por exemplo, Persson, et al. 2001, Proc. Nat. Acad. Sei. USA. 98:13583; Pedido de Patente US nº de série 10/109498). O fator de coagulação pode ser um fator que participa na via extrínseca. O fator de coagulação pode ser um fator que participa na via intrínseca.

Alternativamente, o fator de coagulação pode ser um fator que participa de ambas as vias extrínseca e intrínseca. O fator de coagulação, tal como definido acima pode ser um fator de coagulação do sangue humano ou um fator de coagulação não-humano, por exemplo, derivado de um primata não-humano, um porco, ou qualquer outro mamífero. O fator de coagulação pode ser um fator de coagulação quimérico, por

exemplo, o fator de coagulação pode incluir uma parcela do fator de coagulação humano e uma porção de um suíno, ou qualquer fator de coagulação não-humano ou uma parte do primeiro fator de coagulação não-humano e uma porção de um segundo fator de coagulação não-humano.

O fator de coagulação pode ser um fator de coagulação ativado. Alternativamente, o fator de coagulação pode ser uma forma inativa do fator de coagulação, por exemplo, um zimogénio. O fator de coagulação inativo pode sofrer uma ativação subsequente ao estar ligado a pelo menos uma porção de uma região constante da imunoglobulina. O fator de coagulação inativo pode ser ativado após a administração a um sujeito. Alternativamente, o fator de coagulação inativo pode ser ativado antes da administração.

3. Imunoglobulinas

As proteínas quiméricas desta invenção incluem pelo menos uma porção de uma região constante da imunoglobulina. As imunoglobulinas são formadas por quatro cadeias de proteínas que associam covalentemente duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Cada cadeia é ainda composta por uma região variável e uma região constante. Dependendo do isótopo de imunoglobulinas, a região constante da cadeia pesada é composta de 3 ou 4 domínios de região constante (por exemplo, CH1, CH2, CH3, CH4). Alguns isótopos também podem incluir uma região de articulação.

A porção de uma região constante da imunoglobulina pode ser uma porção de uma região constante da imunoglobulina obtida a partir de qualquer mamífero. A porção de uma região constante da imunoglobulina pode incluir, mas não está limitado a, uma parte da região constante da imunoglobulina

humana, uma região constante da imunoglobulina de um primata não-humano, uma região constante da imunoglobulina bovina, uma região constante da imunoglobulina suína, uma região constante da imunoglobulina murina, uma região constante da imunoglobulina ovina na uma região constante da imunoglobulina de rato.

A porção de uma região constante da imunoglobulina pode incluir toda a cadeia pesada de uma região constante, ou um fragmento ou analógico. A região constante da cadeia pesada pode incluir um domínio CH1, um domínio CH2, um domínio CH3, e/ou uma região de articulação. A região constante da cadeia pesada pode incluir um domínio CH1, um domínio CH2, um domínio CH3, e/ou um domínio CH4.

A imunoglobulina pode ser produzida de forma recombinante ou sintética. A imunoglobulina pode ser isolada de uma biblioteca de cADN. A imunoglobulina pode ser isolada de uma biblioteca de bacteriófagos (ver McCafferty et al. 1990, Nature 348:552). A imunoglobulina pode ser obtida através de embaralhar as sequências de genes conhecidos (Mark et al. 1992, Bio / Technol. 10:779). A imunoglobulina pode ser isolada por recombinação in vivo (Waterhouse et al. 1993, Nucl. Res Acid. 21:2265). A imunoglobulina pode ser uma imunoglobulina humanizada (Jones et al. 1986, Nature 332:323).

A porção de uma região constante da imunoglobulina pode incluir uma porção de um IgG, um IgA, um IgM, um IgD, um IgE. Numa forma de realização, a imunoglobulina é um IgG. Em outra forma de realização, a imunoglobulina é IgG1. Em, ainda, outra forma de realização, a imunoglobulina é IgG2.

A porção de uma região constante da imunoglobulina pode incluir um fragmento Fc. Um fragmento Fc pode ser composto de CH2 e domínios CH3 de uma imunoglobulina e região da articulação da imunoglobulina. O fragmento Fc pode ser o fragmento Fc de IgG1, um de IgG2, um de IgG3 ou um de IgG4. Numa forma de realização, a imunoglobulina é um fragmento Fc de um IgG2. Em outra forma de realização, a parcela de uma região constante de imunoglobulina é composta de uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (Figura 3B) ou um análogo da mesma. Em outra forma de realização, a imunoglobulina é composta de uma proteína, ou um seu fragmento, codificada pela sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3 (Figura 3C).

A porção de uma região constante da imunoglobulina pode incluir uma variante Fc. A variante de Fc refere-se a uma molécula ou sequência que é modificada a partir de um Fc nativo, mas compreendendo ainda um sítio de ligação para o recetor de salvamento, FcRn (WO 97/34631). Nativo refere-se a um Fc que não tenha sido modificado por um ser humano. A WO96/32478 descreve exemplos de variantes Fc, bem como a interação com o recetor de resgate. Assim, o termo "variante Fc" compreende uma molécula ou sequência que é humanizada de um Fc não-humano nativo. Além disso, um nativo Fc compreende sítios que podem ser removidos porque eles fornecem características estruturais ou de atividade biológica que não são necessários para as moléculas de fusão da presente invenção. Assim, a variante Fc compreende uma molécula ou sequência que carece de um ou mais sítios Fc nativos ou resíduos que afetam ou são envolvidos em (1) formação da ligação dissulfeto, (2) incompatibilidade com uma célula hospedeira selecionada (3) heterogeneidade de N-terminal à expressão numa célula hospedeira selecionada, (4) glicosilação (5), interação com o complemento (6), ligação

a um recetor Fc que não seja um recetor de resgate, ou (7) citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC).

Em outra forma de realização, a parcela de uma região constante de imunoglobulina é um recetor Fc neonatal (FcRn) parceiro de ligação. Um parceiro de ligação FcRn é qualquer molécula que pode ser especificamente vinculada ao recetor FcRn com conseqüente transporte ativo pelo recetor FcRn do parceiro vinculativo FcRn. O recetor FcRn foi isolado de várias espécies de mamíferos, incluindo seres humanos. São conhecidas as sequências do FcRn humano, do FcRn ratas e de ratos (Story et al. 1994, J. Exp. Med. 180:2377). O recetor FcRn liga-se com o IgG (mas não a outras classes de imunoglobulinas como IgA, IgM, IgD, e IgE), e pH relativamente baixo, transporta de forma ativa o IgG transcelular na direção da luz para serosa e, em seguida, libera os IgG em níveis relativamente elevados de pH encontrados nos líquidos intersticiais. É expressa no tecido epitelial dos adultos (Patente US 6,030,613 e 6,086,875) incluindo os do pulmão e epitélio intestinal (Israel et al. 1997, Immunology 92:69) epitélio renal tubular proximal (Kobayashi et al. 2002, Am. J. Physiol. 282:F358) bem como o epitélio nasal, superfícies vaginais e superfícies da árvore biliar.

Parceiros vinculativos de FcRn da presente invenção compreendem uma molécula que pode ser especificamente vinculada ao recetor FcRn incluindo todo a IgG, o fragmento Fc da IgG, e outros fragmentos que incluem a região completa de ligação do recetor FcRn. A região da porção Fc da IgG que se liga ao recetor FcRn foi descrita com base em cristalografia de raios X (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379). A área de contato maior da FC com o FcRn está perto da junção dos domínios CH2 e CH3. Os contatos Fc-FcRn estão

todos dentro de uma cadeia pesada única de Ig. Os parceiros obrigatórios de FcRn incluem a totalidade de IgG, os fragmento Fc da IgG, e outros fragmentos de anticorpos IgG, que incluem a região completa de ligação de FcRn. Os sítios principais de contato incluem resíduos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 e 314 do domínio CH2 e resíduos de aminoácidos 385-387, 428 e 433-436 do domínio CH3. As remissões para a numeração de aminoácidos das imunoglobulinas ou fragmentos de imunoglobulinas, ou regiões, são todos baseados em Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD.

A região Fc de IgG pode ser modificada de acordo com procedimentos bem conhecidos como mutagênese dirigida e similares para acesso a IgG modificada ou fragmentos Fc ou partes deles, que será vinculada por FcRn. Tais modificações incluem alterações remotas a partir do contato com sítios FcRn bem como alterações nos locais de contato que preservam ou mesmo aumentam a ligação para o FcRn. Por exemplo, os seguintes resíduos de aminoácidos únicos em IgG1 humana Fc (Fc γ 1) podem ser substituídos sem perda significativa de afinidade de ligação de Fc para FcRn:

P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A,
T260A, D265A, S267A, H268A, E260A, D270A, E272A, L274A,
N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A,
K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A,
Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A,
N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q,
P329A, A330Q, A330S, P331A, P331S, E333A, K334A, T335A,
S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A.
E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A,
A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A,
N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A,

R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A, e K447A, onde por exemplo P238A representa prolina de tipo selvagem substituída por alanina na posição número 238. Além da alanina outros aminoácidos podem ser substituídos para os aminoácidos de tipo selvagem nas posições acima referidas. As mutações podem ser apresentadas individualmente em Fc dando origem a mais de cem parceiros de ligação FcRn distinta do Fc nativo. Além disso, as combinações de duas, três ou mais destas mutações individuais podem ser introduzidos em conjunto, dando origem a centenas de outros parceiros vinculativos de FcRn.

Algumas das mutações acima podem conferir a nova funcionalidade em cima do parceiro vinculativo de FcRn. Por exemplo, uma conceção incorpora N297A, removendo um sítio de N-glicosilação altamente conservado. O efeito desta mutação é reduzir a imunogenicidade, melhorando assim a circulação de meia vida do parceiro FcRn vinculativo, e para tornar o parceiro vinculativo de FcRn incapaz de ligação para FcyRI, FcyRIIA, FcyRIIB e FcyRIIIA, sem comprometer a afinidade para FcRn (Routledge et al. 1995, *Transplantation* 60:847; Friend et al. 1999, *Transplantation* 68:1632; Shields et al. 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591). Além disso, pelo menos três recetores Fc gamma humanos parecem reconhecer um sítio de ligação de IgG na região da articulação inferior, geralmente aminoácidos 234-237. Portanto, outro exemplo de novas funcionalidades e potencial imunogenicidade diminuída podem surgir de mutações desta região, como por exemplo, substituindo os aminoácidos 233-236 da IgG1 humana "ELLG" para a sequência correspondente de IgG2 "PVA" (com uma eliminação de aminoácidos). Tem sido demonstrado que FcyRI, FcyRH e FcyRIU/ que mediam funções efetoras diferentes não vinculadas a IgG1 quando tais mutações foram introduzidas (Ward e Ghetie 1995, *Therapeutic Immunology* 2:77 e Armour et

al. 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613). Como mais um exemplo de novas funcionalidades decorrentes de mutações descritas acima a afinidade para FcRn pode ser aumentada, além da do tipo selvagem em alguns casos. Esse aumento de afinidade pode refletir um aumento "na taxa", uma diminuição "fora" da taxa ou um aumento tanto "dentro" e uma diminuição "fora" da taxa. Acredita-se que as mutações conferem uma maior afinidade para FcRn incluindo T256A, T307A, E380A, e N434A (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591).

Num exemplo da presente divulgação, por exemplo numa forma de realização da presente invenção o parceiro de ligação FcRn é um polipeptídeo incluindo a sequência PKNSSMISNTP e, opcionalmente, incluindo ainda uma sequência selecionada de HQSLGTQ, HQNLSDGK, HQNISDGK, ou VISSLHGQ (Patente US 5,739,277).

Dois recetores FcRn podem vincular uma única molécula Fc. Os dados de cristalografia sugerem que cada molécula FcRn liga um polipeptídeo único do homodímero Fc. A ligação entre os parceiros vinculados de FcRn, por exemplo, um fragmento Fc de IgG, de um fator de coagulação, portanto, fornece uma maneira ou de entregar o fator de coagulação por via oral ou como um aerossol administrado por via nasal, através de uma via ocular ou através de uma via pulmonar.

O perito vai entender que porções de uma região constante da imunoglobulina para uso na proteína quimérica da invenção podem incluir os mutantes ou seus análogos, ou pode incluir as regiões constantes da imunoglobulina quimicamente modificadas ou fragmentos (peguilação, por exemplo) (ver, por exemplo, Aslam e Dent 1998, Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences Macmillan Reference, London). Num exemplo, um mutante pode contribuir

para assegurar uma ligação do parceiro FcRn vinculativo para o FcRn. Também contemplados para uso na proteína quimérica da invenção são peptídeos miméticos de pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, por exemplo, um peptídeo mimético de um fragmento Fc ou um peptídeo mimético de um parceiro vinculativo de FcRn. Numa forma de realização, o peptídeo mimético é identificado utilizando bacteriófagos (Ver, por exemplo, McCafferty et al. 1990, Nature 348:552, Kang et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363; EP 0 589877 B1).

4. Ligadores opcionais

A proteína quimérica da invenção pode, opcionalmente, compreender pelo menos uma molécula vinculada. Numa forma de realização, o ligador é composto de aminoácidos. O vinculador pode compreender aminoácidos 1-5, os aminoácidos 1-10, aminoácidos 1-20, os aminoácidos 10-50, aminoácidos 50-100 e os aminoácidos 100-200. O ligador pode compreender a sequência Gn. O ligador pode compreender a sequência (GGS)_n (SEQ ID NO. 5). Em cada caso, n pode ser um número inteiro tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Exemplos de ligadores incluem, mas não estão limitados a, GGG (SEQ ID NO. 6), SGGSGGS (SEQ ID NO.:7), GGSGSGGS (SEQ ID NO.:8), e GGSGSGGS (SEQ ID NO.: 9).

Numa forma de realização, o ligador não elimina a atividade coagulante do fator de coagulação. Opcionalmente, o ligador aumenta a atividade coagulante do fator de coagulação, por exemplo, diminuindo os efeitos do impedimento estérico e tornando o fator de coagulação mais acessível ao seu sítio alvo de ligação, por exemplo, outro fator na cascata de coagulação.

