

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 889 920**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2007 E 19162362 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.03.2021 EP 3564267**

54 Título: **Proteínas de fusión escindibles proteolíticamente con alta actividad específica molar**

30 Prioridad:

14.06.2006 EP 06012262
11.07.2006 US 81962006 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.01.2022

73 Titular/es:

CSL BEHRING GMBH (100.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE

72 Inventor/es:

METZNER, HUBERT;
WEIMER, THOMAS y
SCHULTE, STEFAN

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 889 920 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión escindibles proteolíticamente con alta actividad específica molar

La presente invención se refiere al campo de las proteínas de fusión terapéuticas modificadas con semivida aumentada comparada con sus polipéptidos terapéuticos precursores no modificados. La invención se refiere específicamente a factores de coagulación fusionados a polipéptidos mejoradores de la semivida (HLEPs), que están conectadas por péptidos enlazadores que son escindibles proteolíticamente para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno de la coagulación sanguínea. La escisión de tales enlazadores libera el polipéptido terapéutico de cualquier impedimento estérico comprometedor de la actividad causado por el HLEP y permite por tanto la generación de proteínas de fusión, que retienen una actividad molar específica alta del factor de coagulación. En el caso en que las proteínas de fusión terapéuticas son zimógenos, se prefieren especialmente aquellos enlazadores que liberan el polipéptido terapéutico de modo esencialmente simultáneo con su activación *in vivo* después de exposición a la o las proteasas correspondientes. Otro aspecto de la presente invención es una tasa de inactivación más rápida de un factor de coagulación dado una vez que se activa el factor de coagulación y el enlazador peptídico se escinde proteolíticamente en un modo relacionado con la coagulación y/ o una tasa de eliminación más rápida de un factor de coagulación dado una vez que el factor de coagulación se activa y el enlazador peptídico se escinde proteolíticamente de un modo relacionado con la coagulación comparado con la proteína de fusión correspondiente sin el enlazador escindible.

La idea de la invención se demuestra en particular por los polipéptidos dependientes de la vitamina K humana Factor IX, Factor VII, y Factor VIIa, pero el concepto puede aplicarse también a otros factores de la coagulación. Cualquier polipéptido potenciador de la semivida (HLEP) puede estar conectado al polipéptido terapéutico mediante un péptido enlazador escindible, pero albúmina o inmunoglobulinas o fragmentos derivados de las mismas como el fragmento Fc sin un dominio de fijación de antígeno son HLEPs preferidos. La divulgación se refiere también a secuencias de ADNc que codifican los polipéptidos terapéuticos y derivados de los mismos fusionados genéticamente a un ADNc codificante de HLEPs, tales como la albúmina de suero humano enlazada por oligonucleótidos que codifican enlazadores peptídicos interpuestos escindibles. Tales derivados codificados exhiben semivida y actividades molares específicas mejoradas que están aumentadas en comparación con sus homólogos no-escindibles. La divulgación se refiere también a vectores de expresión recombinantes que contienen tales secuencias de ADNc, células hospedadoras transformadas con tales vectores de expresión recombinantes, polipéptidos recombinantes y derivados que tienen de hecho actividades biológicas comparables al polipéptido terapéutico de tipo salvaje no modificado pero que tienen semividas mejoradas. La divulgación se refiere también a procesos para la fabricación de tales proteínas recombinantes y sus derivados. La divulgación cubre también un vector de transferencia para uso en terapia génica humana, que comprende tales secuencias de DNA modificadas útiles para aumentar la semivida *in vivo*.

Antecedentes de la invención

Están disponibles comercialmente varios polipéptidos terapéuticos recombinantes para uso terapéutico y profiláctico en humanos. Los pacientes se benefician en general del modo de acción específico de los ingredientes activos recombinantes, pero una desventaja en muchos casos es su disponibilidad limitada debido a sus procesos de fabricación costosos y complejos. Una reducción de la dosis o la frecuencia de administración necesarias de tales productos podría mejorar esta situación. Una frecuencia reducida de administración podría mejorar la comodidad para el paciente y, por tanto, también la aceptación de la terapia. Se han descrito varias soluciones para alcanzar la meta de una semivida *in vivo* aumentada después de la administración. Soluciones propuestas recientemente incluyen la formación de proteínas de fusión, especialmente en el caso de polipéptidos con una semivida *in vivo* breve que puede aumentarse significativamente por fusión a un HLEP.

Ballance et al. (WO 01/79271) han descrito polipéptidos de fusión de una multitud de polipéptidos terapéuticos diferentes que, cuando se fusionan a seroalbúmina humana, se predice que tienen una semivida funcional *in vivo* aumentada y vida útil prolongada. Se han descrito largas listas de socios potenciales de fusión sin demostración por datos experimentales para prácticamente cualquiera de estos polipéptidos de que las respectivas proteínas de fusión de albúmina retengan realmente actividad biológica y tengan propiedades mejoradas. Entre la lista de polipéptidos terapéuticos mencionados como Ejemplos se encuentran Factor IX y FVII/FVIIa. Se han descrito también fusiones de FIX y FVII/FVIIa en las cuales existe un enlazador peptídico entre albúmina y FIX o FVII/FVIIa. Sin embargo, no se sugiere el uso de péptidos enlazadores escindibles.

Sheffield et al. (Sheffield W. P. et al. (2004), Br. J. Haematol. 126: 565-573) expresaron una proteína de fusión de albúmina con Factor IX murino compuesta de FIX murino, un enlazador de 8 aminoácidos (GPG₄TM), albúmina murina y un marcador peptídico de 22 aminoácidos, y también una proteína de fusión de albúmina con Factor IX humano compuesta de Factor IX humano, un enlazador de 7 aminoácidos (G₆V) y albúmina humana.

Utilizando un ensayo de coagulación de una sola etapa, dependiente de FIX, las actividades molares específicas de la proteína de fusión FIX murino-albúmina (MFUST) y la proteína de fusión FIX humano-albúmina (HFUS) eran al menos 2 a 3 veces menores que la de sus homólogos no fusionados, un efecto atribuido al menos parcialmente a un proceso de activación proteolítica más lento por FXIa. Sheffield no utilizó ni sugirió la utilización de un enlazador escindible entre FIX y albúmina.

Varias solicitudes de patente describen la fusión de polipéptidos terapéuticos a regiones constantes de inmunoglobulina para prolongar la semivida de polipéptidos terapéuticos *in vivo*. WO 2002/04598, WO 2003/059935, WO 2004/081053, WO 2004/101740 y WO 2005/001025 incluyen FIX como ejemplos para el resto del polipéptido terapéutico. Las dos últimas solicitudes de patente describen también FVII/FVIIa fusionado a regiones constantes de inmunoglobulina y encuentran que los homodímeros de proteínas de fusión tienen actividad de coagulación inferior comparados con proteínas de fusión constituidas por un monómero/dímero. Una vez más, no se sugiere el uso de péptidos enlazadores escindibles.

En WO 91/09125 se describen proteínas de fusión que están unidas por enlazadores que son escindibles por proteasas de la cascada de coagulación de la sangre, pero las proteínas de fusión están limitadas a las que comprenden proteínas fibrinolíticas o antitrombóticas.

En WO 03/068934 se describen moléculas quiméricas que están compuestas de al menos una primera molécula componente, al menos un enlazador y al menos una segunda molécula, en donde el enlazador comprende un sitio de escisión enzimática para producir un enlace no existente naturalmente y un sitio de escisión entre la primera y la segunda moléculas componentes y en donde, después de la escisión de la molécula quimérica en el sitio de escisión, al menos una de las moléculas componentes es funcionalmente activa. Las proteasas de escisión pueden ser factores de coagulación como trombina. Moléculas componentes descritas entre muchas otras son FIX y FVIIa. Sin embargo, no se describen las proteínas de fusión terapéuticas de la presente invención, ni las propiedades mejoradas de las proteínas de fusión terapéuticas de la presente invención tales como actividad molar específica aumentada, velocidad de desactivación y/o velocidades de eliminación aumentadas en comparación con la proteína terapéutica sin enlazadores escindibles.

El documento EP1444986 describe una preparación farmacéutica para el tratamiento de trastornos de la coagulación sanguínea. El documento WO96/01653 describe métodos y composiciones para la coagulación específica de la vasculatura. El documento WO2004/101740 describe proteínas quiméricas de factor de coagulación-Fc para tratar la hemofilia. El documento EP1816201 describe un factor de coagulación VIIa modificado con una semivida prolongada.

Descripción de la invención

Existe una gran necesidad médica de factores de coagulación que tengan una semivida larga. En la técnica anterior, se han sugerido fusiones de factores de coagulación con polipéptidos mejoradores de la semivida para alcanzar este objetivo. Sin embargo, una vez que un factor de coagulación se activa durante la coagulación, sea por escisión proteolítica del zimógeno (como FIX) o por contacto de un Factor ya "pre"- activado proteolíticamente con un segundo polipéptido (como la fijación de FVIIa a Factor Tisular), ya no es deseable mantener la semivida larga del factor de coagulación ahora activado, dado que esto podría conducir a complicaciones trombóticas, como es ya el caso para un factor de coagulación de tipo salvaje como FVIIa (Aledort L. M., J Thromb Haemost 2(10): 1700-1708 (2004)) y podría ser incluso más relevante si el Factor activado tuviera una semivida aumentada. Por consiguiente, un objetivo de la presente divulgación es proporcionar factores de coagulación de vida larga, que después de la activación o después de la disponibilidad de un cofactor tengan una semivida comparable a la de un factor de coagulación no modificado.