D. Construtores de ácido nucleico

A presente divulgação refere-se ainda à construção de um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica as proteínas quiméricas da invenção, compreendendo a dita sequência de ácido nucleico uma primeira sequência de codificação de ácido nucleico, por exemplo, pelo menos, um fator de coagulação, operativamente ligado a uma segunda sequência de codificação de ácido nucleico pelo menos uma porção de uma região constante da imunoglobulina. A sequência de ácido nucleico pode também incluir sequências complementares ou elementos conhecidos na técnica (por exemplo, promotores, intensificadores, sequências poli A, sequência de sinais). A sequência de ácido nucleico pode, opcionalmente, incluir uma sequência de codificação de um ligador colocado entre a sequência de ácido nucleico codificando pelo menos um fator de coagulação e a parte de uma imunoglobulina. A sequência de ácido nucleico pode, opcionalmente, incluir uma sequência de ligador colocado antes ou depois da sequência de ácido nucleico codificando pelo menos um fator de coagulação e a parte de uma imunoglobulina.

Num exemplo, o ácido nucleico construção é composto por ADN. Noutro exemplo, o constructo de ácido nucleico é composto de ARN. O constructo de ácido nucleico pode ser um vetor, por exemplo, um vetor virai ou um plasmídeo. Exemplos de vetores virais incluem, mas não estão limitados ao vetor do vírus adeno, um vetor do vírus adeno associado ou um vetor do vírus da leucemia murina. Exemplos de plasmídeos incluem mas não estão limitados a, por exemplo, pUC e pGEX.

Num exemplo, o constructo de ácido nucleico compreende a sequência de ácido nucleico da Figura 3D (SEQ ID NO: 4).

Devido à degeneração conhecida do código genético, onde mais de um códon pode codificar o mesmo aminoácido, uma sequência de ADN pode variar do que a mostrada em SEQ ID NOS: 3 ou 4 e ainda codifica um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2 ou 1, respetivamente. Essa variante de sequências de ADN pode resultar de mutações silenciosas (eg. ocorrem durante a amplificação por PCR), ou podem ser o produto de mutagénesse deliberada de uma sequência nativa. A invenção fornece, assim, sequências de ADN isoladas codificando polipeptídeos da invenção, selecionados a partir de: (a) de ADN compreendendo a sequência de nucleotídeos SEQ ID NO: 3 ou 4; (b) do ADN que codifica o polipeptídeo de SEQ ID NO: 1 ou 2; (c) ADN capaz de hibridização com ADN de um (a) ou (b) em condições de severidade moderada e que codifica os polipeptídeos da invenção, (d) ADN capaz de hibridização com ADN de um (a) ou (b) sob condições de exigência elevada e que codifica os polipeptídeos da invenção, e (e) de ADN que é degenerado, como resultado do código genético de um ADN definido no (a), (b), (c), ou (d), e que codificam polipeptídeos da invenção. Claro, polipeptídeos codificados por tais sequências de ADN são abrangidos pela presente divulgação.

Em outra forma de realização, as moléculas de ácido nucleico da invenção também incluem sequências de nucleótidos que são pelo menos 80% idênticos a uma sequência nativa. Também são contempladas conceções em que uma molécula de ácido nucleico compreende uma sequência que é pelo menos 90% idêntica, pelo menos 95% idêntica, pelo menos 98% idêntica, pelo menos 99% idêntica, ou pelo menos 99,9% idêntica a uma sequência nativa. A percentagem de identidade pode ser determinada por

inspeção visual e cálculo matemático. Alternativamente, a percentagem de identidade de duas sequências de ácido nucleico pode ser determinada pela comparação dos dados de sequência usando o programa de computador GAP, versão 6.0 descrito por Devereux et al. 1984, Nucl. Acids Res. 12:387, e disponível na University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). Os parâmetros padrão preferidos para o programa GAP incluem: (1) uma matriz de comparação unária (contendo um valor de 1 para identidades e 0 para não identidades) de nucleotídeos, e a matriz de comparação ponderada de Gribskov e Burgess 1986, Nucl. Acids Res. 14:6745, como descrito por Schwartz e Dayhoff, eds., 1979, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358; (2) uma penalização de 3,0 para cada lacuna e uma penalização de 0,10 adicionais para cada símbolo em cada lacuna, e (3) nenhuma penalidade para aberturas finais. Outros programas utilizados por um perito na técnica de comparação de sequência também podem ser usados.

E. Síntese de Proteínas Quiméricas

Proteínas quiméricas compreendendo pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e um fator de coagulação podem ser sintetizados usando técnicas bem conhecidas na técnica. Por exemplo, as proteínas quiméricas da invenção podem ser sintetizadas de forma recombinante em células (ver, por exemplo, Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. e Ausubel et al. 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates e Wiley Interscience, N.Y.).

Sequências de ADN codificando imunoglobulinas, ou fragmentos delas, ou fatores de coagulação, ou fragmentos destes, podem ser clonados a partir de uma variedade de bibliotecas genômicas ou de cADN conhecidas na técnica. As técnicas para isolar tais sequências de ADN usando sondas são métodos baseados em técnicas convencionais e são bem conhecidas por aqueles qualificados na técnica. Sondas para isolar tais sequências de ADN podem ser baseadas em sequências de ADN publicadas (ver, por exemplo, Hieter et al. 1980, Cell 22: 197-207). A reação em cadeia da polimerase (PCR) divulgada por Mullis et al. (Patente US 4,683,195) e Mullis (Patente US 4,683,202) pode ser usada. A escolha da biblioteca e a seleção de sondas para o isolamento de sequências de ADN, está dentro do nível de habilitações normais da técnica. Alternativamente, sequências de ADN de codificação de imunoglobulinas, ou fragmentos dela, ou fatores de coagulação podem ser obtidos a partir de vetores conhecidos na técnica para conter imunoglobulinas, ou fragmentos, ou fatores de coagulação.

Para a produção recombinante, uma sequência de nucleótidos que codifica a proteína quimérica é inserida num veículo de expressão apropriada, i.e., um vetor que contém os elementos necessários para a transcrição e tradução da sequência de codificação inserida, ou no caso de um vetor de ARN virai, os elementos necessários para a replicação e tradução. O ácido nucleico que codifica a proteína quimérica é inserido no vetor no quadro de leitura adequado.

Em certos exemplos, o ácido nucleico também pode codificar para um fator de coagulação propetideo que é modificado pela célula para produzir a proteína quimérica madura da invenção. Numa forma de realização específica o fator de coagulação propetideo é reconhecido por uma vitamina K-γ carboxilase

dependente que modifica o fator de coagulação propetideo para atingir plena atividade (por exemplo, o fator VII, fator IX, fator X, protrombina). Para produzir a proteína quimérica madura da invenção, a sequência de propetideo é clivada posteriormente por uma endoprotease, por exemplo, clivagem enzimática (PACE) de aminoácido básico pareado, ou qualquer membro da família PACE, tais como PCSK1-9, incluindo as versões truncadas, ou o seu equivalente Kex2 levedura de *S. cerevisiae* e versões truncadas de Kex2 (ver, por exemplo, Patentes US 5,077,204; 5,162,220; 5,234,830; 5,885,821; 6,329,176 (Kex2 1-675)).

O veículo de expressão é transferido para uma célula-alvo apropriada, que irá expressar a proteína, por exemplo, uma proteína quimérica. Técnicas de transfecção conhecidas na técnica incluem, mas não estão limitados a, precipitação de fosfato de cálcio (Wigler et al. 1978, *Cell* 14:725) e eletroporação (Neumann et al. 1982, *EMBO, J.* 1:841). Uma variedade de sistemas de vetor de expressão hospedeiro pode ser utilizada para expressar as proteínas quiméricas aqui descrita em células eucarióticas. Numa forma de realização, a célula eucariótica é uma célula animal, incluindo as células de mamíferos (por exemplo, células CHO, BHK, Cos, e HeLa). Quando a proteína quimérica é expressa numa célula eucariótica o ADN que codifica a proteína quimérica pode também codificar uma sequência de sinais que permitam a uma proteína quimérica ser segregada. Um perito do ramo vai entender que, embora a proteína seja traduzida a sequência sinal é clivada pela célula para formar a proteína quimérica madura. Várias sequências de sinais são conhecidas na técnica, por exemplo, a sequência sinal de fator VII nativo, sequência sinal de fator IX nativo e a sequência sinal de cadeia fraca do rato IgK. Em alternativa, onde uma sequência

de sinal não está incluída a proteína quimérica pode ser recuperado pela lise das células.

A proteína quimérica da invenção pode ser sintetizada num animal transgênico, como um roedor, cabra, ovelha, porco, ou vaca. O termo "animais transgênicos" refere-se a animais não-humanos que têm incorporado um gene exógeno no seu genoma. Uma vez que este gene está presente em tecidos de linhagem germinativa, ele é passado de pais para filhos. Genes exógenos são introduzidos em embriões unicelulares (Brinster et al. 1985, Proc. Natl. Acad. Sei. USA 82:4438). Métodos de produção de animais transgênicos são conhecidos na técnica, incluindo os transgênicos que produzem moléculas de imunoglobulina, (Wagner et al. 1981, Proc. Natl. Acad. Sei. 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, Theriogeneology 59:831; Roble et al. 2003, Theriogeneology 59:107; Malassagne et al. 2003, Xenotransplantation 10 (3):267).

Os vetores de expressão podem codificar para marcas que permitam a identificação fácil ou purificação da proteína recombinante produzida. Os exemplos incluem, mas não estão limitados a, vetor pUR278 (Ruther et al. 1983, EMBO J. 2:1791) em que a sequência codificada de proteína quimérica descrita aqui pode ser ligada no vetor no quadro com a região de codificação lac Z de modo que uma proteína híbrida seja produzida; vetores pGEX podem ser usados para expressar proteínas com uma marca de glutathione S-transferase (GST). Estas proteínas geralmente são solúveis e podem ser facilmente purificadas de células por adsorção de gotas de glutathione-agarose seguido pela eluição na presença da glutathione livre. Os vetores incluem sítios de clivagem (eg.

PreCission Protease™ (Pharmacia, Peapack, NJ)) para facilitar a remoção da marca após a purificação.

Para aumentar a eficiência da produção, o polinucleotídeo pode ser projetado para codificar várias unidades da proteína quimérica da invenção separadas por sítios de clivagem enzimática. O polipeptídeo resultante pode ser clivado (p.e., por tratamento com a enzima adequada) a fim de recuperar as unidades polipeptídicas. Isto pode aumentar o rendimento de polipeptídeos conduzidos por um único promotor. Quando usado em sistemas apropriados de expressão virai, a tradução de cada polipeptídeo codificado pelo mRNA é dirigido internamente na transcrição, por exemplo, por um sítio interno da entrada de ribossomo, IRES. Assim, os policistrónicos construtores dirigem a transcrição de um único policistrónico mRNA grande que, por sua vez, dirige a tradução de vários, polipeptídeos individuais. Esta abordagem elimina a produção e transformação enzimática de poliproteínas e pode aumentar significativamente a produção de um polipeptídeo conduzido por um único promotor.

Vetores usados na transformação geralmente contêm um marcador de seleção utilizado para identificar transformantes. Em sistemas bacterianos isso pode incluir um gene de resistência a antibióticos como a ampicilina, blastidina ou kanamicina. Marcadores seleccionáveis para uso em culturas de células de mamíferos incluem genes que conferem resistência às drogas, como a neomicina, higromicina e metotrexato. O marcador de selecção pode ser um marcador amplificável seleccionável. Um marcador amplificável seleccionável é o gene redutase (gene DHFR). Outro marcador amplificável é o cADN DHFRr (Simonsen e Levinson 1983, Proc. Natl. Acad. Sei. (USA) 80:2495). Marcadores seleccionáveis são revistos por Thilly (Mammalian

Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass.) e a escolha dos marcadores de selecção está bem dentro do nível de competências normais na técnica.

Marcadores seleccionáveis podem ser introduzidos na célula num plasmídeo separado ao mesmo tempo, com o gene de interesse, ou eles podem ser introduzidos no próprio plasmídeo. Se, no mesmo plasmídeo, o marcador seletivo e o gene de interesse podem estar sob o controle de diferentes promotores ou do mesmo promotor, produzindo o último arranjo uma mensagem dicistrónica. Construções deste tipo são conhecidas na técnica (por exemplo, Patente US 4,713,339).

Os elementos de expressão dos sistemas de expressão variam na sua força e especificidade. Dependendo do hospedeiro/sistema de vetor utilizado, algumas de um número adequado de transcrições e elementos de tradução, incluindo promotores constitutivos e induzidos, podem ser utilizados no vetor de expressão. Por exemplo, quando a clonagem é em sistemas bacterianos, promotores induzíveis tais como PL de um bacteriófago λ , *plac*, *trp*, *tac* (promotor híbrido *trp-lac*) e similares podem ser utilizadas; quando a clonagem é em sistemas de células de inseto, podem ser utilizados promotores, como o promotor de poliedro baculovírus; quando a clonagem é em sistemas de planta celular, podem ser utilizados promotores derivado do genoma de células vegetais (por ex. promotores de choque térmico; promotor para a subunidade menor da RUBISCO; promotor para a clorofila proteína de ligação a/b) ou podem ser utilizados promotores de vírus de plantas (p. ex. promotor 35S do ARN do CaMV; o promotor da proteína capsidial do TMV); quando a clonagem é em sistemas de células de mamíferos, podem ser utilizados os promotores derivados do genoma de células de mamíferos (por exemplo, promotor de metalotioneína) ou de vírus de mamíferos

(por exemplo, o promotor adenovírus tardio, o promotor do vírus vaccinia 7,5 K, o promotor CMV); ao gerar linhas de células que contêm várias cópias de produtos de expressão, baseados em SV40-, BPV- e EBV- em podem ser usados vetores com um marcador adequado selecionável.

Nos casos em que são usados vetores de expressão de plantas, a expressão de sequências de codificação linear ou formas não-ciclizadas das proteínas quiméricos da invenção podem ser movidas por qualquer de um número de promotores. Por exemplo, os promotores virais, como o ARN 35S e 19S promotores de ARN CaMV (Brisson et al. 1984, Nature 310:511-514), ou pode ser usado o promotor da proteína capsidial do TMV (Takamatsu et al. 1987, EMBO J. 6:307-311); podem ser utilizados, alternativamente, os promotores de plantas, como a subunidade menor da RUBISCO (Coruzzi et al. 1984, EMBO J. 3:1671-1680; Broglie et al. 1984, Science 224:838-843) ou podem ser utilizados promotores de choque térmico, por exemplo, soja hsp 17.5-E ou hsp 17.3-B (Gurley et al. 1986, Mol. Cell. Biol. 6:559-565). Estes construtores podem ser introduzidos nas células vegetais utilizando plasmídeos Ti e plasmídeos Ri, vetores de vírus de plantas, transformação direta do ADN, a microinjeção, eletroporação, etc. Para revisões destas técnicas ver, por exemplo, Weissbach & Weissbach 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Secção VIII, pp. 421-463; e Grierson & Corey 1988, Plant Molecular Biology, 2a ed., Blackie, Londres, Ch. 7-9).

Num sistema de expressão de insetos que podem ser utilizadas para produzir as proteínas quiméricas da invenção, os vírus nucleares polihidroses de *Autographa californica* (AcNPV) são usados como um vetor para expressar os genes estrangeiros. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. A

sequência de codificação pode ser clonada em regiões não-essenciais (por exemplo, o gene poliedro) do vírus e colocada sob controle de um promotor AcNPV (por exemplo, o promotor poliedro). A inserção bem-sucedida de uma sequência de codificação irá resultar na desativação do gene poliedro e produção de vírus recombinantes não ocluídas (ou seja, vírus a que falta o revestimento proteico codificado pelo gene do poliedro). Estes vírus recombinantes são então utilizados para infectar células de *Spodoptera frugiperda* em que o gene inserido é expresso, (ver, por exemplo, Smith et al. 1983, *J. Virol.* 46:584; Patente US 4,215,051). Outros exemplos deste sistema de expressão podem ser encontrados em Ausubel et al. ed. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Greene Publish. Assoe. & Wiley Interscience.

Em células hospedeiras de mamíferos, pode ser usado um número de sistemas de expressão baseados virais. Nos casos em que um adenovírus é usado como um vetor de expressão, uma sequência de codificação pode ser ligada a um complexo de controlo transcrição/tradução de adenovírus, por exemplo, o promotor tardio e a sequência líder tripartida. Esse gene quimérico pode então ser inserido no genoma do adenovírus por recombinação *in vitro* ou *in vivo*. Inserção numa região não essencial do genoma viral (por exemplo, região E1 ou E3) irá resultar num vírus recombinante que é viável e capaz de expressar um peptídeo polipeptídico em hospedeiros infectados (ver, por exemplo, Logan & Shenk 1984, *Proc. Natl. Acad. Sei. (USA)* 81:3655-3659). Alternativamente, podem ser utilizados promotores de vaccinia 7,5 K (ver, por exemplo, Mackett et al. 1982, *Proc. Natl. Acad. Sei. (USA)* 79:7415; Mackett et al. 1984, *J. Virol.* 49:857; Panicali et al. 1982, *Proc. Natl. Acad. Sei. (USA)* 79:4927).

Nos casos em que um adenovírus é usado como um vetor de expressão, uma sequência de codificação pode ser ligada a um complexo de controlo transcrição/tradução de adenovírus, por exemplo, o promotor tardio e a sequência líder tripartida. Esse gene quimérico pode então ser inserido no genoma do adenovírus por recombinação *in vitro* ou *in vivo*. Inserção numa região não essencial do genoma viral (por exemplo, região E1 ou E3) irá resultar num vírus recombinante que é viável e capaz de expressar um polipeptídeo em hospedeiros infectados (ver, por exemplo, Logan & Shenk 1984, Proc. Natl. Acad. Sei. (USA) 81:3655- 3659). Alternativamente, podem ser utilizados promotores de vaccinia 7,5 K (ver, por exemplo, Mackett et al. 1982, Proc. Natl. Acad. Sei. (USA) 79:7415; Mackett et al. 1984, J. Virol. 49:857-864; Panicali et al. 1982, Proc. Natl. Acad. Sei. (USA) 79:4927).

Células hospedeiras contendo construtores de ADN da proteína quimérica, são cultivadas num meio de crescimento adequado. Conforme utilizado aqui, o termo "meio de crescimento adequado", significa um meio que contém nutrientes necessários para o crescimento das células. Nutrientes necessários para o crescimento de células podem incluir uma fonte de carbono, uma fonte de azoto, aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais e fatores de crescimento. Numa forma de realização, os meios de comunicação contém vitamina K, que é necessária para uma carboxilase celular y para conferir a atividade de um fator de coagulação sanguínea recombinante produzida, por exemplo, o fator VII. Opcionalmente, o meio pode conter soro bovino ou soro fetal bovino. O crescimento médio em geral para selecionar as células contendo a construção de ADN, por exemplo, a seleção de drogas ou deficiência de um nutriente essencial, que é complementado por um marcador genético no constructo de ADN ou co-

transfetadas com o constructo de ADN. Culturas de células de mamíferos são geralmente cultivadas em soro comercialmente disponíveis, contendo um meio de soro ou soro-livre (por exemplo, MEM, DMEM). A seleção de um meio adequado para a linha de célula em particular é usada dentro do nível de habilidade conhecido na técnica.

A proteína quimérica recombinante produzida da invenção pode ser isolada do meio de cultura através de procedimentos bem estabelecidos na técnica (por exemplo, cromatografia de afinidade, cromatografia por exclusão de tamanho, cromatografia de troca iónica). A proteína quimérica da invenção pode ser isolada do meio de cultura por cromatografia em coluna, por exemplo, uma coluna de proteína A, ou por cromatografia de troca iónica. Quando uma coluna de proteína A ou uma coluna de troca iónica é usada para separar a proteína quimérica da invenção a separação cromatográfica pode contribuir para a ativação da proteína quimérica da invenção, por exemplo, convertendo fator VII em fator Vila. O meio de cultura para um adequado crescimento de células hospedeiras transformadas ou transfetadas é separado do material celular, e é demonstrada a presença de proteínas quiméricas. Um método de detetar as proteínas quiméricas, por exemplo, é pela ligação com as proteínas quiméricas ou porções de proteínas quiméricas com um anticorpo específico que reconhece a proteína quimérica da invenção (por exemplo, um anticorpo anti-Fc). Um anticorpo de proteína anti-quimérica pode ser um anticorpo monoclonal ou policlonal gerado contra a proteína quimérica em questão. Por exemplo, a proteína quimérica pode conter uma porção de uma região constante da imunoglobulina. Anticorpos reconhecendo a região constante das imunoglobulinas são conhecidos na técnica e estão disponíveis comercialmente. Um anticorpo pode ser usado para executar um ELISA ou um Western

Blot para detetar a presença da proteína quimérica da presente divulgação, por exemplo, a proteína quimérica da presente invenção.

F. Métodos de Utilização de Proteínas Quiméricas

As proteínas quiméricas da presente divulgação incluindo as proteínas quiméricas da presente invenção têm muitos usos, como será reconhecido por um técnico no assunto, incluindo, mas não limitado a, métodos de tratar um sujeito com um distúrbio hemostático e métodos de tratar um sujeito que precisa de um agente geral hemostático.

1. Métodos de Tratar um Sujeito com um distúrbio Hemoestática

A invenção refere-se a um método de tratar um sujeito com um distúrbio hemostático compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de pelo menos uma proteína quimérica, onde a proteína quimérica compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e pelo menos um fator de coagulação.

A proteína quimérica da invenção trata ou previne um distúrbio hemostático, promovendo a formação de um coágulo de fibrina. A proteína quimérica da invenção pode ativar qualquer membro de uma cascata de coagulação. Numa forma de realização, o fator de coagulação é o fator VII ou o fator Vila. O fator Vila pode ativar o fator X, que interage com o fator Va para aderir a protrombina à trombina, que por sua vez adere o fibrinogénio em fibrina.

a. Condições que Podem ser Tratadas

A proteína quimérica da invenção pode ser usada para tratar qualquer desordem hemostática. Os distúrbios hemostáticos que podem ser tratadas pela administração da proteína quimérica da invenção incluem, mas não estão limitados a, hemofilia A, hemofilia B, doença de von Willebrand, deficiência do fator XI (deficiência de PTA), deficiência do fator XII, bem como as deficiências ou anormalidades estruturais do fibrinogénio, protrombina, fator V, fator VII, fator X, ou fator XIII.

Num exemplo, o distúrbio hemostático é uma doença hereditária. Numa forma de realização, o sujeito tem hemofilia A, e a proteína quimérica compreende fator VIII ou fator VIIa. Em outra forma de realização, o sujeito tem hemofilia B e a proteína quimérica compreende fator IX ou fator IXa. Em outra forma de realização, o sujeito tem hemofilia B e a proteína quimérica compreende fator VII ou fator Vila. Em outra forma de realização, o sujeito tem anticorpos inibidores do fator VIII ou fator VIII e a proteína quimérica compreende fator VII ou fator Vila. Em ainda outra forma de realização, o sujeito possui anticorpos inibitórios contra o fator IX ou fator IXa e a proteína quimérica compreende o fator VII ou fator Vila.

A proteína quimérica da invenção pode ser usada para tratar profilaticamente um sujeito com um distúrbio hemostático. A proteína quimérica da invenção pode ser usada para tratar um episódio de sangramento agudo num sujeito com um distúrbio hemostático.

Num exemplo, o distúrbio hemostático é o resultado de uma deficiência num fator de coagulação, por exemplo, o fator IX, fator VIII, fator VII. Em outra forma de realização, o distúrbio hemostático podem ser o resultado de um fator de

coagulação deficiente, por exemplo, o fator de von Willebrand.

Noutro exemplo, o distúrbio hemostático pode ser um distúrbio adquirido. O distúrbio adquirido pode resultar de uma doença ou condição subjacente secundária. A condição independente pode ser, por um exemplo, mas não como uma limitação, o cancro, uma doença autoimune, ou a gravidez. A desordem adquirida pode resultar de velhice ou de medicação para tratar um distúrbio subjacente secundário (por exemplo, quimioterapia cancro).

2. Métodos de Tratar um Sujeito com Necessidade de um Agente Hemostático Geral

A invenção também se refere a métodos de tratar um sujeito que não tem um distúrbio hemostático secundário ou uma doença ou condição que resulte na aquisição de um distúrbio hemostático. A invenção, portanto, refere-se a um método de tratar um sujeito que precisa de agente geral hemostático compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos uma proteína quimérica, onde a proteína quimérica compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e pelo menos um fator de coagulação.

a. Condições que Podem Ser Tratadas

Num exemplo, o sujeito que precisa de um agente hemostático em geral porque está a sofrer, ou está prestes a sofrer a cirurgia. A proteína quimérica da presente divulgação, por exemplo, a proteína quimérica da presente invenção pode ser administrada antes, durante ou após a cirurgia para controlar um episódio de sangramento agudo. A cirurgia pode incluir,

mas não está limitada a, transplante de fígado, a ressecção hepática ou transplante de células estaminais.

A proteína quimérica da invenção pode ser usada para tratar um sujeito com um episódio de sangramento agudo que não tem um distúrbio hemostático. O episódio de sangramento agudo pode resultar de trauma grave, por exemplo, cirurgia, um acidente de automóvel, ferida, laceração por arma de fogo, ou qualquer outro evento traumático, resultando em sangramento descontrolado.

b. Modalidades de Tratamento

A proteína quimérica da invenção pode ser administrada por via intravenosa, subcutânea, intramuscular, ou através de qualquer superfície da mucosa, por exemplo, por via oral, sublingual, bucal, nasal, retal, vaginal ou por via pulmonar. A proteína quimérica pode ser implantada dentro ou ligada a um suporte sólido bio polímero que permite a liberação lenta da proteína quimérica para o local do sangramento ou implantadas no curativo.

A dose de proteína quimérica da invenção irá variar dependendo do sujeito e da via de administração utilizada. As doses podem variar de 0,1 a 100.000 µg/kg de peso corporal. Numa forma de realização, o intervalo de dosagem é 0.1-1.000 µg/kg. A proteína pode ser administrada de forma contínua ou em intervalos de tempo específico. Ensaio in vitro podem ser empregues para determinar a variação ideal da dose ideal e/ou horários para a administração. Ensaio in vitro, para medir a atividade do fator de coagulação são conhecidos na técnica, por exemplo, ensaio de coagulação STA-CLOT Vlla-rTF. Além disso, as doses eficazes podem ser extrapoladas a partir de curvas de dose-resposta obtidas a

partir de modelos animais, por exemplo, um cão hemofílico (Mount et al. 2002, Blood 99(8):2670).

A presente divulgação também se refere a uma composição farmacêutica compreendendo um fator de coagulação, pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina e um veículo farmacêuticamente aceitável ou excipientes. Exemplos de veículos farmacêuticos adequados são descritos na Remington's Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin. Exemplos de excipientes podem incluir vedante, glucose, latose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, gel de sílica, estearato de sódio, cloreto de sódio monoestearato de glicerol, talco, leite desnatado em pó, glicerol, propileno glicol, água, etanol e assim por diante. A composição pode também conter reagentes tampão pH, e agentes emulsificantes ou humedecedores.