Las fusiones de los factores de coagulación a polipéptidos mejoradores de la semivida como se describen en la técnica anterior y como se muestran también en los ejemplos 6 y 7 adolecen en general de una actividad molar específica reducida del factor de coagulación fusionado. Otro aspecto de la presente divulgación proporciona factores de coagulación con semivida mejorada, que muestran actividad molar específica aumentada comparados con la proteína de fusión terapéutica correspondiente sin un enlazador escindible.

La invención se refiere por tanto a proteínas de fusión terapéuticas para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno de la coagulación sanguínea que comprende

a) un factor de coagulación, en el que el factor de coagulación se selecciona de la lista que consiste en Factor IX, Factor VIII, Factor de van Willebrand, Factor V, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, Factor I, Factor II (Protrombina), Proteína C, Proteína S, GAS6 y Proteína Z,

b) un polipéptido aumentador de la semivida, y

c) un enlazador peptídico que une el factor de coagulación y el polipéptido aumentador de la semivida;

en el que el enlazador peptídico es escindido por proteasas implicadas en la coagulación o activadas por enzimas de la coagulación y en el que la proteína de fusión terapéutica tiene, en comparación con la proteína de fusión terapéutica respectiva enlazada por un enlazador no-escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGGV:

i) una actividad molar específica aumentada en al menos un ensayo relacionado con la coagulación; y

ii) una velocidad de eliminación aumentada del factor de coagulación activado después que el enlazador peptídico es escindido proteolíticamente en un modo relacionado con la coagulación.

La invención proporciona también las proteínas de fusión terapéutica para su uso de acuerdo con la invención formulada como composición farmacéutica.

5 Como consecuencia del enlazador escindible, después de la escisión del enlazador peptídico en un modo relacionado con la coagulación, el factor de coagulación se asemeja más estrechamente al comportamiento del Factor nativo no fusionado y no exhibe una semivida aumentada del Factor activo con efecto potencialmente protrombótico.

La escisión proteolítica en un modo relacionado con la coagulación en el sentido de la invención, es cualquier escisión proteolítica que ocurre como consecuencia de la activación de al menos un Factor de la coagulación o cofactor de la coagulación.

10 La expresión "factor de coagulación activado después que el enlazador peptídico es escindido proteolíticamente en un modo relacionado con la coagulación" en el sentido de la invención significa que el factor de coagulación se activa prácticamente en paralelo con la escisión proteolítica del péptido enlazador, o que el factor de coagulación estaba ya activado ya antes de la escisión proteolítica del péptido enlazador. La activación puede ocurrir, por ejemplo, por escisión proteolítica del factor de coagulación o por fijación a un cofactor.

15 La proteína de fusión terapéutica puede tener una recuperación mejorada *in vivo* en comparación con la recuperación *in vivo* del factor de coagulación no modificado.

Se prefieren proteínas de fusión terapéuticas que tengan una recuperación mejorada *in vivo*, comparadas con el factor de coagulación no modificado en al menos 10%, más preferentemente en al menos 25% y muy preferentemente en 40% o más.

Los HLEP preferidos son la albúmina y sus fragmentos e inmunoglobulinas que incluyen fragmentos de los mismos.

20 La región enlazadora en una realización preferida comprende una secuencia del polipéptido terapéutico a administrar o una variante del mismo, que debería dar como resultado un riesgo disminuido de propiedades neoantigénicas (formación de un nuevo epítipo potencialmente inmunógeno debido a la existencia de un péptido en el antígeno terapéutico que no existe en proteínas humanas) de la proteína de fusión expresada. Asimismo, en el caso en que la proteína terapéutica es un zimógeno (por ejemplo necesita ser activada proteolíticamente) la cinética de la escisión
25 del enlazador peptídico reflejará más estrechamente la cinética de activación del zimógeno relacionada con la coagulación. Así, en tales realizaciones preferidas un zimógeno y un enlazador correspondiente se activan y se escinden respectivamente, con cinéticas comparables. Por esta razón, la presente invención se refiere también particularmente a proteínas de fusión de un zimógeno y un HLEP, donde la cinética de la escisión del enlazador por proteasas relevantes no se retarda en más de un Factor de 3, y muy preferentemente no en más de un Factor de 2
30 comparada con la cinética de la activación del zimógeno.

En una realización adicional, el péptido enlazador comprende sitios de escisión para más de una proteasa. Esto puede conseguirse por un péptido enlazador que puede ser escindido en la misma posición por diferentes proteasas o por un péptido enlazador que proporciona dos o más sitios de escisión diferentes. Esto puede ser ventajoso en
35 circunstancias en las que la proteína de fusión terapéutica tiene que ser activada por escisión proteolítica para conseguir actividad enzimática y en las que proteasas diferentes puedan contribuir a este paso de activación. Éste es el caso, por ejemplo, después de la activación de FIX, que puede ser conseguida por FXIa o por FVIIa/Factor Tisular (TF).

40 Realizaciones preferidas de la invención son proteínas de fusión terapéuticas en las cuales el enlazador es escindible por la proteasa, que activa el factor de coagulación, asegurando con ello que la escisión del enlazador está unida a la activación del factor de coagulación en un sitio en el que ocurre coagulación.

Otras proteínas de fusión terapéuticas preferidas conforme a la invención son aquellas en las cuales el enlazador es escindible por el factor de coagulación que forma parte de la proteína de fusión terapéutica una vez que se activa la misma, asegurando así también que la escisión de la proteína de fusión está conectada con un evento de coagulación.

45 Otras proteínas de fusión terapéuticas preferidas conforme a la invención son aquellas en las cuales enlazador es escindible por una proteasa, que es activada por sí misma directamente o indirectamente por la actividad del factor de coagulación que forma parte de la proteína de fusión terapéutica, asegurando así también que la escisión de la proteína de fusión está conectada con un evento de coagulación.

Una clase de proteínas de fusión terapéuticas muy preferidas son aquellas en las cuales el enlazador es escindible por FXIa y/o por FVIIa/TF y el factor de coagulación es FIX.

50 La esencia de la invención se demuestra en particular por el factor IX polipeptídico dependiente de vitamina K, enlazadores escindibles y albúmina como HLEP así como sus correspondientes secuencias de ADNc. La divulgación se refiere también a secuencias de ADNc que codifican cualesquiera otros factores de coagulación que pueden ser activados proteolíticamente o que están implicados en la activación de otros zimógenos o polipéptidos. Estos ADNcs están fusionados genéticamente a secuencias de ADNc que codifican albúmina de suero humana u otros HLEP, y
55 están enlazados por oligonucleótidos que codifican enlazadores peptídicos escindibles interpuestos. Las proteínas de

fusión terapéuticas expresadas exhiben actividades molares específicas que están aumentadas en comparación con sus homólogos no-escindibles. La divulgación se refiere también a vectores de expresión recombinantes que contienen tales secuencias de ADNc fusionadas, células hospedadoras transformadas con tales vectores de expresión recombinantes, proteínas de fusión terapéuticas recombinantes y derivados que tienen actividades biológicas cuasi comparables con los polipéptidos terapéuticos de tipo salvaje no modificados pero que tienen semivida aumentada *in vivo*. La divulgación se refiere también a procesos para la fabricación de tales polipéptidos recombinantes y sus derivados. La divulgación cubre también un vector de transferencia para uso en terapia génica humana, que comprende tales secuencias de DNA modificadas útiles para aumentar los niveles de producto *in vivo*.

Proteínas de fusión terapéuticas preferidas conforme a la invención son aquellas que tienen una actividad molar específica, en particular una actividad molar específica en al menos un ensayo relacionado con la coagulación que está aumentada al menos 25% comparada con la de una proteína de fusión terapéutica sin un enlazador escindible. Son más preferidas proteínas de fusión terapéuticas en las cuales la actividad molar específica está aumentada al menos un 50%, y son aún más preferidas aquellas en las cuales la actividad molar específica está aumentada al menos un 100%, en al menos uno de los diferentes ensayos disponibles relacionados con la coagulación.

Realizaciones preferidas adicionales de la presente invención son proteínas de fusión terapéuticas, en las cuales la velocidad de desactivación del factor de coagulación activado después de escisión del enlazador peptídico que une el factor de coagulación al polipéptido mejorador de la semivida está aumentada en al menos 10% comparada con la velocidad de desactivación del factor de coagulación activado en una proteína de fusión terapéutica correspondiente sin un enlazador escindible. Son más preferidas proteínas de fusión terapéuticas en las cuales la velocidad de desactivación está aumentada en al menos 25%, y aún más preferidas aquellas en las cuales la velocidad de desactivación está aumentada en al menos 50%.

Realizaciones preferidas adicionales de la presente invención son proteínas de fusión terapéuticas, en las cuales la velocidad de eliminación del factor de coagulación después de escisión del enlazador peptídico que une el factor de coagulación al polipéptido mejorador de la semivida está aumentada en al menos 10% comparada con la velocidad de eliminación del factor de coagulación en una proteína de fusión terapéutica correspondiente sin un enlazador escindible. Son más preferidas proteínas de fusión terapéuticas en las cuales la velocidad de eliminación está aumentada en al menos 25%, y aún más preferidas aquellas en las cuales la velocidad de eliminación está aumentada en al menos 50%.

Descripción detallada

Polipéptidos dependientes de vitamina K

Polipéptidos dependientes de vitamina K como un grupo de los polipéptidos terapéuticos son polipéptidos que se carboxilan enzimáticamente en posición y en el hígado utilizando vitamina K como cofactor. Tales polipéptidos dependientes de vitamina K son por ejemplo los factores II, VII, IX, X, Proteína C, Proteína S, GAS6, y Proteína Z.