Para administração oral, a composição farmacêutica pode assumir a forma de comprimidos ou cápsulas preparadas por meios convencionais. A composição também pode ser preparada como um líquido, por exemplo, um xarope ou suspensão. O líquido pode incluir agentes de suspensão (por exemplo, xarope de sorbitol, derivados de celulose ou de gorduras hidrogenadas), agentes emulsificantes (lecitina ou acácia), veículos não-aguosos (por exemplo, óleo de amêndoa, ésteres de óleo, álcool etílico, ou óleos vegetais fracionados), e conservantes (eg. metílico ou propil-p-hidroxibenzoatos ou ácido sórbico). Os preparativos também podem incluir agentes aromatizantes, corantes e edulcorantes. Alternativamente, a composição pode ser apresentada como um produto seco para a constituição com água ou outro veículo adequado.

Para a administração oral, a composição pode assumir a forma de comprimidos ou pastilhas de acordo com protocolos convencionais.

Para a administração por inalação, os compostos para uso de acordo com a presente invenção são convenientemente apresentados sob a forma de um aerossol de nebulização com ou sem excipientes ou sob a forma de um pulverizador de aerossol de bloco pressurizado ou nebulização, opcionalmente, com um propulsor, por exemplo, diclorodifluorometano, No caso de um aerossol pressurizado a unidade de dosagem pode ser determinada através de uma válvula para a entrega de uma quantidade calibrada de cápsulas e cartuchos de, por exemplo, a gelatina para uso num inalador ou insuflador pode ser formulada, contendo uma mistura de pó do composto e uma base adequada em pó, como a lactose ou amido.

A composição farmacêutica pode ser formulada para a administração parenteral (isto é, por via intravenosa ou intramuscular) por injeção em pílulas. Formulações para a injeção podem ser apresentadas em forma de dosagem de unidade, por exemplo, em ampolas de vidro ou em recipientes multidose com um conservante adicionado. As composições podem assumir formas como as suspensões, soluções, emulsões ou em veículos oleosos ou aquosos e conterem agentes de formulação tais como a suspensão, estabilização e/ou agentes de dispersão. Alternativamente, o ingrediente ativo pode ser em forma de pó para a constituição de um veículo adequado, por exemplo, água livre de pirogêneo.

A composição farmacêutica também pode ser formulada para a administração retal como supositório ou enema de retenção,

por exemplo, contendo bases de supositório convencionais, tais como a manteiga de cacau ou outros glicerídeos.

c. Terapia Combinada

Em outra forma de realização, a invenção refere-se a um método de tratar um sujeito com um distúrbio hemostático compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de pelo menos uma proteína quimérica, compreendendo pelo menos um fator de coagulação e pelo menos uma parte da região constante de imunoglobulina em combinação com pelo menos um outro fator de coagulação ou o agente que promove a hemostasia. O dito outro fator de coagulação ou o agente que promove a hemostasia pode ser qualquer terapêutica com demonstrada atividade de coagulação. Como um exemplo, mas não como uma limitação, o fator de coagulação ou agente hemostático pode incluir o fator V, fator VII, fator VIII, fator IX, fator X, fator XI, fator XII, fator XIII, protrombina, fibrinogénio, fator de von Willebrand ou fator tecidual recombinante solúvel (rstf) ou formas ativadas de qualquer um dos anteriores. O fator de coagulação do agente hemostático também pode incluir medicamentos anti-fibrinolíticos, por exemplo, ácido epsilon-amino capróico, ácido tranexâmico.

G. Kits

A presente divulgação fornece um kit para o diagnóstico de um distúrbio hemostático. O kit inclui um recipiente e uma proteína quimérica, compreendendo pelo menos um fator de coagulação e pelo menos uma porção de uma região constante da imunoglobulina. A proteína quimérica pode ser fornecida num tampão apropriado ou solvente. O tampão pode ser um tampão aquoso, por exemplo, PBS ou, alternativamente, a

proteína guimérica pode ser liofilizada. O kit também pode fornecer instruções para detetar a presença de um fator de coagulação numa amostra, por exemplo, para entrar em contato com uma alíquota de uma amostra com a proteína guimérica da invenção e detetar a presença de um coágulo. A detecção pode incluir a detecção visível. O kit pode opcionalmente fornecer uma alíquota de sangue faltando um conhecido fator de coagulação.

Exemplos

Exemplo 1: Clonagem de pcADN 3,1-Fla-g-Fc

A sequência para o peptídeo FLAG (Asp-Tyr Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) (SEQ ID NO: 23), uma marca de afinidade comum utilizada para identificar ou purificar proteínas, foi clonada no plasmídeo 3,1 pcADN-Fc, que contém a sequência de sinal IgK do rato seguida do fragmento Fc da IgG1 humana (aminoácidos 221-447, numeração UE). O constructo foi criado pela sobreposição de PCR usando os tipos que se seguem:

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

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

FlagFc-F2: 5'- GACTACAAGG ACGACGATGA CAAGGACAAA ACTCACACAT
GCCACCGTG CCCAGCTCCG

GAACTCC -3' (SEQ ID NO: 12)

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

O modelo 3,1-pcADN Fc foi então adicionado a duas reacções distintas PCR contendo 50 pmol de cada um dos pares de primers FlagFc-F1/R1 ou FlagFc-F2/R2 numa reacção de 50 µl usando Pfu Ultra ADN polimerase (Stratagene, CA) de acordo com o protocolo padrão do fabricante num termociclador MJ

usando os seguintes ciclos: 95°C por 2 minutos; 30 ciclos (9,5°C de 30 segundos, 52°C de 30 segundos, 72°C de 45 segundos), seguido de 72°C por 10 minutos. Os produtos destas duas reações foram misturados numa outra reação de PCR (2 µl cada) com 50 pmol de FlagFc-F1 e FlagFc-R2 primers numa reação de 50 µl usando Pfu Ultra ADN polimerase (Stratagene, CA) de acordo com o protocolo padrão do fabricante num termociclador MJ usando os seguintes ciclos: 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de (95°C de 30 segundos, 52°C de 30 segundos, 72°C de 45 segundos), seguido de 72°C por 10 minutos. O fragmento de gel resultante foi purificado, digerido e inserido no plasmideo 3,1 pcADN-Fc NheI-Bam HI. O plasmideo resultante contém a sequência de sinal IgK do rato produzindo a proteína FlagFc.

Exemplo 2: Clonagem do constructo PACE

A sequência de codificação para PACE humana (teste de aminoácidos básicos por clivagem enzimática), uma endoprotease, foi obtida por RT-PCR. Foram utilizados os seguintes primers:

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

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

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

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

O PACE-primer F1 adiciona um sitio HindIII à extremidade 5' da sequência PACE começando com 3 nucleotídeos antes do códon de início, enquanto o PACE-primer R2 adiciona um códon de parada depois do aminoácido 715, que ocorre no final do domínio da matriz extracelular do PACE, bem como adicionar

um sítio EcoRI ao 3' final do códon de parada. O PACE-R1 e primers F2 recozidos nos lados 3' e 5' de um sítio BamHI interno, respetivamente. Dois RT-PCR foram então criados utilizando 25 pmol de cada um dos pares de primers de PACE-F1/R1 ou PACE-F2/R2 com 20 ng de ARN no fígado humano adulto (Clontech; Palo Alto, CA) em 50 µl RT -reação de PCR utilizando o SuperScript™ One-Step RT-PCR com Platinum® Taq System (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com os protocolos dos fabricantes. A reação foi realizada num termociclador MJ usando os seguintes ciclos: 50°C por 30 minutos; 94°C por 2 minutos; 30 ciclos (94°C de 30 segundos, 58°C de 30 segundos, 72°C 2 minutos), seguido 72°C por 10 minutos. Esses fragmentos foram cada um ligado no vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI) e sequenciados inteiramente. O fragmento F2-R2 foi então subclonado em pcADN6 V5/His (Invitrogen, Carlsbad, CA), utilizando os sítios BamHI / EcoRI, e em seguida, o fragmento F1-R1 foi clonado neste constructo usando os sítios HindIII/BamHI. O plasmídeo final, pcADN6-PACE, produz uma forma solúvel do PACE (aminoácidos 1-715), sendo a região transmembrana eliminada. A sequência de ritmo na pcADN6-PACE é, essencialmente, como descrito em Harrison et al. 1998, Seminars in Hematology 35:4.

Exemplo 3: Clonagem do constructo Fc-Fator VII

A sequência de codificação para o Fator VII foi obtida por RT-PCR de ARN no fígado fetal humano (Clontech, Palo Alto, CA). A região clonada está compreendida na sequência do cADN de pb 36 a pb 1430, terminando pouco antes do códon de parada. Um sítio SBFL foi introduzido no N-terminal. Um sítio BspEI foi introduzido no C-terminal. O constructo foi clonado por PCR usando os primers:

Downstream: 5' GCTACCTGCAGGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGG
3' (SEQ ID NO: 19)

Upstream: 5' CAGTTCCGGAGCTGGGCACGGCGGGCACGTGTGAGTTT
TGTCGGGAAAT GG 3' (SEQ ID NO:
20)

e as seguintes condições: 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 45 segundos, e um ciclo de extensão final de 72°C por 10 minutos.

O fragmento foi digerido por SbfI-BspE I e inserido em pED.dC-Fc um plasmídeo codificado para o fragmento Fc de IgG1.

Exemplo 4: Monómero de Fator VII-Fc expressão híbrida do dímero e purificação

Foram estabelecidas células CHO DG-44 que expressam o Fator VII-Fc. As células CHO DG-44 foram cultivadas a 37°C, 5% de CO₂, em MEM Alpha Plus nucleósidos e ribonucleosídeos e completadas com 5% de soro fetal bovino inativado quente até à transfecção.

As células DG44 foram cultivadas em 100 milímetros de tecido de cultura de placas de Petri e cresceram para uma confluência de 50%-60%. Um total de 10 µg de ADN foi utilizado na transfecção de um prato de 100 mm: ou 9 µg de pED. dC. FVI I-Fc + 1 µg de pcADN6-PACE para a transfecção do dímero, ou 7,5 µg de pED. dC. FVII-FC + 1,5 µg pcADN3/Flag-Fc. + 1 µg de pcADN6-PACE para a transfecção do monómero. As células foram transfectadas conforme descrito no manual do reagente Superfect Transfection (Qiagen. Valência, CA). O meio foi removido após 48 horas e substituído com MEM Alpha sem

nucleosídeos dializados acrescido de 5% de soro fetal bovino e 10 µg/ml de Blastocidin (Invitrogen, Carlsbad, CA), para ambas as transfeções, enquanto a transfeção híbrida do monómero-dímero também foi completada com 0,2 mg/ml de geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após 10 dias, as células foram dispensadas da placa com 0,25% de tripsina e transferidas para frascos de cultura de tecidos T25, e a seleção foi mantida por 10-14 dias até que as células começaram a crescer, bem como a estabelecer linhas celulares estáveis. A expressão da proteína foi posteriormente ampliada com a adição de 25 nM de metotrexato.

Foram utilizados cerca de 2×10^7 células para inocular 300 ml de meio de crescimento numa garrafa de rolo de 1700cm² (Corning, Corning, NY), suplementado com 5 µg/L de vitamina K₃ (menadiona bissulfito de sódio) (Sigma, St Louis, MO). As garrafas de rolo foram incubadas em 5% de CO₂ a 37°C por 72 horas. O meio de crescimento foi, então, trocado com 300 ml de soro de produção livre (DMEM/F12 com 5 µg/ml de insulina bovina e 10 µ/ml Gentamicina) suplementado com 5 µg/L de vitamina K₃. O meio de produção (meio condicionado) foi recolhido todos os dias durante 10 dias e armazenado a 4 °C. Foi adicionado meio de produção fresco às garrafas de rolo, após cada coleta e os frascos foram devolvidos à incubadora. O meio líquido foi primeiro clarificado através de um filtro de fibra de vidro Sartoclean (3,0 µm +0,2 µm) (Sartorius Corp Gottingen, Alemanha), seguido por um filtro 500 Acropack (0,8 µm + 0,2 µm) (Pall Corporation, East Hills, NY). O meio clarificado foi então concentrado cerca de 20 vezes usando cassetes de filtração tangencial de fluxo Pellicon Biomax (10 kDa MWCO) (Millipore Corp, Medford, MA).

As quiméras FC foram capturadas em seguida, a partir do meio concentrado por passagem através da coluna de proteína A

Sepharose Fast Flow 4 (AP Biotech, Piscataway, NJ). Uma coluna de 5 x 5 cm (100 ml) foi carregada com ≤ 5 mg de proteína Fc por ml de volume da coluna a um fluxo linear de 100 cm/hora para conseguir um tempo de residência de ≥ 3 minutos. A coluna foi então lavada com >5 volumes da coluna de 1X DPBS para eliminar as proteínas ligadas não especificamente. As proteínas ligadas foram eluídas com 100 mM Glicina pH 3,0. Fracções de eluição contendo o pico de proteína foram, então, neutralizadas por adição de 1 parte 1M Tris-HCl, pH 8 para 10 partes da fração eluída. Passagem da proteína quimérica sobre a coluna de Proteína A convertida do fator VII inativo para ativar o fator Vila (figura 2). Poderia ser consegua outra ativação pela passagem da proteína através de uma coluna de troca aniônica (Peders et al.1989, Biochemistry 28:9331-36).

A amostra de monómero-dímero da proteína híbrida de transfecção foi objeto de purificação adicional, uma vez que continha uma mistura de FVII-fc: FVII-Fc homodímero, FVII-fc: FLAG-Fc monómero-dímero híbrido, e FLAG-Fc: Flag-Fc homodímeros. Para remover FLAG-Fc homodímeros da preparação, a proteína A Sepharose 4 Fast Flow é primeiro dializada em 20mM MES, 20 mM de NaCl, pH 6, 1 e foi, então, passada através de uma mais de uma coluna de permuta de catião Unosphere S (BioRad Corp, Richmond, CA). Sob as condições de funcionamento para a coluna, o FLAG-Fc monómero-híbrido dímero tem uma carga líquida neutra (FLAG-Fc pl teórico = 6,19) e flui através da coluna, enquanto o constructo hFVII-Fc é carregado positivamente e, portanto, vinculado à coluna e eluído com maior força iônica. O material dialisado foi, então, carregado numa coluna de 1,1x11 cm (9,9 ml) a 150 cm/hora. Durante a lavagem e a eluição, o fluxo de vazão foi aumentado para 500 cm/hora. A coluna foi lavada sequencialmente com 8 volumes de coluna de

20 mM MES, 20 mM de NaCl, pH 6,1 e 8 volumes de coluna de 20 mM MES, 40 mM de NaCl, pH 6,1. A proteína ligada foi eluída com 20 mM MES, 750 mM de NaCl, pH 6,1. Frações de eluição contendo o pico de proteína foram agrupadas e filtradas de forma estéril através de um disco de filtro de 0.2 µm antes do armazenamento a -80°C.

Uma coluna de afinidade anti-FLAG MAB foi usada para separar dímeros de Fc quimérico com hFVII fundido a ambas as moléculas Fc daqueles com um FLAG peptídeo e uma fusão de hFVII. O Unosphere S eluato foi diluído 1:1 com 20 mM Tris, 50 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, pH 8 e carregado numa coluna Sepharose de 1,6 x 5 cm M2 anti-FLAG (Sigma Corp, St. Louis, MO) com um fluxo linear de 60 cm/hora. O carregamento foi alvejado a <2,5 mg monómero-dímero híbrido/ml de volume de coluna. Depois de carregada a coluna foi lavada com coluna de 5 volumes de 20 mM Tris, 50 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, pH 8,0. Os híbridos monómero- dímero foram então eluídos com 100 mM Glicina, pH 3,0. Frações de eluição contendo o pico de proteína foram, então, neutralizadas por adição de 1 parte de 1 M Tris-HCl, pH 8 para 10 partes da fração eluída. Os líquidos foram armazenados a -80°C.

Exemplo 5: Análise da Atividade de Coagulação do Fator VII-Fc homodímero e Híbridos de monómero/dímero

O kit ensaio FVlla StaClot-RTF foi comprado na Diagnostica Stago (Parsippany, NJ) e modificado conforme descrito em Johannessen et al. 2000, Blood Coagulation and Fibrinolysis 11:S519. Uma curva padrão foi realizada com FVIIa segundo o padrão 89/688 da Organização Mundial de Saúde. O ensaio comparou um homodímero composto de duas moléculas de fator VII e duas moléculas de Fc com um híbrido monómero/dímero composto de uma molécula de fator VII e duas moléculas Fc.

Foi observada uma atividade de coagulação significativa tanto para o híbrido monómero/dímero e o homodímero. A atividade coagulante do híbrido monómero/dímero em relação ao homodímero foi quase quatro vezes maior (Figura 4).

Exemplo 6: Ligação do Fator VII-Fc para shFcRn

A ligação do fator VII-Fc recetor solúvel para Fc humano neonatal (shFcRn) foi analisada utilizando um instrumento Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Suécia). Um chip CM5 (Biacore, Uppsala, Suécia) foi guardado com 3500 unidades de ressonância magnética (RU) de shFcRn usando aminas químicas. O Fator VII-FC foi diluído, 10 vezes ou 100 vezes, em 50 mM PO₄, pH 6,0, 100 mM de NaCl, 0,01% Tween-20 e injetado (em duplicado) sobre a superfície por 10 minutos a 10 µL/minuto. As amostras também foram injetadas através de uma superfície falsamente revestida, que serviu como controlo de referência. O chip foi regenerado com 100 mM PO₄, pH 8,0. A resposta (no RU), registou 30 segundos antes da injeção foi interrompida, indicado ligação específica (Figura 5).

Exemplo 7: Absorção oral de Fator VII-Fc em ratos recém-Nascidos

Ratos recém-nascidos com 25 dias e 9 gramas foram comprados em Charles River (Wilmington, MA) e permitida a sua aclimação por 24 horas. Os ratos foram tratados por via oral com FVIIa-Fc homodímero, ou híbrido monómero/dímero (composto por duas cadeias Fc, uma das quais estava ligada ao FC-VII). Um volume de 200 µL de uma solução FVIIa-FC foi utilizado para uma dose de 1 mg/kg. A solução era composta de um tampão Tris-HCl pH 7,4 com 5 mg/ml de inibidor de tripsina de soja. Os ratos foram sacrificados com CO₂ em momentos diversos, e 200 µL de sangue foi colhido por punção

cardíaca. O plasma foi obtido pela adição de 1/10 do volume de uma solução de 3,8% de citrato de sódio e centrifugado à temperatura ambiente a uma velocidade de 1268xg. As amostras de plasma ou eram utilizadas nos ensaios frescas ou congeladas a -20°C.

As amostras foram então analisadas por ELISA. Fator Asserachrom VII: o Ag ELISA foi realizado em amostras de plasma de rato neonatal. Um fator VII: o Ag ELISA foi adquirido na Diagnostica Stago (Parsippany, NJ) e realizado conforme descrito no manual do kit com uma mudança. padrão para a curva padrão foi substituído por Fator VIIa- Fc purificado. Para experiências in vivo, a norma foi executada na mesma percentagem de plasma animal normal como sendo analisado. Os resultados mostraram que a administração oral de ambos os híbridos monómero/dímero e dímeros e foi bem sucedida (Figura 7). Um ensaio de curso de tempo usando híbridos monómero/dímero demonstrou níveis plasmáticos sustentados de administração oral de Fator VIIa-Fc ao longo do tempo com um $T_{1/2}$ de 18 horas (Figura 6).

Exemplo 8: Administração intravenosa de Fator VII-Fc em Miniporc

Minipigs adultos Gottingen (6 kg) foram adquiridos na Marshall Farms e permitida a sua aclimatação por duas semanas. Os suínos foram anestesiados com 12 mg/kg de Telazol e 8 mg/kg de Xilanina e administrado por via intravenosa, através da veia jugular, 3 ml de 0,5 mg/kg de Fator VIIa-Fc numa solução tampão Tris-HCl, pH 7,4. Foram recolhidos três ml de sangue em tubos a vácuo citratado (BD Sciences, Franklin Lakes, NJ) em vários períodos de tempo através de punção venosa. O plasma foi obtido por centrifugação das amostras à temperatura ambiente a uma velocidade de 1268xg.

As amostras de plasma foram congeladas a -20°C e posteriormente analisadas por ELISA.

O Fator Asserachrom VII: o Ag ELISA foi realizado em amostras de minipigs. Um fator VII: o teste Ag Elisa foi adquirido na Diagnostica Stago (Parsippany, NJ) e realizado como descrito no manual do kit com uma mudança.padrão para a curva padrão foi substituído por Fator VIIa-Fc purificado. Para experiências in vivo, a norma foi executada na mesma percentagem de plasma animal normal como sendo analisado. Os níveis plasmáticos de administração por via intravenosa do híbrido monómero/dímero são mostrados na Figura 8A. A meia-vida foi determinada ser de 9,4 horas. Um ensaio de curso de tempo usando híbridos monómero/dímero demonstrou níveis plasmáticos sustentados de administração oral de Fator VIIa-Fc ao longo do tempo com um $T_{1/2}$ de 22 horas (Figura 8A).

A atividade de coagulação usada foi medida pelo kit de ensaio FVlla StaClot-RTF (Figura 8B). A $T_{1/2}$ para a coagulação mostrou-se ser de 6,4 horas para um porco e 5,7 horas para o outro porco.

Exemplo 9: Clonagem do constructo de Fc-Fator IX

A sequência de codificação do Fator IX humano, incluindo a sequência prepropeptide, foi obtida por amplificação do RT-PCR do ARN do fígado humano adulto utilizando os seguintes primers:

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

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

20 ng de ARN de fígado humano adulto (Clontech, Paio Alto, CA) e 25 pmol de cada primer foram adicionados a uma reacção de RT-PCR utilizando o SuperScrit™ One-Step RT-PCR com Platinum System® Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo de reacção dos fabricantes, foi realizado num termociclador MJ usando os seguintes ciclos: 50°C 30 minutos; 94°C 2 minutos; 35 ciclos (94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C 1 minuto), e um final de 72°C 10 minutos. O fragmento de gel foi purificado utilizando o kit Qiagen Gel Extration (Qiagen, Valência, CA) e digerido com PSTL-ECorI, gel purificado e clonado no correspondente digerido do plasmídeo pED.dC.XFc. Os aminoácidos e sequências de ADN do fator IX-Fc são mostrados na Figura 9.

Exemplo 10: Fator IX-Fc homodímero e híbrido monómero-dímero expressão e purificação

Foram estabelecidas células CHO DG-44 que expressam o Fator IX-Fc. Foram cultivadas células DG44 em 100 milímetros tecido placas de Petri e cresceram para uma confluência de 50% - 60%. Um total de 10 µg de ADN foi utilizado na transfecção de um prato de 100 mm: para a transfecção do homodímero, foi utilizado 8 µg de pED.dC.Fator IX-Fc + 2 µg de pcADN6-PACE; para a transfecção do híbrido monómero-dímero, foi usado 8 µg de pED.dC.Fator IX-Fc + 1 µg de pcADN3-FlagFc + 1 µg de pcADN6-PACE. As células foram transfectadas conforme descrito no manual do reagente de transfecção Superfet (Qiagen, Valência, CA). O meio foi removido da transfecção 48 horas e substituído com MEM Alpha sem nucleosídeos dializados acrescido de 5% de soro fetal bovino e 10 µg/ml de Blastidina (Invitrogen, Carlsbad, CA), para ambas as transfecções, enquanto a transfecção do híbrido monómero-dímero também foi suplementada com 0,2 mg/ml de geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após 3 dias, as células foram

dispensadas da placa com 0,25% de tripsina e transferidas para frascos de cultura de tecidos T25, e a seleção foi mantida por 10-14 dias até que as células começaram a crescer, bem como as linhas celulares estáveis foram estabelecidas. A expressão da proteína foi posteriormente ampliada pela adição 10 nM ou 100 nM de metotrexato para o homodímero ou híbridos de dímero monómero, respetivamente.

Para ambas as linhagens celulares, foram utilizadas cerca de 2×10^7 células para inocular 300 ml de meio de crescimento numa garrafa de rolo de 1700 cm² (Corning, Corning, NY), suplementadas com 5 µg/L de vitamina K₃ (menadiona bissulfito de sódio) (Sigma, St. Louis, MO). As garrafas de rolo foram incubadas em 5% CO₂ a 37°C por aproximadamente 72 horas. O meio de crescimento médio trocado com 300 ml de soro-médio de produção livre (DMEM/F12 com 5 µg/ml de insulina bovina e 10 µg/ml Gentamicina), suplementado com 5 µg/L de vitamina K₃. O meio de produção (meio condicionado) foi recolhido todos os dias durante 10 dias e armazenado a 4°C. Foi adicionado meio de produção fresco às garrafas de rolo, após cada coleta e os frascos foram devolvidos à incubadora. Antes de cromatografia, o meio foi clarificado através de um filtro SuporCap-100 (0.8/0.2 µm) de Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Todas as etapas foram realizadas a 4°C. O meio clarificado foi aplicado à proteína A Sepharose, lavado com 5 volumes da coluna de 1X PBS (fosfato 10 mM, pH 7,4, 2,7 mM KCl, e 137 mM de NaCl), eluído com glicina 0,1 M, pH 2,7, e em seguida neutralizado com 1/10 volumes de 1 M Tris-HCl, pH 9,0. A proteína foi então dializada em PBS.

A amostra de transfecção da proteína híbrida de monómero-dímero foi objeto de purificação adicional, uma vez que continha uma mistura de FIX-Fc: FIX-Fc homodímero, FIX-fc: Flag-Fc híbrido monómero-dímero, e Flag-Fc: Flag-Fc

homodímero. O material foi concentrado e aplicado a uma coluna de 2,6 cm x 60 cm (318 ml) Superdex 200 Prep Grade a um fluxo de 4 ml/minuto (36 cm/hora) e, em seguida eluído com 3 volumes da coluna de 1X PBS. Frações correspondentes a dois picos no detetor UV foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE. Frações do primeiro pico continham tanto FIX-Fc: FIX-Fc homodímero ou FIX-Fc: FlgFc híbrido monómero-dímero, enquanto o segundo pico continha FlagFc: RagFc homodímero. Todas as frações contendo o híbrido monómero dímero mas não o FlagFc homodímero foram agrupadas e aplicadas diretamente a uma coluna de 1,6 x 5 cm M2 anti-FLAG Sepharose (Sigma Corp, St. Louis, MO), a um fluxo linear de 60 cm/hora. Após o carregamento, a coluna foi lavada com 5 volumes de coluna PBS. Os híbridos de monómero-dímero foram então eluídos com 100 mM Glicina, pH 3,0. As frações de eluição contendo o pico de proteína foram neutralizadas pela adição de 1/10 do volumes de 1 M Tris-HCl, e analisadas através da redução e não redução de SDS-PAGE. As frações foram dializadas em PBS, concentradas a 1-5 mg/ml, e armazenadas a -80°C.

Todos os números que expressam quantidades de ingredientes, condições de reação, e assim por diante é usado na especificação e reivindicações são para ser compreendidos como sendo modificados em todos os casos pelo termo "cerca de". Por conseguinte, a menos que indicado em contrário, os parâmetros numéricos estabelecidos na especificação e nas reivindicações anexas são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas procurou ser obtido pela presente invenção. No mínimo, e não como uma tentativa de limitar a aplicação da doutrina de equivalentes ao âmbito das reivindicações, cada parâmetro numérico deve ser interpretado à luz do número de algarismos significativos e abordagens de arredondamento comuns.

As formas de realização específicas aqui descritas são fornecidas a título de exemplo e não se destinam a ser de modo algum limitativas. Pretende-se que a descrição e os exemplos sejam considerados apenas como exemplificativos, sendo o verdadeiro âmbito: da invenção indicado pelas reivindicações. Exemplos preferidos da presente invenção são descritos abaixo e são como referidos nos exemplos E1 a E15.