FIX humano

FIX humano, un miembro del grupo de polipéptidos dependientes de vitamina K, es una glicoproteína monocaténaria con un peso molecular de 57 kDa, que es secretada por las células del hígado en el torrente sanguíneo como un zimógeno inactivo de 415 aminoácidos. El mismo contiene 12 residuos de ácido γ -carboxi-glutámico localizados en el dominio Gla N-terminal del polipéptido. Los residuos Gla requieren vitamina K para su biosíntesis. Después del dominio Gla existen dos dominios de Factor de crecimiento epidérmico, un péptido de activación, y un dominio de serina-proteasa tipo tripsina. Modificaciones adicionales posteriores a la traducción de FIX abarcan hidroxilación (Asp 64), N-(Asn157 y Asn167) así como glicosilación tipo O (Ser53, Ser61, Thr159, Thr169, y Thr172), sulfatación (Tyr155), y fosforilación (Ser158).

FIX se convierte en su forma activa, Factor IXa, por proteólisis del péptido de activación en Arg145-Ala146 y Arg180-Val181 que conduce a la formación de dos cadenas polipeptídicas, una cadena ligera N-terminal (18 kDa) y una cadena pesada C-terminal (28 kDa), que se mantienen unidas por un puente disulfuro. La escisión de activación del Factor IX puede ocurrir *in vitro* e. g. por Factor XIa o Factor VIIa/TF. El Factor IX está presente en el plasma humano en una concentración de 5-10 $\mu\text{g/ml}$. Se ha encontrado que la semivida terminal en plasma del Factor IX en humanos es aproximadamente 15 a 18 horas (White GC et al. 1997. Recombinant Factor IX. Thromb Haemost. 78: 261-265; Ewenstein BM et al. 2002. Pharmacokinetic analysis of plasma-derived and recombinant FIX concentrates in previously treated patients with moderate or severe hemophilia B. Transfusion 42:190-197).

La hemofilia B está causada por Factor IX no funcional o ausente, y se trata con concentrados de Factor IX de plasma o una forma recombinante de Factor IX. Dado que los pacientes de hemofilia B reciben a menudo al menos administraciones profilácticas bisemanales de Factor IX a fin de evitar hemorragias espontáneas, es deseable aumentar los intervalos entre administraciones por aumento de la semivida del producto Factor IX aplicado. Una mejora de la semivida en plasma podría aportar un beneficio importante al paciente. Hasta ahora no está disponible comercialmente ninguna preparación farmacéutica de un Factor IX con semivida en plasma mejorada ni se ha publicado dato alguno que exhiba variantes de FIX con semivida *in vivo* prolongada y actividad molar específica prácticamente inalterada en ensayos basados en coagulación. Por tanto, existe todavía una

gran necesidad médica de desarrollar formas de Factor IX que tengan una semivida funcional *in vivo* más larga.

Factor VII y Factor VIIa

FVII es una glicoproteína monocaténaria que tiene un peso molecular de 50 kDa, que es secretada por las células del hígado en el torrente sanguíneo como un zimógeno inactivo de 406 aminoácidos. FVII se convierte en su forma activa Factor VIIa, por proteólisis del enlace peptídico simple en Arg152-Ile153 conduciendo a la formación de dos cadenas polipeptídicas, una cadena ligera N-terminal (24 kDa) y una cadena pesada C-terminal (28 kDa), que se mantienen unidas por un puente disulfuro. En contraste con otros factores de la coagulación dependientes de vitamina K, no se escinde péptido de activación alguno durante la activación. La escisión de activación del Factor VII puede lograrse *in vitro*, por ejemplo, por Factor Xa, Factor IXa, Factor VIIa, Factor XIIa, Proteasa Activadora del Factor Siete (FSAP), y trombina. Møllerup et al. (Biotechnol. Bioeng. (1995) 48: 501-505) consignaron que ocurre también cierta escisión en la cadena pesada en Arg290 y/o Arg315.

El Factor VII está presente en plasma en una concentración de 500 ng/ml. Aproximadamente 1% o 5 ng/ml de Factor VII está presente como Factor VIIa activado. Se ha encontrado que la semivida terminal en plasma del Factor VII es aproximadamente 4 horas y la del Factor VIIa aproximadamente 2 horas.

Por administración de concentraciones suprafisiológicas de Factor VIIa puede conseguirse la hemostasis obviando la necesidad de Factor VIIIa y Factor IXa. La clonación del ADNc para Factor VII (US 4. 784. 950) hizo posible desarrollar Factor VII activado como producto farmacéutico. El Factor VIIa se administró con éxito por primera vez en 1988. Desde entonces el número de indicaciones de Factor VIIa ha aumentado constantemente exhibiendo un potencial para llegar a ser un agente hemostático universal para la detención de las hemorragias (Erhardtson, 2002). Sin embargo, la corta semivida terminal de Factor VIIa de aproximadamente 2 horas y su reducida recuperación *in vivo* están limitando su aplicación. Por tanto, existe todavía una gran necesidad médica de desarrollar formas de Factor VIIa que tengan una semivida mejorada, pero por otra parte actividad molar específica, cinética de desactivación, y/o cinética de eliminación prácticamente inalterables después del comienzo de la coagulación.

Proteínas de fusión terapéuticas

Las "proteínas de fusión terapéuticas" en el sentido de esta invención son factores de coagulación seleccionados de la lista que consiste en Factor IX, Factor VIII, Factor de van Willebrand, Factor V, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, Factor I, Factor II (Protrombina), Proteína C, Proteína S, GAS6 y Proteína Z fusionados a un polipéptido mejorador de la semivida que, después de la administración a un humano o animal, pueden producir un efecto profiláctico o terapéutico. Estas proteínas de fusión terapéuticas pueden administrarse a un humano o un animal por vía intravenosa, intramuscular, oral, tópica, parenteral u otras rutas. Clases específicas de proteínas de fusión terapéuticas abarcan, a saber, por los ejemplos de esta invención, son factores de coagulación como por ejemplo polipéptidos dependientes de vitamina K enlazados a polipéptidos mejoradores de la semivida como por ejemplo albúmina e inmunoglobinas y sus fragmentos o derivados. La expresión "proteína de fusión terapéutica" se utiliza de modo intercambiable con "proteína de fusión".

Polipéptido mejorador de la semivida (HLEP)

Albúmina, miembros de la familia de albúmina e inmunoglobulinas y sus fragmentos o derivados se han descrito arriba como ejemplos de polipéptidos mejoradores de la semivida (HLEPs). Las expresiones "seroalbúmina humana" (HSA) y "albúmina humana" (HA) se utilizan intercambiabilmente en esta solicitud. Los términos "albúmina" y "seroalbúmina" son más amplios, y abarcan seroalbúmina humana (y fragmentos y variantes de la misma) así como albúmina de otras especies (y fragmentos y variantes de la misma).

Como se utiliza en este documento, "albúmina" se refiere colectivamente al polipéptido o secuencia de aminoácidos de albúmina, o un fragmento o variante de albúmina que tiene una o más actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas) de albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a albúmina humana o fragmentos de la misma, especialmente la forma madura de albúmina humana como se muestra en SEQ ID No:1 en este documento o albúmina de otros vertebrados o fragmentos de la misma, o análogos o variantes de estas moléculas o fragmentos de los mismos.

La porción albúmina de las proteínas de fusión de albúmina puede comprender la longitud total de la secuencia HA como se ha descrito arriba, o puede incluir uno o más fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica. Tales fragmentos pueden ser de 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50, o más aminoácidos contiguos de la secuencia HA o pueden incluir parte o la totalidad de dominios específicos de HA.

La porción albúmina de las proteínas de fusión de albúmina de la divulgación puede ser una variante de HA normal, sea natural o artificial. La porción del polipéptido terapéutico de las proteínas de fusión de la invención pueden ser también variantes de los polipéptidos terapéuticos correspondientes que se describen en este documento. El término "variantes" incluye inserciones, delecciones, y sustituciones, sean conservadoras o no-conservadoras, naturales o artificiales, donde tales cambios no alteran sustancialmente el sitio activo, o dominio activo que confiere las actividades terapéuticas de los polipéptidos terapéuticos.

En particular, las proteínas de fusión de albúmina de la divulgación pueden incluir variantes polimórficas de albúmina humana y fragmentos de albúmina humana existentes naturalmente. La albúmina puede derivarse de cualquier vertebrado, especialmente de cualquier mamífero, por ejemplo, humano, vaca, oveja, o cerdo. Albúminas no de mamífero incluyen, pero sin carácter limitante, gallina y salmón. La porción albúmina del polipéptido unido a albúmina puede ser de un animal diferente que la porción del polipéptido terapéutico.

Hablando en términos generales, un fragmento o variante de albúmina tendrá al menos 10, preferentemente al menos 40, y muy preferentemente más de 70 aminoácidos de longitud. La variante de albúmina puede estar constituida preferentemente por o comprender alternativamente al menos un dominio completo de albúmina o fragmentos de dichos dominios, por ejemplo los dominios 1 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO:1), 2 (aminoácidos 195-387 de SEQ ID NO: 1), 3 (aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 1), 1 + 2 (1-387 de SEQ ID NO: 1), 2 + 3 (195-585 de SEQ ID NO: 1) ó 1 + 3 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 1 + aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 1). Cada dominio está constituido en sí mismo por dos subdominios homólogos, a saber 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, con regiones enlazadoras flexibles inter-subdominios que comprenden los residuos Lys106 a Glu119, Glu292 a Val315, y Glu492 a Ala511.

La porción albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la divulgación puede comprender al menos un subdominio o dominio de HA o modificaciones conservadoras del mismo.

Todos los fragmentos y variantes de albúmina están abarcados por la descripción como socios de fusión de un factor de coagulación con tal que los mismos conduzcan a un aumento de la semivida de la proteína terapéutica de fusión en plasma de al menos 25% comparado con el factor de coagulación no fusionado.

Además de la albúmina, se ha reivindicado que la alfa-fetoproteína, otro miembro de la familia de albúmina, mejora la semivida *in vivo* de un polipéptido terapéutico unido (WO 2005/024044). La familia de albúmina de proteínas, proteínas de transporte del suero evolutivamente afines, está constituida por albúmina, alfa-fetoproteína (AFP; Beattie & Dugaiczky 1982. Gene 20:415-422), afamina (AFM; Lichenstein et al. 1994. J. Biol. Chem. 269:18149-18154) y proteína de fijación de vitamina D (DBP; Cooke & David 1985. J. Clin. Invest. 76:2420-2424). Sus genes representan un grupo multigénico con semejanzas estructurales y funcionales que mapean en la misma región cromosómica en humanos, ratones y ratas. La semejanza estructural de los miembros de la familia de albúmina sugiere su utilidad como HLEPs. Por esta razón, se describe también en este documento el uso de tales miembros de la familia de albúmina, fragmentos y variantes de los mismos como HLEPs. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, sean conservadoras o no-conservadoras, con tal que esté presente todavía la función deseada.

Los miembros de la familia de albúmina pueden comprender la longitud total de la proteína AFP, AFM y DBP respectiva, o pueden incluir uno o más fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica. Tales fragmentos pueden ser de 10 o más aminoácidos de longitud, o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50, o más aminoácidos contiguos de la secuencia proteínica respectiva o pueden incluir parte o la totalidad de dominios específicos de la proteína respectiva, con tal que los fragmentos HLEP proporcionen una prolongación de la semivida de al menos 25% en comparación con el factor de coagulación no fusionado. Los miembros de la familia de albúmina de las proteínas de fusión terapéuticas de la divulgación pueden incluir variantes polimórficas de AFP, AFM y DBP existentes naturalmente.

Pueden utilizarse también como HLEPs IgG y fragmentos de IgG, con tal que los fragmentos HLEP proporcionen una extensión de la semivida de al menos 25% en comparación con el factor de coagulación no fusionado. La porción del polipéptido terapéutico está conectada a la IgG o los fragmentos de IgG por un enlazador escindible que permite actividades molares específicas altas de la proteína de fusión. Ejemplos para moléculas de fusión Factor VII/VIIa y Factor IX IgG se encuentran, por ejemplo, en WO 2005/001025. Dicho documento da a conocer, a saber, un homodímero que comprende dos moléculas de Factor VII (Factor VIIa) y dos moléculas Fc y un híbrido monómero/dímero constituido por una molécula FVII (FVIIa) y dos moléculas Fc, exhibiendo el monómero/dímero una actividad de coagulación aproximadamente cuatro veces mayor que el homodímero. Una secuencia enlazadora de la presente invención que libere las moléculas FVII (FVIIa) después de escisión por una proteasa de la cascada de coagulación como, por ejemplo, FXIa, FXa, o FIXa podría aumentar la actividad de coagulación de los constructos y especialmente la del homodímero hasta un nivel de actividad comparable al homodímero/dímero o incluso mayor. Una proteína de fusión FIX-Fc con enlazador escindible se muestra ilustrativamente en SEQ ID No 93. En este caso pueden aplicarse enlazadores escindibles tales como los representados en la Tabla 3a y 3b.

La invención se refiere específicamente a proteínas de fusión que comprenden enlazar un factor de coagulación al término N o C de un HLEP o fragmento o variante del mismo tal que se introduce un enlazador peptídico escindible interpuesto entre el polipéptido terapéutico y el HLEP de tal manera que la proteína de fusión formada tiene una semivida *in vivo* aumentada comparada con el factor de coagulación que no se ha enlazado a un HLEP y que la proteína de fusión tiene una actividad molar específica al menos 25% mayor comparada con la proteína de fusión correspondiente con enlazador no-escindible en al menos uno de los diferentes ensayos relacionados con la coagulación disponibles.

La expresión "factor de coagulación" como se utiliza en esta solicitud incluye, pero sin carácter limitante, polipéptidos constituidos por Factor IX, Factor VII, Factor VIII, Factor von Willebrand, Factor V, Factor X, Factor XI, Factor XII,

Factor XIII, Factor I, Factor II (Protrombina), Proteína C, Proteína S, GAS6, o Proteína Z, así como sus formas activadas. Adicionalmente, polipéptidos terapéuticos útiles pueden ser polipéptidos de tipo salvaje o pueden contener mutaciones. El grado y la localización de la glicosilación u otras modificaciones posteriores a la traducción pueden variar dependiendo de las células hospedadoras seleccionadas y de la naturaleza del entorno celular del hospedador.

5 Cuando se hace referencia a secuencias de aminoácidos específicas, están abarcadas en esta solicitud modificaciones posteriores a la traducción de tales secuencias.

La expresión "factor de coagulación" dentro de la definición anterior incluye polipéptidos que tienen la secuencia natural de aminoácidos que incluye cualesquiera polimorfismos naturales. La misma incluye también polipéptidos con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N-terminal o C-terminal modificado que incluye delecciones o adiciones de aminoácidos terminales, con tal que dichos polipéptidos retengan sustancialmente la actividad del polipéptido terapéutico respectivo. Las variantes incluidas difieren en uno o más residuos de aminoácido de secuencia de tipo salvaje. Ejemplos de tales diferencias pueden incluir truncación del término N y/o C en uno o más residuos de aminoácido (por ejemplo, preferentemente 1 a 30 residuos de aminoácido), o la adición de uno o más residuos extra en el término N y/o C, así como sustituciones de aminoácidos conservadoras, es decir sustituciones realizadas en grupos de aminoácidos con características similares, por ejemplo (1) aminoácidos pequeños, (2) aminoácidos de carácter ácido, (3) aminoácidos polares, (4) aminoácidos de carácter básico, (5) aminoácidos hidrófobos, y (6) aminoácidos aromáticos. Ejemplos de tales sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla siguiente.

Tabla 1

(1)	Alanina	Glicina		
(2)	Ácido aspártico	Ácido glutámico		
(3a)	Asparagina	Glutamina		
(3b)	Serina	Treonina		
(4)	Arginina	Histidina	Lisina	
(5)	Isoleucina	Leucina	Metionina	Valina
(6)	Fenilalanina	Tirosina	Triptófano	

La semivida *in vivo* de las proteínas de fusión de la invención, determinada en general como semivida terminal o semivida β , es por lo general al menos aproximadamente 25%, con preferencia al menos aproximadamente 50%, y de modo más preferible más de 100% mayor que la semivida *in vivo* del polipéptido no fusionado.

Las proteínas de fusión de la presente invención tienen al menos un 25%, con preferencia al menos un 50%, con más preferencia una actividad molar específica aumentada al menos 100% en comparación con las proteínas de fusión correspondientes sin enlazadores escindibles.

A este respecto, la actividad molar específica (o actividad molar específica relacionada con la coagulación como se considera en particular aquí) se define como la actividad expresada por mol (o por ejemplo nmol) del polipéptido terapéutico o proteína de fusión terapéutica de interés. El cálculo de la actividad molar específica permite una comparación directa de la actividad de los diferentes constructos que no se ve afectada por los diferentes pesos moleculares o densidades ópticas de los polipéptidos estudiados. La actividad molar específica puede calcularse como se ilustra en la Tabla 2 a continuación para FIX y una proteína de fusión FIX-HSA.

Tabla 2: Cálculo de la actividad molar específica como se muestra para una proteína de fusión FIX-HSA

Producto	DO _(280nm, 1%)	PM	Actividad /Vol/DO ₂₈₀ (UI/L/DO ₂₈₀)	Densidad óptica molar (DO ₍₂₈₀₎ a 1 mol/L)	Cálculo de la actividad molar específica (UI/mol)
FIX	13,3 ¹⁾	57 000	determinada para el producto	75810 (= PM x DO _(280, 1%) /10)	=(Actividad/Vol/DO ₂₈₀) x (DO ₂₈₀ a 1 mol/L)

Producto	DO _(280nm, 1%)	PM	Actividad /Vol/DO ₂₈₀ (UI/L/DO ₂₈₀)	Densidad óptica molar (DO ₍₂₈₀₎ a 1 mol/L)	Cálculo de la actividad molar específica (UI/mol)
HSA	5,7 ²⁾	66 300		37791 (= PM x DO _{(280, 1%)/10})	
FIX-HSA			determinada para el producto	113601 (= suma de la densidad óptica molar de FIX y HSA)	= (Activity/Vol/DO ₂₈₀) x (DO ₂₈₀ a 1 mol/L)
1) R. D. Di Scipio et al., Biochem. 16: 698-706 (1977) 2) C. Chaudhury et al, J. Exp. Med. 197(3): 315-322 (2003)					

Con objeto de determinar una actividad molar específica relacionada con la coagulación, puede utilizarse cualquier ensayo que determine las actividades enzimáticas o de cofactor que son relevantes para el proceso de coagulación.