E1. Uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína quimérica e um veículo farmacêuticamente aceitável ou excipiente, em que a referida proteína quimérica compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina que é um parceiro de ligação ao FcRn, um fator de coagulação selecionados a partir do Fator VII, um análogo de Fator VII, Fator Vila e um fator VIIa analógico, e, opcionalmente, pelo menos um ligante e onde a referida composição farmacêutica é para o tratamento de um distúrbio hemostático.

E2. A composição farmacêutica de E1. o que reduz o risco de ocorrência de um episódio de hemorragia, infecção, ou oclusão dos locais de infecção associados com uma administração parentérica.

E3. A composição farmacêutica de qualquer uma de E1 ou 2, que tem um aumento da semivida no soro ou biodisponibilidade.

E4. A composição farmacêutica de E1, que é formulada para administração por via intravenosa, por via subcutânea, por via intramuscular, por via oral, sublingual, bucal, nasal, rectal, vaginal ou por via pulmonar ou através de uma mucosa superficial.

E5. A composição farmacêutica de qualquer uma de E1-4, que é formulada para administração a uma dose de 0,1-1000 mg / kg.

E6. A composição farmacêutica de qualquer uma de E1-5, em que a pelo menos uma porção de uma constante de imunoglobulina região compreende um fragmento Fc.

E7. A composição farmacêutica de E6, em que o fragmento Fc é a SEQ ID NO: 2.

E8. A composição farmacêutica de qualquer uma de E 1-7, caracterizado por a proteína quimérica compreender a SEQ ID NO: 1.

E9. A composição farmacêutica de qualquer uma de E 1-8, em que a referida proteína quimérica é um dímero.

E10. A composição farmacêutica de P 9, em que o referido dímero é um homodímero.

E11. A composição farmacêutica de qualquer uma de E 1-9, em que a referida proteína quimérica é um híbrido monómero dímero.

E12. A composição farmacêutica de E1, em que a proteína quimérica compreende a fórmula XLF em que F é um fragmento Fc de uma imunoglobulina e L é um ligante ou uma ligação directa, e X é o Fator VII, um fragmento biologicamente activo do fator VII, Fator Vila, ou um fragmento biologicamente activo do Fator Vila.

E13. A composição farmacêutica de qualquer um de e 1-12, em que o referido ligante compreende cerca de 1 a cerca de 20 aminoácidos.

E14. A composição farmacêutica de qualquer um de e 1-13, em que o ligante compreende a sequência de - (GGS) nem (GGGS) n, em que n é um número inteiro de cerca de 1 a cerca de 10.

E15. Uma proteína quimérica que compreende (i) pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, que é um parceiro de ligação ao FcRn, (ii) um fator de coagulação selecionados a partir do Fator VII, um análogo de Fator VII, Fator VIIa e um análogo de fator VIIa, e opcionalmente (iii) pelo menos um ligador, para o tratamento de um distúrbio hemostático.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> RIVERA, DANIEL S.

Peters, ROBERT T.

Bitonti, ALAN J.

<120> PROTEÍNAS QUIMÉRIAS DE FATOR DE COAGULAÇÃO FC PARA TRATAR
HEMOFILIA

<130> 08945,0005-00000

<140> PCT / US04 / 13940

<141> 2004-05-06

<150> 60 / 468,837

<151> 2003-05-06

<160> 31

<170> Patentln Ver. 3.3

<210> 1

<211> 664

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: constructo aminoácido
sintético

<400> 1

Ala Asn Ala Phe Leu Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Glu Ala Arg Glu Ile
20 25 30
Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Ser
35 40 45
Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys
50 55 60
Lys Asp Gln Leu Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe
65 70 75 80
Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys
85 90 95
Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His His Thr
100 105 110
Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
115 120 125
Asp Gly Val Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys
130 135 140

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 450 455 460
 Pro Glu Val Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 465 470 475 480
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 485 490 495
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Thr Tyr Arg
 500 505 510
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 515 520 525
 Glu Tyr Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 530 535 540
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 545 550 555 560
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Thr Lys Asn Gln
 565 570 575
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 580 585 590
 Val Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 595 600 605
 Thr Pro Val Leu Asp Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 610 615 620
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 625 630 635 640
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Lys
 645 650 655
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 660

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: sequência de aminoácidos sintéticos

<400> 2

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

			20						25						30			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val			
		35					40					45						
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Val			
	50					55					60							
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln			
	65				70					75					80			
Tyr	Asn	Ser	Thr	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His			
				85					90					95				
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn			
			100					105					110					
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Ala	Lys			
		115					120					125						
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp			
	130					135					140							
Glu	Leu	Thr	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly			
	145				150					155					160			
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln			
				165					170					175				
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Val	Leu	Asp	Asp	Ser	Asp	Gly			
			180					185					190					
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln			
		195					200					205						
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His			
	210					215					220							
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
	225				230					235								

<210> 3

<211> 682

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: sequência de nucleótidos sintética

<400> 3

```

gacaaaactc acacgtgccc gccgtgccc gctccggaac tgctgggagg accgtoagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcgatgatc cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaat 300

```

```

gtcaaggctt ccaacaaagc ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa 360
agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa 420
gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctat cccagcgcaca tcgccgtgga 480
gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccc tggtggactc 540
cgacggctcc ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg 600
gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag 660
cctctccctg tctccgggta aa 682

```

<210> 4

<211> 1900

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: constructo nucleótido sintético

<400> 4

```

gccaacgcgt tcctggagga gctgcccggc ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
cagtgtcctc tcgaggaggc ccgggagatc ttcaaggacg cggagaggac gaagctgttc 120
tgattttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac 240
tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
ctggcagacg ggggtgtcctg cacaccacac gttgaatac catgtggaaa aatacctatt 420
ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcaytt gtgtgggggg 540
accctgatca acaccatctg ggtggtctct gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
tgaggaacc tgatcgcggt gctgggcgag cacgacctca cggagcacga cggggatgag 660
cagagccggc ggggtggcga ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
cacgacatcg cgctgtctcc cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtggtgcc 780
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgtggt ccttcgtgcy cttctcattg 840
gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
aacgtgcccc ggtgatgac ccaggactgc ctgcagcagt caoggaaggt gggagactcc 960
ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1080
atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggcccact ttggggtgta caccagggtc 1140
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtctc 1200
ctgcgagccc catttcccga caaaactcac acgtgcccgc cgtgcccagc tccggaactg 1260
ctgggcgagc cgtcagttt cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc 1320
cggaccctg aggtcacatg cgtgggtggt gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 1380
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 1440
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcctgcacca ggactggctg 1500
aatggcaagg agtacaatgt caaggtctcc acaaaagccc ctcccagccc ccatcgagaa 1560
aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc 1620
ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc 1680
cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc gagaacaact acaagaccac 1740
gcctcccgtg ttggactccg acggctcctt cttctctac agcaagctca ccgtggacaa 1800
gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa 1860
ccactacagc cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1900

```

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido ligante sintético
<220>
<221> REPETIÇÃO
<222> (1) .. (30)
<223> Este péptido pode incluir 3 a 30 resíduos, tal como especificado no pedido
<400> 5

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 6
<211> 3
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido ligante sintético
<400> 6

Gly Gly Gly
1

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido ligante sintético
<400> 7

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido ligante sintético
<400> 8

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

<210> 9
<211> 18
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido ligante sintético
<400> 9

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador sintético
<400> 10

gctggctagc caccatgga 19

<210> 11
<211> 45
<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador sintético

<400> 11

cttgtcatcg tcgtccttgt agtcgtcacc agtggaacct ggaac 45

<210> 12

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador sintético

<400> 12

gactacaagg acgacgatga caaggacaaa actcacacat gccaccgtg cccagctccg 60
gaactcc 67

<210> 13

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador sintético

<400> 13

tagtggatcc tcatttacc 21 g

<210> 14

<211> 34

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador sintético
<400> 14
ggtaagcttg ccatggagct gaggcctgg ttgc 34
<210> 15
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador sintético
<400> 15
gttttcaatc tctaggaccc actcgcc 27
<210> 16
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador sintético
<400> 16
gccaggccac atgactactc cgc 23
<210> 17
<211> 34
<212> ADN
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador sintético
<400> 17
ggtgaattct cactcaggca ggtgtgaggg CAGC 34
<210> 18
<211> 38
<212> ADN
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador sintético
<400> 18

gctacctgca ggccaccatg gtctcccagg ccctcagg 38

<210> 19

<211> 51

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador sintético

<400> 19

cagttccgga gctgggcacg gcgggcacgt gtgagttttg tcgggaaatg 51 g

<210> 20

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador sintético

<400> 20

ttactgcaga aggttatgca gcgcgtgaac ATG 33

<210> 21

<211> 38

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador sintético

<400> 21

tttttcgaat tcagtgagct ttgttttttc cttaatcc 38

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 22

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 23

<211> 696

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: constructo aminoácido sintético

<400> 23

Met	Gln	Arg	Val	Asn	Met	Ile	Met	Ala	Glu	Ser	Pro	Gly	Leu	Ile	Thr	
1				5					10					15		
Ile	Cys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Cys	Thr	Val	Phe	Leu	
			20					25					30			
Asp	His	Glu	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Leu	Asn	Arg	Pro	Lys	Arg	Tyr	Asn	
		35					40					45				
Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	
	50					55					60					
Met	Glu	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	Asn	
65					70					75					80	
Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp	Gln	
				85					90					95		
Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile	
			100					105					110			
Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys	
		115					120					125				
Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe	
	130					135					140					

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

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Glu Phe Ala
 450 455 460
 Gly Ala Ala Ala Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 465 470 475 480
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 485 490 495
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 500 505 510
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 515 520 525
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 530 535 540
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 545 550 555 560
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 565 570 575
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 580 585 590
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 595 600 605
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 610 615 620
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 625 630 635 640
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 645 650 655
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 660 665 670
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 675 680 685
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 690 695

<210> 24

<211> 2091

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: oligonucleótido sintético constructo

<400> 24

```

atgcagcggg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta 60
ggatatctac tcagtgctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt 120
ctgaaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttggtca agggaacctt 180
gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaaagaag cacgagaagt ttttgaaaac 240
actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat 300
cctatgttaa atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttgggtgccc 360
tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga 420
tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaagggtgg tttgctcctg tactgagggg 480
tatoactctg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga 540
gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgttttcc tgatgtggac 600
tatgtaaatt ctactgaagc tgaaccatt ttggataaca tcaactcaaag cacccaatca 660
tttaatgact tcaactcggg tgttgggtgga gaagatgcca aaccaggcca attccttgg 720
caggttggtt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa 780
tggattgtaa ctgctgccc ctgtgtgaa actgggtgta aaattacagt tgcgcaggt 840
gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt 900
cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ccttctggaa 960
ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta ttgcatgctg tgacaaggaa 1020
tacacgaaca tcttctcaa atttgatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc 1080
cacaaagggg gatcagcttt agttctcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc 1140
acatgtcttc gatctacaaa gtccaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat 1200
gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa 1260
gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tgggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa 1320
tatggaatat ataccaaggt atcccgtat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc 1380
actgaattcg cgggcgccgc tgcggtcgac aaaactcaca catgccacc gtgccagca 1440
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc 1500
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgggg acgtgagcca cgaagacct 1560
gaggtcaagt tcaactggtc cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 1620
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggctagcg tctcaccgt cctgcaccag 1680
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggctcca acaaagccct cccagcccc 1740
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacacctg 1800
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc 1860
ttctatccca ggcacatgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1920
aagaccacgc ctcccgtgtt ggactccgac ggctcctct tctctacag caagctcacc 1980
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 2040
ctgcacaacc actacacgca gaagagctc tccctgtctc cgggtaaatg a 2091

```

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 25

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

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 26

His Gln Ser Leu Gly Thr Gln
1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 27

His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys
1 5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 28

His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys
1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 29

Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln
1 5

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido ligante sintético

<220>

<221> REPETIÇÃO

<222> (1) .. (10)

<223> Este péptido pode incluir de 1 a 10 resíduos, tal como especificado no pedido

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 31

<211> 50

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: péptido ligante sintético

<220>

<221> REPETIÇÃO

<222> (1) .. (50)

<223> Este péptido pode incluir 5 a 50 resíduos, tal como especificado no pedido

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser
50

REIVINDICAÇÕES

1. Uma proteína quimérica compreendendo uma primeira cadeia e uma segunda cadeia, em que a dita primeira cadeia compreende uma região constante de imunoglobulina ou uma sua porção, que é um recetor Fc neonatal (FcRn) parceiro de ligação, e um fator de coagulação, e em que a dita segunda cadeia compreende uma região constante de imunoglobulina ou uma sua porção, que é um parceiro de ligação ao FcRn, sem um fator de coagulação.
2. A proteína quimérica de acordo com a reivindicação 1, em que o fator de coagulação é o fator VIII, fator IX, fator XI, fator XII, fibrinogénio, protrombina, fator V, fator X, fator XIII, fator VII ou fator VIIa.
3. A proteína quimérica de acordo com a reivindicação 2, em que o fator de coagulação é o fator VIII.
4. A proteína quimérica de acordo com a reivindicação 2, em que o fator de coagulação é o fator IX.
5. A proteína quimérica de acordo com a reivindicação 2, em que o fator de coagulação é o fator VII ou o fator VIIa.
6. A proteína quimérica de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a porção da região constante da imunoglobulina dentro da primeira cadeia é um fragmento Fc e a porção da região constante da imunoglobulina dentro da segunda cadeia é um fragmento Fc.
7. A proteína quimérica de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, para utilização num método de tratamento.

8. A proteína quimérica de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, para utilização no tratamento de um distúrbio hemostático.

9. A proteína quimérica para ser utilizado de acordo com a reivindicação 8, em que o distúrbio é hemostático hemofilia A ou B.

10. Um primeiro constructo de ADN e uma segunda construção de ADN que em conjunto codificam a proteína quimérica de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a primeiro constructo de ADN codifica a primeira cadeia da referida proteína quimérica e a segunda construção de ADN codifica a segunda cadeia do referido proteína quimérica.

11. Um vetor que compreende as primeira e segunda construções de ADN de acordo com a reivindicação 10, ou um primeiro vetor que codifica a primeiro constructo de ADN de acordo com a reivindicação 10 e um segundo vetor que codifica para a segunda construção de ADN de acordo com a reivindicação 10.

12. Uma célula hospedeira que compreende a primeira e segunda construções de ADN de acordo com a reivindicação 10, ou o vetor ou vetores de acordo com a reivindicação 11.

13. Um método de produção de uma proteína quimérica de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o método compreende cultura da célula hospedeira da reivindicação 12, em que a proteína quimérica seja expressa.

14. Uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína quimérica de qualquer uma das reivindicações 1 a 6 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

15. A proteína quimérica para ser utilizado de acordo com qualquer uma das reivindicações 7, 8 ou 9, em que a proteína quimérica é para ser administrado por via intravenosa, subcutânea, intramuscular, ou através de uma superfície mucosa.

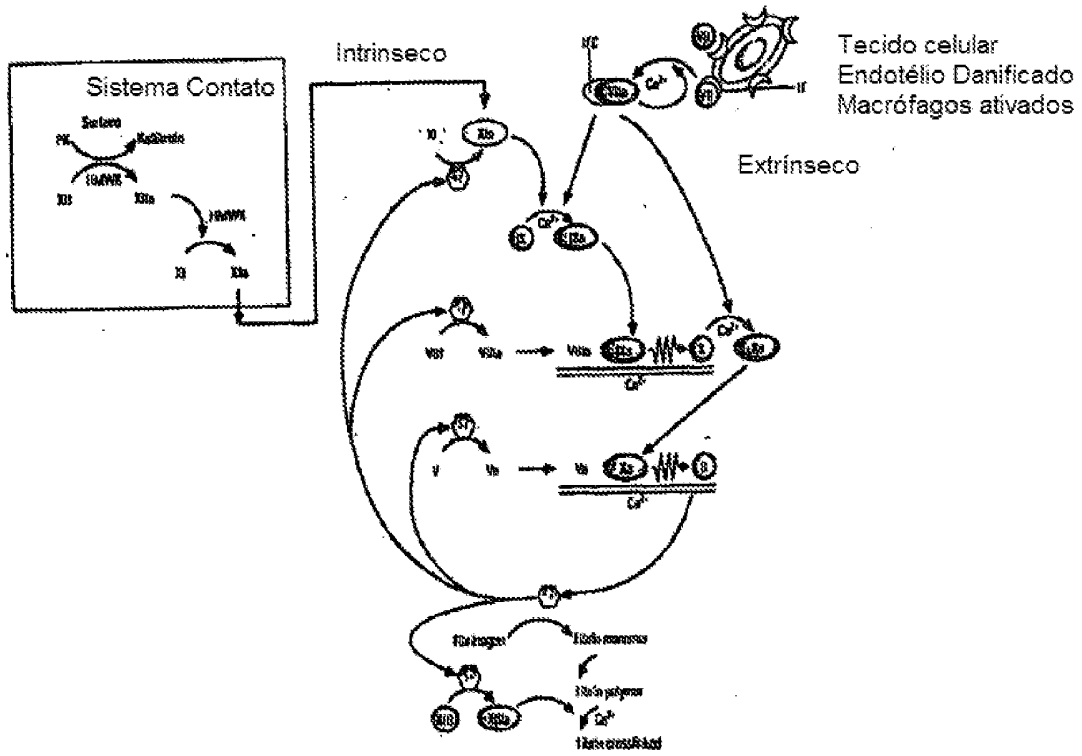
16. Uma proteína quimérica possuindo uma porção monomérica e dimérica uma porção, em que a porção dimérica compreende duas regiões constantes de imunoglobulina ou suas porções, cada uma das quais é um recetor Fc neonatal (FcRn) parceiro de ligação, e a porção monomérica compreende um fator de coagulação que está ligado a uma das duas regiões constantes de imunoglobulinas ou suas porções.

RESUMO

PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE FATOR DE COAGULAÇÃO PARA O TRATAMENTO DE UM DISTURBIO HEMOSTÁTICO

Composição farmacêutica para o tratamento de um distúrbio hemostático, compreendendo uma proteína quimérica, e um transportador farmacêuticamente aceitável ou excipiente, em que a dita proteína quimérica compreende pelo menos uma parte de uma região constante da imunoglobulina, que é um parceiro de ligação FcRn, um fator de coagulação selecionados a partir do Fator VIIr um análogo do fator VII r fator VII-A e análogo do fator Vila e, opcionalmente, pelo menos um ligador.

Fig. 1



Factor VIIa/Fc

Fig. 2

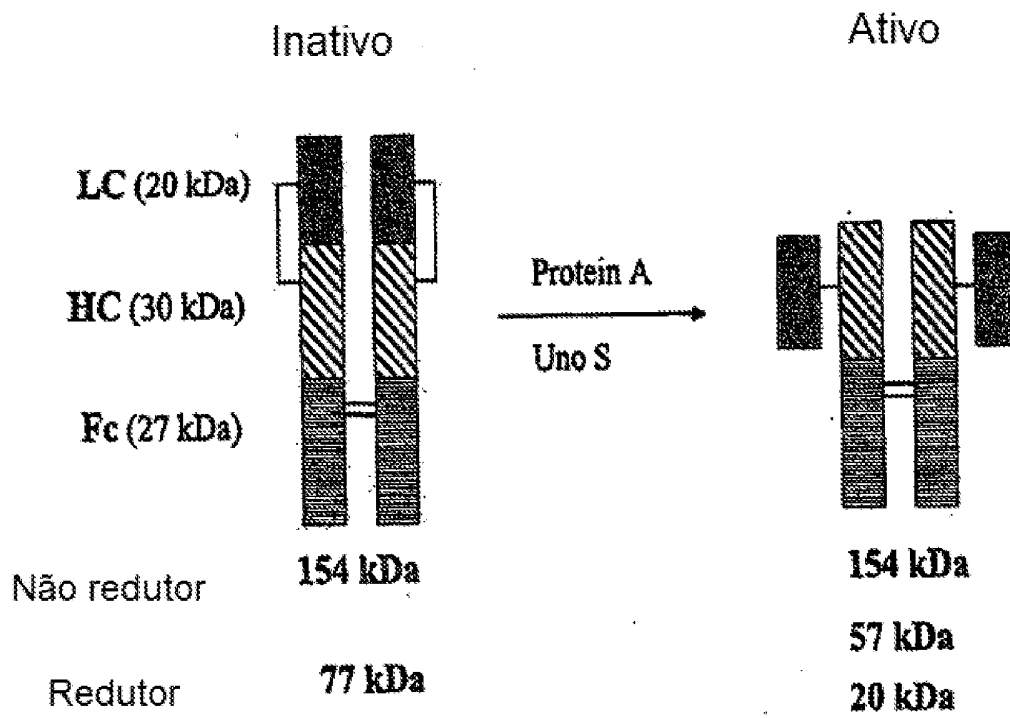


Fig. 3A

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

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

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

Fig. 3B

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

Fig. 3C

gacaaaactcacacggtgccccggtgccccagctccggaactgctggggcggacggt
cagttcttctcttcccccaaaaacccaaggacacccctcatgatctccgggacccc
tgagggtcacatgctggtggtggaagctgagccacgaaagaccctgagggtcaagttc
aactggtacgtggacggggtggagggtgcataatgccaagacaaaagccgaggagg
agcagttacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacccgtcctgcaccagga
ctggctgaatggcaaggagttacaatgtcaagggtctccaacaaaagcccctcccagc
ccccatcgagaaaaaccatctccaagccaaaagggcagccccgagaaccacaggtg
tacaccctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacct
gcttgggtcaaagggttctatcccagcagacatcgccgtggagtgaggagcaatgg
gcagccggagaaacaactacaagaccacgcctcccgtgttggactccgacgggtcc
ttcttctctacagcaagctcacccgtggacaaagagcagggtggcagcaggggaaacg
tcttctcatgctccgtgatgcatgagggtcttgcaacaaccactacacgcagaaagag
cctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:3)

Fig. 3D

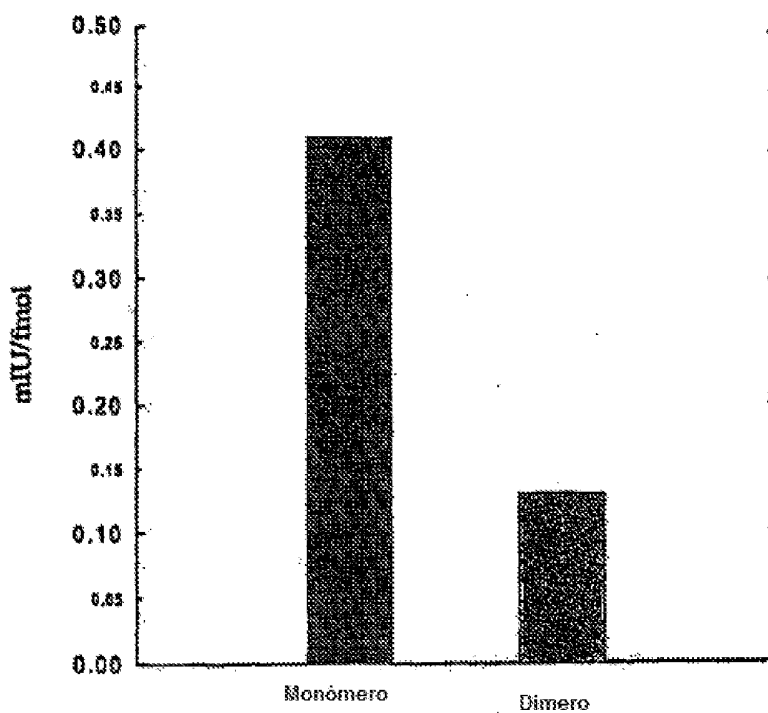
gccaacgcggttcctggaggagctgcccgcgggctccctggagagggagtgcaagg
aggagcagtgctccttcgaggaggccccgggagatcttcaaggacgaggagaggac
gaagcrgttctggatttcttacagtgatggggaccagtggtgcctcaagtccatgc
cagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttetgcctcc
ctgccttcgaggggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgt
gaaagagaacggccggtgtgagcagtaactgcagtgaccacaagggcaccaagcgc
tcctgtcgggtgccacgaggggtactctctgctggcagacgggggtgtcctgcacac
ccacagttgaatccatgtggaaaaatacctattctagaaaaaagaaatgccag
caaacccccaggccgaattgtggggggcaagggtgtgccccaaaggggagtgcca
tggcaggtcctgttggttggtgaatggagctcagttgtgtggggggaccctgatca
acaccatctgggtggtctccgcggcccactgtttcgacaaaaatcaagaactggag
gaaacctgatcgcgggtgctgggcgagcaagacctcagcagagcacgacggggatgag
cagagcrggcgggtggcgcaggtcatcatccccagcacgtacgtcccgggaccca
ccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgacca
tgtggtgcccctctgcctgcccgaacggacggtctctgagaggacgctggccttc
gtgcgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctggaccggtggcgccaagg
ccctggagctcatggtcctcaacgtgcccggctgatgaccaggactgcctgca
gcagtcacgggaaggtgggagactccccaaatatcaeggagtacatgttctgtgcc
ggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtgaggggccacatg

ccaccactaccggggcacgtggtarctgacgggcatcgtcagctggggccaggg
ctggegcaaccgtgggcccactttgggggtgtacaaccaggggtctcccagtaacatcgag
tggctgcaaaaagctcatgggctcagagccaagcccaggagtcctcctgagagccc
catttcccgaacaaaactcacacgtgcccgcgctgcccagctccggaaactgctggg
cggaccgtcagttctcctcttcccccaaaaacccaaggacacccctcatgatctcc
cggaccctgaggtcacatgctggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgagg
tcaagtccaactggtecggtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagcc
gggggaggagcagracaaacgcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctg
caccaggactggctgaatggcaaggagtacaatgtcaaggtctccaacaaagccc
ctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaac
cacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcag
cctgacctgacctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggag
agcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgttgagctccg
acggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca
ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg
cagaagagcctctcccgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:4)