- En este caso, "ensayo relacionado con la coagulación" en el sentido de la invención es cualquier ensayo que determine las actividades enzimáticas o de cofactor que son de relevancia en el proceso de coagulación o que son capaces de determinar que se ha activado la cascada de coagulación intrínseca o la extrínseca. El ensayo "relacionado con la coagulación" puede ser por tanto un ensayo de coagulación directa como aPTT, PT, o los ensayos de generación de trombina. Sin embargo, están incluidos también otros ensayos tales como, por ejemplo, ensayos cromógenos aplicados para factores de coagulación específicos. Ejemplos de tales ensayos o reactivos correspondientes son Pathromtin® SL (ensayo aPTT, Dade Behring) o Thromborel® S (ensayo de Tiempo de Protrombina, Dade Behring) con plasma deficiente en el factor de coagulación correspondiente (Dade Behring), kits de ensayos de generación de trombina (Technoclone, Thrombinoscope) que utilizan por ejemplo plasma deficiente en factores de coagulación, ensayos cromógenos como Biophen Factor IX (Hyphen BioMed), Staclot® FVlla-rTF (Roche Diagnostics GmbH), Coatest® Factor VIII:C/4 (Chromogenix), u otros.
- Para los propósitos de esta invención, un aumento en uno cualquiera de los ensayos anteriores o un ensayo equivalente relacionado con la coagulación se considera que exhibe un aumento en la actividad molar específica. Por ejemplo, un aumento de 25% se refiere a un aumento de 25% en cualquiera de los ensayos anteriores o un ensayo equivalente.
- Para determinar si las proteínas de fusión terapéuticas caen dentro del alcance de la presente invención, el estándar contra el cual se compara la actividad molar específica de estas proteínas es un constructo en el cual el factor de coagulación respectivo y el HLEP respectivo están unidos por un enlazador no-escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGGV.
- En el caso de FIX, se utilizan a menudo ensayos aPTT para la determinación de la actividad de coagulación. Un ensayo de coagulación de este tipo (ensayo aPTT) se describe en el ejemplo 5 con más detalle. Sin embargo, pueden aplicarse otros ensayos o principios de ensayo relacionados con la coagulación a fin de determinar la actividad molar específica para FIX.
- Los fármacos constituidos por polipéptidos terapéuticos recombinantes son usualmente caros y no todos los países pueden proporcionar terapias costosas basadas en tales fármacos. El aumento de la recuperación *in vivo* de tales fármacos podría hacer más barato el uso de estos productos y subsiguientemente podrían beneficiarse de ellos más pacientes. En el caso de las proteínas de fusión de la presente invención, una mayor recuperación *in vivo* sería también una ventaja deseable. "Recuperación *in vivo*" en el sentido de la invención significa la cantidad de producto encontrada en sangre o plasma poco después de la administración del producto. Por tanto, para la detección de la recuperación *in vivo* en general se determina el contenido en plasma unos pocos minutos (por ejemplo 5 ó 15 minutos) después de la administración del producto.
- Aunque es deseable lograr una recuperación *in vivo* alta y una semivida larga para un factor de coagulación no-activado, es ventajoso limitar la semivida de un factor de coagulación después de su activación o de la activación de su cofactor a fin de evitar un riesgo protrombótico. Por tanto, después que se ha iniciado el proceso de coagulación, debería reducirse de nuevo la semivida del factor de coagulación activo. Esto puede lograrse por aumento de la desactivación de un modo relacionado con la coagulación o por eliminación del factor de coagulación.
- La desactivación conforme a la presente invención significa la disminución de actividad del polipéptido terapéutico que puede estar causada, por ejemplo, por formación de un complejo entre un factor de coagulación y un inhibidor del factor de coagulación correspondiente o por escisión proteolítica ulterior como se conoce, por ejemplo, en el caso de FVIII y FV.

La velocidad de desactivación de una proteína de fusión terapéutica activada se define como la velocidad de disminución de la actividad, por ejemplo, por reacción con inhibidores o por desactivación proteolítica. La velocidad de desactivación puede medirse siguiendo la actividad molar específica del factor de coagulación activado a lo largo del tiempo en presencia de cantidades fisiológicas de inhibidores de este factor de coagulación. Alternativamente, la velocidad de desactivación puede determinarse después de la administración del producto activado a un animal seguido por ensayo de muestras de plasma en un marco de tiempo apropiado utilizando ensayos de actividad y antígeno.

Cuando en el caso de las proteínas de fusión terapéuticas es necesaria una determinación de si estas proteínas caen dentro del alcance de la presente invención, el estándar contra el cual se compara la velocidad de desactivación de estas proteínas terapéuticas es un constructo en el cual el factor de coagulación respectivo y el HLEP respectivo están unidos por un enlazador no-escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGGV.

La velocidad de eliminación de una proteína de fusión terapéutica activada se define como la velocidad a la que el polipéptido se elimina de la circulación de humanos o animales. La velocidad de eliminación puede determinarse por medida de la farmacocinética de la proteína de fusión terapéutica activada después de administración intravenosa. Utilizando un ensayo de antígeno, la eliminación puede determinarse por retirada directa de la circulación. Utilizando adicionalmente un ensayo de actividad, puede determinarse una velocidad específica de eliminación y desactivación.

Cuando, en el caso de las proteínas de fusión terapéuticas es necesaria una determinación de si estas proteínas caen dentro del alcance de la presente invención, el estándar contra el cual se compara la velocidad de desactivación de estas proteínas terapéuticas es un constructo en el cual el factor de coagulación respectivo y el HLEP respectivo están unidos por un enlazador no-escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGGV.

Conforme a esta invención, el resto del polipéptido terapéutico está acoplado al resto HLEP por un enlazador peptídico escindible. El enlazador debería ser no-inmunógeno y debería ser suficientemente flexible para permitir la escisión por proteasas. La escisión del enlazador debería transcurrir con rapidez comparable a la activación del polipéptido terapéutico dentro de la proteína de fusión, si la proteína de fusión es un zimógeno.

El enlazador escindible comprende preferentemente una secuencia derivada

- a) del polipéptido terapéutico a administrar propiamente dicho si el mismo contiene sitios de escisión proteolítica que se escinden proteolíticamente durante la activación del polipéptido terapéutico,
- b) de un polipéptido sustrato de este polipéptido terapéutico, o
- c) de un polipéptido sustrato escindido por una proteasa que se activa o se forma por la implicación directa o indirecta del polipéptido terapéutico.

En una realización más preferida, la región enlazadora comprende una secuencia del polipéptido terapéutico a aplicar, lo cual debería dar como resultado un riesgo disminuido de propiedades neoantigénicas de la proteína de fusión expresada. Asimismo, en el caso en que la proteína terapéutica es un zimógeno (por ejemplo necesita ser activada proteolíticamente) la cinética de la escisión del enlazador peptídico reflejará más estrechamente la cinética de activación del zimógeno relacionada con la coagulación.

En una realización preferida, el polipéptido terapéutico es zimógeno FIX y el HLEP es albúmina. En este caso, la secuencia enlazadora se deriva, o bien de las secuencias de las regiones de activación de FIX, de la región de escisión de cualquier sustrato de FIX como FX o FVII o de la región de escisión de cualquier polipéptido sustrato que es escindido por una proteasa en cuya activación está implicado FIXa.

En una realización muy preferida, el péptido enlazador se deriva de FIX propiamente dicho. En otra realización preferida, el péptido enlazador se deriva de FX o FVII. En otra realización preferida, la secuencia enlazadora comprende dos secuencias de escisión que pueden ser escindidas por FXIa o FVIIa/TF, dos activadores de FIX fisiológicamente relevantes.

Combinaciones ejemplares de polipéptido terapéutico, enlazador escindible y HLEP con factores de coagulación seleccionados de la lista que consiste en Factor IX, Factor VIII, Factor de van Willebrand, Factor V, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, Factor I, Factor II (Protrombina), Proteína C, Proteína S, GAS6 y Proteína Z se incluyen en los constructos enumeradas en las tablas 3a y 3b, pero no se limitan a estas:

Tabla 3a: Ejemplos de constructos posibles

factor de coagulación	Enlazador	HLEP	Enlazador derivado de (con modificaciones, en caso aplicable)	SEQ ID NO:
	Enlazador no-escindible o no-escindible con suficiente rapidez			
FIX	-	HSA		
FIX	RI	HSA		
FIX	GGGGGGV(Sheffield et al.)	HSA		94
FIX	(GGS) _n GS	HSA		
FIX	SS(GGS) ₇ GS	HSA		30
FIX	SSNGS(GGS) ₃ NGS(GGS) ₃ GGNGS	HSA		31
	Enlazador con un solo sitio de escisión			
FIX (1-412)	SVSQTSKL TRA ETVFPD VD	HSA	FIX	36
FIX (1-412)	SVSQTSKL TR TAETVFPD VD GS	HSA	FIX	37
FIX	SVSQTSKL TRA ETVFPD VD	HSA	FIX	38
FIX	SVSQTSKL TRA ETVFPD VD GS GGS	HSA	FIX	95
FIX	SVSQTSKL TRA ETVFPD VD GS	HSA	FIX	39
FIX	SVSQTSKL TRA ETVFPD VD NGS	HSA	FIX	40
FIX	SVSQTSKL TRA ETVFPD V	HSA	FIX	96
FIX	QTSKL TR AETVFPD V	HSA	FIX	97
FIX	SKL TRA ETVFPD V	HSA	FIX	98
FIX	SVSQTSKL TRA ETVFP	HSA	FIX	99
FIX	SVSQTSKL TRA ETV F	HSA	FIX	100
FIX	QTSKL TR AETV F	HSA	FIX	101
FIX	SKL TRA ETV F	HSA	FIX	102
FIX	SVSQTSKL TRA ET	HSA	FIX	103

(continuación)

factor de coagulación	Enlazador	HLEP	Enlazador derivado de (con modificaciones, en caso aplicable)	SEQ ID NO:
	Enlazador no-escindible o no-escindible con suficiente rapidez			
FIX	QTSKLTR AET	HSA	FIX	104
FIX	SKLTRAET	HSA	FIX	105
FIX	SVSQTSKLTRGETVFPDVG	HSA	FIX	41
FIX	SVSQTSKLTRTETVFPDVG	HSA	FIX	42
FIX	SVSQTSKLTRSETVFPDVG	HSA	FIX	43
FIX	SVSQTSKLTRLETVFPDVG	HSA	FIX	44
FIX	SVSQTSKLTRTEAVFPDVG	HSA	FIX	45
FIX	SVSQTSKLTRGEAVFPDVG	HSA	FIX	46
FIX	QTSKLTRAETVFPDVG GS	HSA	FIX	106
FIX	SKLTRAETVFPDVG GS	HSA	FIX	107
FIX	SKLTRAETVFPDVG	HSA	FIX	47
FIX	QSFNDFTRWGGE	HSA	FIX	48
	Enlazador con un solo sitio de escisión			
FIX	QSFNDFTR WGGE GS	HSA	FIX	49
FIX	QSFNDFTRVVGGE	HSA	FIX	108
FIX	QSFNDFTRTVGGE	HSA	FIX	50
FIX	QSFNDFTRLVGGE	HSA	FIX	51
FIX	QSFNDFTRGVGGE	HSA	FIX	52
FIX	QSFNDFTRVVGGE NGS	HSA	FIX	53
FIX	QSFNDFTRVVGGE DN	HSA	FIX	54
FIX	PERGDNNLTRIVGGQE GS	HSA	FX	109

(continuación)

	Enlazador con un solo sitio de escisión			
FIX	PERGDNNL TR IVGGQE	HSA	FX	61
FIX	PERGDNNL TR IVGGQ	HSA	FX	110
FIX	DNNL TR IVGGQ	HSA	FX	111
FIX	SVSQTSKL TRA ETVFPD VD	Fc	FIX	62
FIX	QSFNDF TR VVGGED N	Fc	FIX	63
FIX (1-412)	SVSQTSKL TR AETVFPD VD	Fc	FIX	64
FIX	ASKPQ GRI VGG	HSA delDAH	FVII	112
FIX	KRNASKPQ GRI VGGKV	HSA	FVII	65
FIX	PEEPQL RM KNNEEAED	HSA	FVIII	66
FIX	DNPSF IQIR SVAKKHPKT	HSA	FVIII	67
FIX	LSKNNAIE PR SFSQNSRHPS	HSA	FVIII	68
FIX	DEDENQSP RS FQKKTRHYFIA	HSA	FVIII	69
FIX	SPHVL RNRA QSGSVPQ	HSA	FVIII	70
FVII o FVIIa	PEEPQL RM KNNEEAEDYDDDLTDS	HSA	FVIII	71
FVII o FVIIa	DDDN SPSFIQIR SVAKKHPKTWWHYAAEEED	HSA	FVIII	72
FVII o FVIIa	LSKNNAIE PR SFSQNS RHP STRQKQFNA	HSA	FVIII	73
FVII o FVIIa	DEDENQSP R SFQKKTRH YFIAA	HSA	FVIII	74
FVII o FVIIa	DYGMSSSPHVL RNRA QSGSVPQFKKVVFQEFT	HSA	FVIII	75
FVIII	Derivado de los sitios de escisión de FVIII, FIX, o Fibrinógeno	HSA	FVIII, FIX o Fgn	
VWF	Derivado de los sitios de escisión de VWF, FVIII o FIX	HSA	FIX, FVIII, VWF	
VWF	DIYDEDENQSP RS FQKKTRHYFIA	HSA	FVIII	76
VWF	DNPSF IQIR SVAKKHP	HSA	FVIII	77
VWF	LSKNNAIE PR SFSQNSRHPS	HSA	FVIII	78

En el caso de enlazadores derivados de la región N-terminal del péptido de activación de FIX, conforme al polimorfismo natural T148-A148, las secuencias pueden contener también A en lugar de T en esta posición.

Tabla 3b: Ejemplos de constructos posibles con dos o más sitios de escisión

factor de coagulación	Enlazador	HLEP	Enlazador derivado de (que incluye modificaciones parcialmente)	SEQ ID NO:
	Enlazador con dos sitios de escisión			
FIX	SVSQTSKL TRA ETVFPDVTQPERGDN NLT RIVGGQE	HSA	FIX, FX	79
FIX	SKL TRA ETVFPD NNLT RIVGGQE	HSA	FIX, FX	80
FIX	RA ETVFPDVTQPERGDN NLT RIVGGQE	HSA	FIX FX	81
FIX	RA ETVFPERGDN NLT RIVGGQE	HSA	FIX FX	82
FIX	SVSQTSKL TRA ETVFPD VDYV NNLT R IVGGQE	HSA	FIX, FX	83
FIX	SVSQTSKL TRA ETVFPD VD NNLT R IVGGQE	HSA	FIX, FX	84
FIX	SVSQTSKL TRA ETVFPD VD NNLT R IVGGQE	HSA	FIX, FX	85
FIX	SVSQTSKL TRA ETVFPD VDYVN STE AETILD NITQSTQSFN DFTRVVG GEDA	HSA	FIX	86
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDVQSFNDFTRVVG GED	HSA	FIX	87
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDVDSFNDFTRVVG GED	HSA	FIX	88
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDVNASKPQ GR IVGGKV	HSA	FIX y FVII	89
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDVNASKPQ GR LVGGKV	HSA	FIX y FVII	90
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDVNASKPQ GR TVGGKV	HSA	FIX y FVII	91
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPD VD	Fc		92

5 Variantes y fragmentos de los enlazadores descritos están abarcadas también en la presente invención con tal que el enlazador pueda ser escindido todavía por la proteasa o las proteasas, que escinden los enlazadores de las tablas 3a y 3b o por el tipo de proteasas definido anteriormente. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, sean conservadoras o no-conservadoras.

Otras combinaciones de las secuencias de escisión arriba descritas y sus variantes pueden incluirse en la presente invención.

10 En otra realización, se incluyen sustituciones de aminoácidos que cambian el patrón de modificación del enlazador peptídico posterior a la traducción. Éstas pueden ser, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos que están glicosilados, sulfatados, o fosforilados.

15 En otra realización de la invención, el enlazador peptídico entre el polipéptido terapéutico y el resto HLEP contiene sitios de consenso para la adición de modificaciones posteriores a la traducción. Tales modificaciones están constituidas preferentemente por sitios de glicosilación. Más preferentemente, tales modificaciones están constituidas por al menos un sitio de glicosilación en N de la estructura Asn - X - Ser/Thr, donde X designa cualquier aminoácido excepto prolina. Aún más preferentemente, tales sitios de glicosilación en N se insertan próximos al término amino y/o carboxi del enlazador peptídico de tal modo que los mismos son capaces de proteger neopéptidos potenciales que

podrían desarrollarse en las secuencias en las que el resto del polipéptido terapéutico está experimentando transición al enlazador peptídico, o donde el péptido enlazador está pasando a la secuencia del resto de albúmina.

Breve descripción de las Figuras

5 **Figura 1:** Activación in vitro de proteínas de fusión FIX-albúmina por FXIa a 37 °C para una relación molar de FXIa a proteína de fusión de aproximadamente 1:500. Se utilizaron una sola proteína de fusión con enlazador no-escindible (1478/797) y dos proteínas de fusión con enlazador escindible (1088/797 y 1089/797). Las muestras se analizaron por SDS/PAGE en condiciones reductoras seguido por tinción con azul Coomassie.

Figura 2: Farmacocinética de las proteínas de fusión rec FIX y FIX-albúmina activadas con y sin enlazador escindible comparadas con proteínas de fusión no activadas.

10 **Figura 3:** Desactivación de las proteínas de fusión rec FIX o FIX-albúmina activadas por AT. La actividad residual de FIX se determinó después de 120 minutos utilizando un ensayo de tiempo parcial de tromboplastina no-activado.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Generación de ADNcs codificantes de proteínas de fusión FIX y FIX-albúmina

15 La secuencia codificante de Factor IX se amplificó por PCR a partir de una biblioteca de ADNc de hígado humano (ProQuest, Invitrogen) utilizando los cebadores We1403 y We1404 (SEQ ID NO 5 y 6). Después de una segunda tanda de PCR utilizando los cebadores We1405 y We1406 (SEQ ID NO 7 y 8), el fragmento resultante se clonó en pCR4TOPO (Invitrogen). Desde éste, el ADNc FIX se transfirió como un fragmento EcoRI al sitio EcoRI de pIRESpuro3 (BD Biosciences) en el que se había delecionado previamente un sitio XhoI interno. El plásmido resultante se designó pFIX-496 y fue el vector de expresión para el Factor IX tipo salvaje.

20 Para la generación de constructos de fusión de albúmina se reamplificó ADNc FIX por PCR en condiciones estándar utilizando los cebadores We2610 y We2611 (SEQ ID NO 9 y 10) delecionando el codón de parada e introduciendo un sitio XhoI en su lugar. El fragmento FIX resultante se digirió con las endonucleasas de restricción EcoRI y XhoI y se ligó a un pIRESpuro3 digerido con EcoRI / BamHI junto con un fragmento enlazador digerido con XhoI / BamHI como se describe más adelante.