Atividade de Coagulação de FVIIa-Fc
Proteínas

Fig. 4

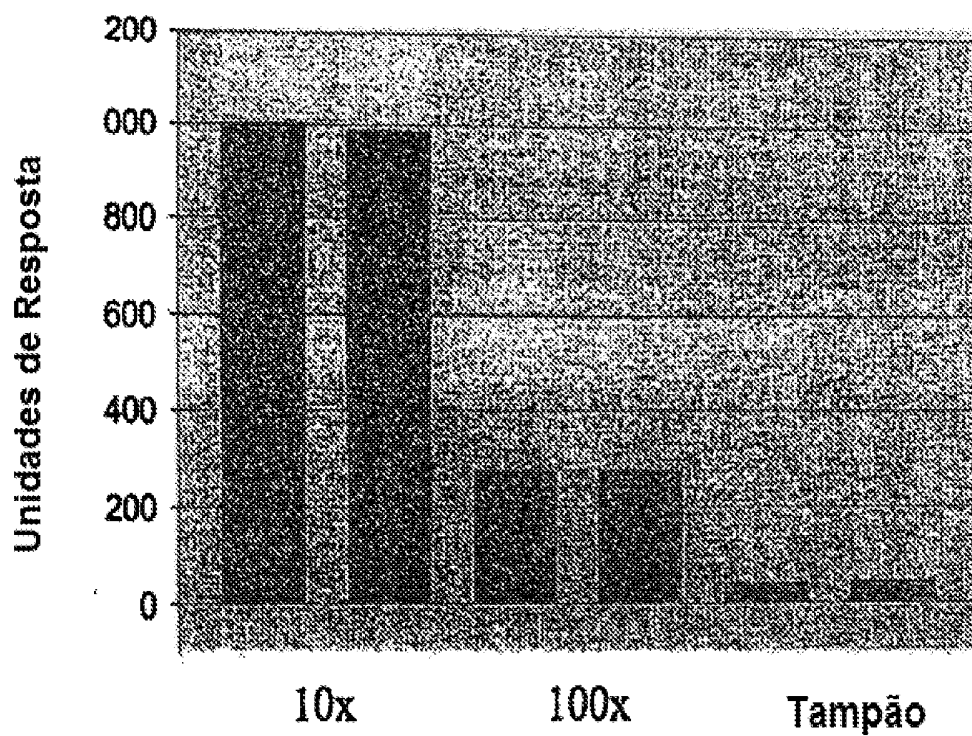
Ensaio de Coagulação STA-CLOT VIIa-rTF



INFORMAÇÃO CONFIDENCIAL

Fig. 5

Ligação do Fator VII-Fc a ShFcRn



INFORMAÇÃO CONFIDENCIAL

Fig. 6

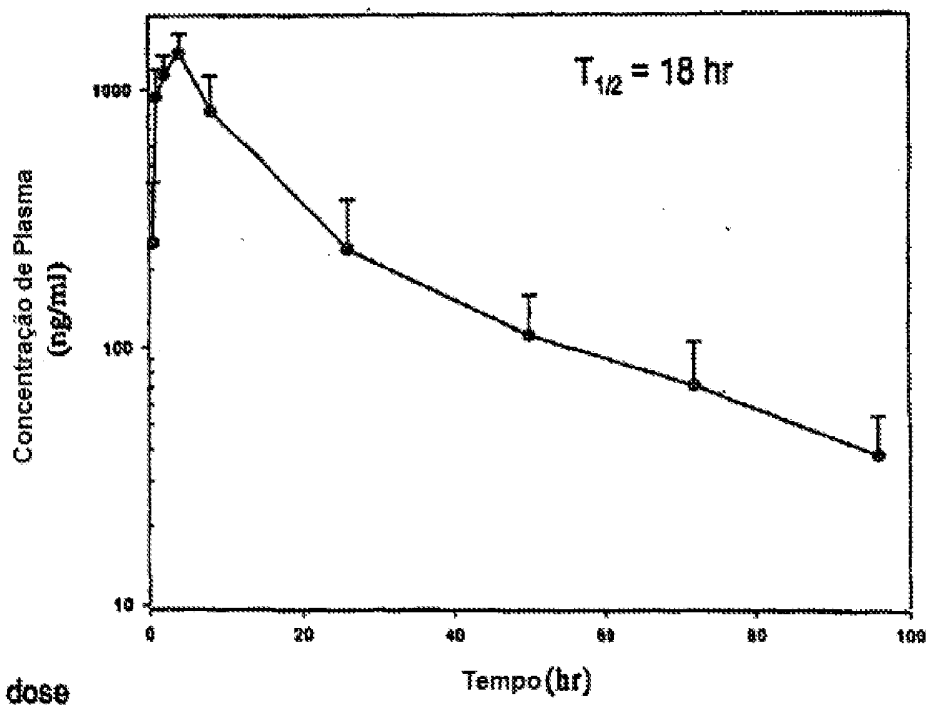
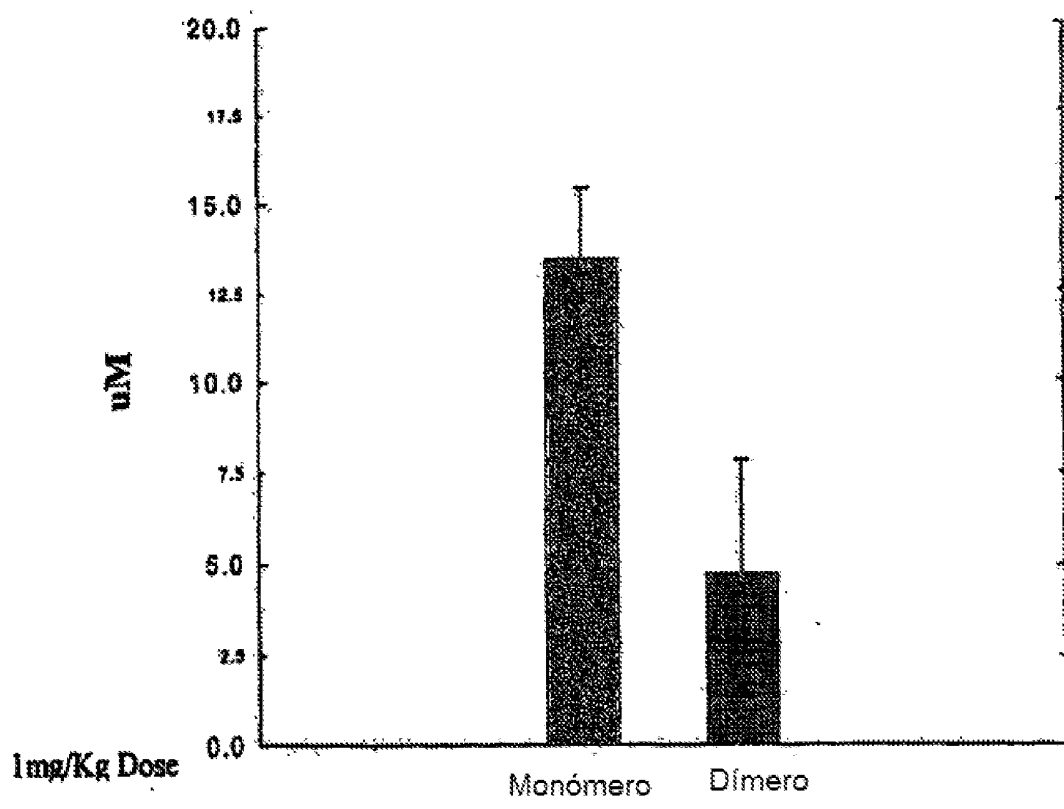
FVII-Fc: Absorção oral de Fc em Ratos Recém nascidos

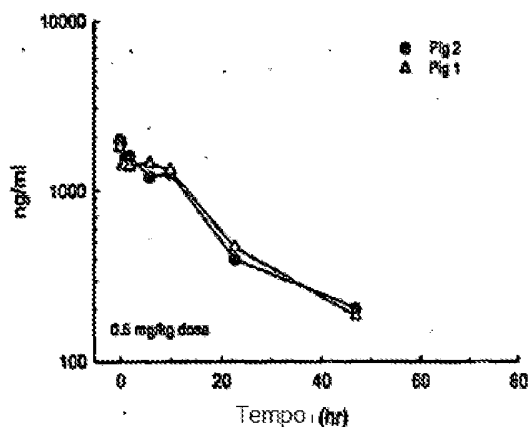
Fig. 7 **FVII:Ag Elisa**
Absorção oral Ratos Recém nascidos



PK Intravenosa de of FVIIaFc:Fc em MiniPorcos

Fig. 8A

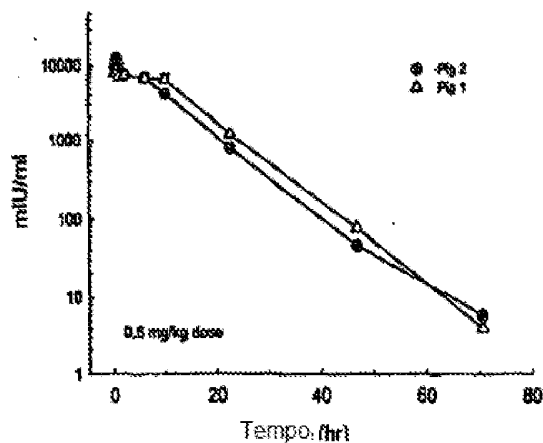
Níveis de Plasma



I_{50}
 Porco #1 9.6 hr
 Porco #2 9.2 hr

Fig. 8B

Atividade de Coagulação



I_{50}
 Porco #1 6.4 hr
 Porco #2 5.7 hr

Fig. 9a

Factor IX - sequência de aminoácidos de Fc (péptido de sinal sublinhada, pró-péptido em negrito)

1	<u>MQRVNMIMAE</u>	<u>SPGLITICLL</u>	<u>GYLLSARCTV</u>	<u>FLDHEENANKI</u>	<u>LNRPKRYNSG</u>
51	<u>KLEEFVQGNL</u>	<u>EREEMBEKCS</u>	<u>FEEAREVFEN</u>	<u>TERITTEFWKQ</u>	<u>YVDGDCESN</u>
101	<u>PCLNGGSCKD</u>	<u>DINSYECWCP</u>	<u>FGFEGIKCEL</u>	<u>DVTCNIHNGR</u>	<u>CEQFCIKNSAD</u>
151	<u>NKVVCSCTEG</u>	<u>YRLAENQKSC</u>	<u>EPAVPPFCGR</u>	<u>VSVSQTSKLT</u>	<u>RAETVFPDVD</u>
201	<u>YVNSTRAETI</u>	<u>LDNITQSTQS</u>	<u>FNDFTRVGG</u>	<u>EDAKPGQFPW</u>	<u>QVVLNGKYDA</u>
251	<u>PCGGSIVNEK</u>	<u>WIVTAARCVS</u>	<u>TGVKITVVAG</u>	<u>EHNIERTIHT</u>	<u>EQRKRVIRII</u>
301	<u>PHNYNAAIN</u>	<u>KYNEDIALLE</u>	<u>LDEPLVLNSY</u>	<u>VTPICLADKE</u>	<u>YTNIFLKFGS</u>
351	<u>GYVSGWGRVF</u>	<u>HKORSALVLQ</u>	<u>YLRVPLVDRA</u>	<u>TCLRSTKFTI</u>	<u>YNNMFCAGFH</u>
401	<u>EGGRDSCQGD</u>	<u>SQGPHTVEVE</u>	<u>GTSFLTGIIS</u>	<u>WGEECAMKGG</u>	<u>YGIYTKVSRV</u>
451	<u>VNWIKEKTKL</u>	<u>TEFAGAAAVD</u>	<u>KTHICPPCPA</u>	<u>PELGGPSVF</u>	<u>LFPPEPKDTL</u>
501	<u>MISRTPEVTC</u>	<u>VVDVSHEDP</u>	<u>EVKFNWYVDG</u>	<u>VEVHNAKTKP</u>	<u>REEQYNSTYR</u>
551	<u>VVSVLTVLHQ</u>	<u>DWLNGKEYKC</u>	<u>KVSNKALPAP</u>	<u>IEKTIKAKG</u>	<u>QPREPQVYTL</u>
601	<u>PPSRDELTKN</u>	<u>QVSLTCLVKG</u>	<u>FYPSDIAVEW</u>	<u>ESNGQEPENNY</u>	<u>KITPPVLDSD</u>
651	<u>GSFFLYSKLT</u>	<u>VDKSRWQGN</u>	<u>VPSCSVNHER</u>	<u>LHNHYTQKSL</u>	<u>SLSPGK</u>

Fig. 9B

Fator IX-Fc sequência de nucleotídeos (péptido de sinal sublinhado, pró-péptido a negrito)

atgcagccgctgaacatgatcatggcagaatcaccaggccctcatcaccatctgccttttaggat
atctactcagtgccgaatgtacagtttttcttgatcatgaaaaagcccaacaaaattctgaaatcg
gocaaagaggtataaattcaggtaaattggaagagttgttcaagggaaaccttgagagagaatgt
atggaagaaaagtgtagtttgaagaagcaccgagaagttttgaaaacactgaaagaacaactg
aattttggaagcagtatggtgatggagatcagtgtagtccaatccatgctttaaattggcggcag
ttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttgggtgtccctttggatttgaaggaaagaactgt
gaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgccagcagtttgtaaaaatagtgctg
ataacaagggtggtttgctcctgtactgagggatatacgaactgcagaaaaaccagaagtcctgtga
accagcagtgccatttccatgtggaagagtttctgtttcacaaaacttctaagctcaccogtgc
gagactgttttctctgatgtggactatgtaaatctactgaagctgaaaccattttggataaca
tcaactcaaagcacccaatcatttaattgacttcaactcgggtgttgggtggagaagatgccaaacc
aggtcaattccctggcaggttggtttgaatggtaagttgatgcattctgtggaggctctatc
gttaattgaaaatggattgtaactgctgccactgtgttgaactgggtgttaaaattacagttg
tgcaggtgaaataaatttgaggagacagaaacatacagagcaaaaagcgaatgtgattcgaat
tattcctcaccacaactacaatgcagctattaataagtaacaacctgacattgccctctctggaa
ctggaagaaaccttagtgctaaacagctacgttacacctatttgcattgctgacaaggaataca
cgaacatcttctcaaatttggatctggctatgtaagtggtcggggaagagtttccacaaagg
gagatcagcttttagttcttcaagtccttagagttccacttgttgaccgagccacatgctcttoga
tctacaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagatt
catgtcaaggagatagtgggggaccatgttactgaagtggaagggaccagtttcttaactgg
aattattagctggggtgaagagtggtgcaatgaaggcaaatatggaatataaccaaggtatcc
cggtatgtcaactggatttaggaaaaaaacaaagctcactgaattcgccggcggcgtgoggtcg

acaaaactcaccaatgcccaacggtgcccagcacctgaaactcctggggggacngtcagttcttct
cttcccccaaaaaccaaggacacctctatgatctcccggaacctgaggtcaatgctgggtg
gtggacgtgagccaagaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggtctggaggtg
ataatgccaagcacaagccgctggggagggcgagtaaacagcaacgtaacgtggtcaggtct
cacgtcttgaccaggactggtctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggttcccaacaaagca
ctcccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaaaagggcagccccgaggaaccacaggtg
acacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggttaa
aggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactac
aagaccagcctcccgtgttggactcgaaggctcttcttctctacagcaagctcacgtgg
acaagagcaggtggcagcaggggaaagctcttctctatgctccgtgatgcattgaggctctgcaaa
ccactacacgcagaagagcctctccctgctccgggtaaatga