25 Se generaron dos fragmentos enlazadores glicina/serina sin sitios de escisión internos: los oligonucleótidos We2148 y We2150 (SEQ ID NO 11 y 12) se reasociaron en concentraciones equimolares (10 pmol) en condiciones estándar PCR, se rellenaron y se amplificaron utilizando un protocolo PCR de una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguida por 7 ciclos de desnaturalización durante 15 sec. a 94°C, 15 sec. de reasociación a 55°C y 15 sec. de elongación a 72°C, y finalizada por un paso de extensión de 5 min a 72°C. Se llevó a cabo el mismo procedimiento
30 utilizando los oligonucleótidos We2156 y We2157 (SEQ ID NO 13 y 14). Los fragmentos enlazadores resultantes se digirieron con las endonucleasas de restricción XhoI y BamHI y se utilizaron por separado en la reacción de ligación descrita anteriormente. Los plásmidos resultantes contenían por tanto la secuencia codificante para FIX y una extensión C-terminal de un enlazador glicina/serina.

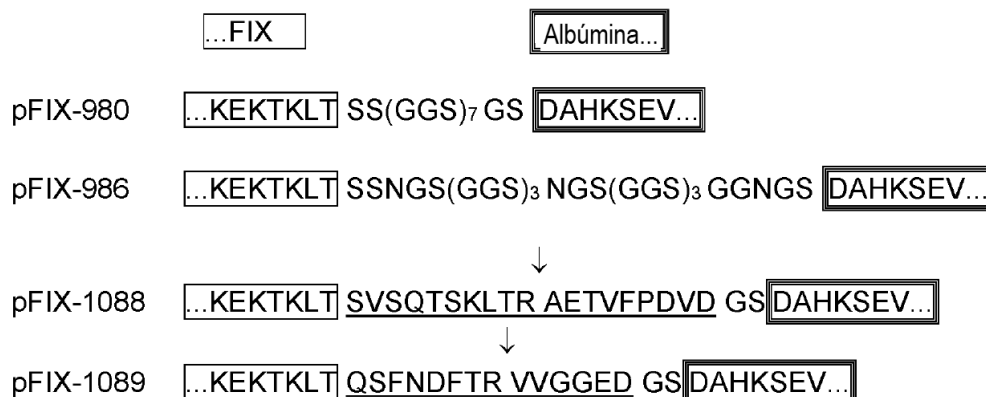
35 Se generaron dos fragmentos enlazadores escindibles diferentes derivados de los sitios de activación de FIX: los oligonucleótidos We2335 y We2336 (SEQ ID NO 15 y 16), que contenían el sitio de escisión de activación de la cadena ligera de FIX/región de borde del péptido de activación, se reasociaron, rellenaron, y amplificaron como se ha descrito arriba. El fragmento enlazador resultante se digirió con las endonucleasas de restricción XhoI y BamHI y se utilizó en la reacción de ligación descrita anteriormente. El plásmido resultante contenía por tanto la secuencia codificante para FIX y una extensión C-terminal de una secuencia FIX escindible (aminoácidos 136 a 154 de SEQ ID NO 2). En una
40 reacción subsiguiente de mutagénesis orientada con un kit de mutagénesis disponible comercialmente (QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) utilizando los oligonucleótidos We2636 y We2637 (SEQ ID NO 17 y 18) se delecionó el sitio XhoI.

45 Para la generación del segundo fragmento enlazador escindible derivado de FIX, se llevó a cabo el mismo procedimiento utilizando los oligonucleótidos We2337 y We2338 (SEQ ID NO 19 y 20) para construcción de enlazadores. El fragmento enlazador resultante se digirió con las endonucleasas de restricción XhoI y BamHI y se utilizó en la reacción de ligación arriba descrita. El plásmido resultante contenía ahora la secuencia codificante para FIX y una extensión C-terminal de una secuencia FIX escindible derivada del sitio de escisión de activación del péptido de activación de FIX / región borde de la cadena pesada (aminoácidos 173 a 186 de SEQ ID NO 2). Para la delección del sitio XhoI se utilizaron los oligonucleótidos We2638 y We2639 (SEQ ID NO 21 y 22) como se ha descrito arriba.

50 En el paso de clonación siguiente, los plásmidos generados anteriormente se digirieron con BamHI y se insertó un fragmento BamHI que contenía el ADNc de albúmina humana madura. Este fragmento había sido generado por PCR en una secuencia de ADNc de albúmina utilizando los cebadores We1862 y We1902 (SEQ ID NO 23 y 24) en condiciones estándar.

55 Los plásmidos finales con enlazadores glicina/serina no-escindibles se designaron pFIX-980 (SEQ ID NO 30) y pFIX-986 (SEQ ID NO 31), respectivamente. Los plásmidos finales con enlazadores escindibles derivados de las secuencias

de FIX se designaron pFIX-1088 (SEQ ID NO 40) y pFIX-1089 (SEQ ID NO 49), respectivamente. Sus secuencias enlazadoras y las secuencias C-terminal de FIX y N-terminal de albúmina se reseñan a continuación. Los sitios de escisión proteolítica en los enlazadores se indican con flechas, y las secuencias enlazadoras derivadas de FIX están subrayadas.



5

Para la expresión en células CHO, las secuencias codificantes para la proteína de fusión de albúmina FIX se transfirieron a vectores pIRESneo3 (BD Biosciences) o pADNc3.1 (Invitrogen), respectivamente.

Para procesamiento eficiente del propéptido en células que expresan FIX en cantidades altas se requiere la coexpresión de furina (Wasley LC et al. 1993. PACE/Furin can process the vitamin K-dependent pro-Factor IX precursor within the secretory pathway. J. Biol. Chem. 268:8458-8465). Se amplificó furina a partir de una biblioteca de ADNc de hígado (Ambion) utilizando los cebadores We1791 y We1792 (SEQ ID NO 25 y 26). Una segunda tanda de PCR utilizando los cebadores We1808 y We1809 (SEQ ID NO 27 y 28) proporcionó un fragmento de furina en el cual se delecionó el dominio transmembranal del terminal carboxi (TM) y se introdujo un codón de parada; este fragmento se clonó en pCR4TOPO (Invitrogen). A partir de ello se transfirió el ADNc furina Δ TM como un fragmento EcoRI/NotI en los sitios EcoRI/NotI de pIRESpuo3 (BD Biosciences) en los que se había delecionado previamente un sitio XhoI interno. El plásmido resultante se designó pFu-797. Este plásmido se cotransfectó con todos los constructos FIX en una ratio molar 1:5 (pFu-797: pFIX-xxx). La secuencia de aminoácidos de la furina secretada codificada por pFu-797 se da como SEQ-ID NO 29.

Ejemplo 2: Transfección y expresión de proteínas de fusión FIX y FIX-albúmina

Se cultivaron plásmidos en E. coli TOP10 (Invitrogen) y se purificaron utilizando protocolos estándar (Qiagen). Se transfectaron células HEK-293 utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se cultivaron en medio exento de suero (Invitrogen 293 Express) en presencia de 50 ng/ml de vitamina K y 4 μ g/ml de puomicina. Las poblaciones de células transfectadas se extendieron por medio de matraces T en frascos rotativos o fermentadores de pequeña escala a partir de los cuales se recogieron los sobrenadantes para purificación.

Alternativamente, se transfectaron células CHO K1 o DG44 (Invitrogen) utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se cultivaron en medio exento de suero (Invitrogen CD-CHO) en presencia de 50 ng/ml de vitamina K y 500-750 ng/ml de geneticina. Se seleccionaron clones de alta expresión y se extendieron por medio de matraces T en frascos rotativos o fermentadores de pequeña escala a partir de los cuales se recogieron los sobrenadantes para purificación.

Ejemplo 3: Purificación de proteínas de fusión FIX y FIX-albúmina

La cosecha del cultivo de células que contenían proteína de fusión FIX o FIX-albúmina se aplicó a una columna Q-Sepharose FF equilibrada previamente con tampón 50 mM TrisxHCl / 100 mM NaCl 20 de pH 8,0. Subsiguientemente, la columna se lavó con tampón de equilibración que contenía 200 mM NaCl. La elución de la proteína FIX fijada o proteína de fusión de FIX se realizó por medio de un gradiente salino utilizando tampón 50 mM TrisxHCl / 200 mM NaCl de pH 8,0 como base. El producto eluido se purificó ulteriormente por cromatografía en columna sobre una resina de hidroxilapatito. Para este propósito, el eluato de la columna Q-Sepharose FF se cargó en una columna de cromatografía de hidroxilapatito con tampón 50 mM TrisxHCl / 100 mM NaCl de pH 7, 2. La columna se lavó con el mismo tampón, y se eluyeron FIX o FIX-HSA utilizando un gradiente de fosfato de potasio a pH 7,2. El eluato se dializó para reducir la concentración de sal y se utilizó para análisis bioquímico así como para la determinación de los parámetros farmacocinéticos. El antígeno de FIX y la actividad se determinaron como se describe en el ejemplo 5.

Ejemplo 4: Esquema de purificación alternativo de las proteínas de fusión FIX y FIX-albúmina

Como se describe en el ejemplo 3, la cosecha del cultivo de células que contenían proteína de fusión FIX o FIX-albúmina se purificó por cromatografía en Q-Sepharose FF. El eluato de Q-Sepharose se purificó ulteriormente por cromatografía en una columna Heparin-Fractogel. Para este propósito, la columna Heparin-Fractogel se equilibró utilizando tampón 50 mM Tris x HCl, 50 mM NaCl de pH 8,0 (EP), se aplicó el eluato de Q-Sepharose FF y se lavó la columna con tampón de equilibración que contenía 75 mM NaCl. La proteína de fusión FIX o FIX-albúmina, respectivamente, se eluyó utilizando EP ajustado a 300 mM NaCl. El eluato de Heparin-Fractogel se purificó ulteriormente por cromatografía en una columna de cromatografía de hidroxilapatito como se describe en el ejemplo 3. El concentrado purificado de proteína de fusión FIX o respectivamente FIX-albúmina se sometió a determinación de la actividad y antígeno de FIX conforme al ejemplo 5 y se caracterizó por investigaciones posteriores *in vitro* e *in vivo*.

Ejemplo 5: Determinación de la actividad y el antígeno de FIX

La actividad de FIX se determinó como actividad de formación de coágulo o coagulación (FIX: C) utilizando reactivos de aPTT disponibles comercialmente (Pathromtin SL y plasma empobrecido en FIX, Dade Behring). Como referencia se utilizó un subestándar interno calibrado contra el estándar concentrado de FIX WHO International (96/854).

El antígeno de FIX (FIX:Ag) se determinó por un ensayo ELISA conforme a protocolos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Resumidamente, se incubaron placas de microtitulación con 100 µL por pocillo del anticuerpo de captura (anticuerpos apareados para FIX ELISA 1:200, Cedarlane, si bien pueden aplicarse también otras fuentes de anticuerpos apropiados) durante una noche a la temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces las placas con tampón de lavado B (Sigma P3563), se incubó cada pocillo con 200 µL de tampón de bloqueo C (Sigma P3688) durante una hora a la temperatura ambiente. Después de otros 3 pasos de lavado con tampón B, diluciones seriadas de la muestra de test en tampón B, así como diluciones seriadas de un subestándar (SHP) en tampón B (volúmenes por pocillo: 100 µL) se incubaron durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de 3 pasos de lavado con tampón B, se añadieron a cada pocillo 100 µL de una dilución 1:200 del anticuerpo de detección (anticuerpos apareados para FIX ELISA, marcados con peroxidasa, Cedarlane) en tampón B y se incubaron durante 2 horas más a la temperatura ambiente. Después de 3 pasos de lavado con tampón B, se añadieron 100 µL de solución sustrato (TMB, Dade Behring, OUVF) por pocillo y se incubaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µL de solución de parada sin diluir (Dade Behring, OSFA) preparó las muestras para lectura en un lector de microplacas adecuado a longitud de onda de 450 nm. Las concentraciones de las muestras de test se calcularon luego utilizando la curva estándar con plasma humano estándar como referencia.

Ejemplo 6: Comparación de la ratio actividad de FIX/antígeno de FIX de diferentes proteínas de fusión FIX-albúmina en el sobrenadante de cultivo de células

Sobrenadantes de cultivo celular de células HEK transfectadas con constructos de DNA que codificaban proteínas de fusión FIX-albúmina que contenían péptidos enlazadores diferentes se sometieron a tests de actividad y antígeno de FIX como se ha descrito arriba (véase ejemplo 5). Se calculó la ratio de FIX:C a FIX:Ag, que representaba una medida directamente proporcional a la actividad molar específica de los diferentes constructos.

Los resultados presentados en la Tabla 4 indican que se produce un aumento en la ratio actividad/antígeno después de la introducción de enlazadores escindibles en la molécula FIX-HSA. Se muestra también que el péptido enlazador escindible debería tener una longitud mayor que dos aminoácidos a fin de proporcionar ratios actividad/antígeno claramente aumentadas.

Tabla 4: Ratios FIX:C/FIX:Ag de proteínas de fusión FIX-albúmina que contienen péptidos enlazadores diferentes

Constructo FIX-HSA	Enlazador	FIX:C/ FIX:Ag	Número de veces de aumento comparado con la proteína de fusión 980/797 con enlazador no-escindible (GGGGGV)
1182/797	Ninguno	<0,031	
1366/797	RI	< 0,068	
1478/863	GGGGGV (Sheffield et al.)	0,041	--
980/797	SS(GGS) ₇ GS	0,070	1,7
986/797	SSNGS(GGS)3NGS (GGS)3GGNGS	0,076	1,9
1483/863	SVSQTSKLTR AETVFPDVD GSGGS	0,688	16,8
1088/797	SVSQTSKLTR AETVFPDVD GS	0,832	20,3
1365/797	SVSQTSKLTR AETVFPDVD	0,630	15,4
1482/863	SVSQTSKLTR AETVFP	0,482	11,8

(continuación)

Construc ^{to} FIX-HSA	Enlazador	FIX:C/ FIX:Ag	Número de veces de aumento comparado con la proteína de fusión 980/797 con enlazador no- escindible (GGGGGGV)
1087/797	SVSQTSLKTR AETVFPDVS GS (FIX deltaKLT)	0,472	11,5
1089/797	QSFNDFTR VVGGED GS	0,532	13,0
1091/797	PERGDNLITR IVGGQE GS	0,111	2,7

Ejemplo 7: Comparación de las proteínas de fusión FIX y FIX-albúmina con respecto a actividad molar específica, semivida terminal *in vivo* y recuperación *in vivo* en ratas o conejos

- 5 Proteínas de fusión tipo salvaje recombinantes purificadas FIX (rFIX 496/797) y FIX-albúmina (rFIX 980/797, rFIX 986/797, rFIX- 1088/797 y rFIX 1089/797) se testaron respecto a actividad de FIX en un ensayo de formación de coágulo como se ha descrito arriba. En paralelo, se determinó la diferencia de densidad óptica a 280 y 320 nm como medida de la concentración de proteína (DO280-320). Se calcularon los ratios de actividad por DO280-320 y, basándose en las densidades ópticas molares, se calcularon las actividades molares específicas. En la Tabla 5
- 10 siguiente se resumen los resultados.

Tabla 5: Actividades molares específicas de FIX tipo salvaje comparada con las fusiones FIX-albúmina

	Enlazador	Densidad óptica (DO280- 320)	Actividad de coagulación de FIX (UI/ml)	Actividad /Vol/DO (UI/mL/DO)	Actividad molar específica* (UI/nmol)
rFIX, tipo salvaje (496/797)	-	0,3798	21,2	55,8	4,23
rFIX-HSA (no-escindible, 1478/863)	GGGGGGV (Sheffield et al.)	2,9189	5,8	2,0	0,23
rFIX-HSA (no-escindible, 980/797)	SS (GGS) ₇ GS	1,1122	3,4	3,0	0,35
rFIX-HSA (no-escindible, 986/797)	SS NGS (GGS) ₃ NGS (GGS) ₃ GGN GS	0,8107	3,2	4,0	0,45
rFIX-HSA (escindible, 1088/797)	FXIa escindible	0,3421	11,9	34,8	3,95
rFIX-HSA (escindible, 1089/797)	FXIa escindible	0,4512	11,3	25,0	2,84
*Actividad molar específica basada en actividad, densidad óptica y las densidades ópticas molares siguientes: Densidad óptica molar de FIX: DO(280nm, 1 mol/L) = 75 810 Densidad óptica molar de albúmina: DO(280nm, 1 mol/L) = 37 791 Densidad óptica molar de la proteína de fusión FIX-albúmina: DO(280nm, 1 mol/L) = 113 601					

- 15 Teniendo en cuenta los resultados resumidos en la Tabla 5, es sorprendente que dos constructos que se generaron de acuerdo con la presente descripción exhiben actividades molares específicas muy aumentadas comparados con las proteínas de fusión con enlazadores no-escindibles. Adicionalmente, la actividad molar específica de estos constructos era sólo moderadamente reducida comparada con rFIX tipo salvaje.

- 20 Investigaciones *in vitro* de las reacciones de escisión proteolítica por el Factor XIa (FXIa) confirmaron que las proteínas de fusión FIX-albúmina que contienen un enlazador escindible como por ejemplo el constructo No. 1088/797 ó 1089/797 están activadas y, en paralelo, el enlazador se escinde dando como resultado la liberación del resto albúmina (Fig. 1). La proteína de fusión con enlazador no-escindible no exhibía una liberación correspondiente del resto albúmina.

En el caso de FVIIa como proteasa de escisión en presencia de Factor tisular, las proteínas de fusión FIX-albúmina 1088/797 ó 1089/797 que contenían un enlazador escindible exhibían también liberación del resto albúmina en paralelo con la liberación del péptido de activación de FIX (datos no presentados).

- Además de la determinación de la actividad molar específica de coagulación, los polipéptidos número 496/797, 980/797, 986/797, 1088/797 y 1089/797 descritos anteriormente se administraron por vía intravenosa a ratas CD / Lewis (6 ratas por sustancia) y/o conejos (4 conejos por sustancia) con una dosis de 50 UI/kg de peso corporal. Se extrajeron muestras de sangre antes de la administración de la sustancia de test y a intervalos apropiados comenzando a los 5 minutos después de la administración de las sustancias de test. El contenido de antígeno de FIX se cuantificó subsiguientemente por un ensayo ELISA específico para Factor IX humano (véase anteriormente). Los valores medios de los grupos respectivos se utilizaron para calcular la recuperación *in vivo* al cabo de 5 minutos. Se calcularon las semividas para cada proteína utilizando los valores puntuales de la fase beta de eliminación (semivida terminal) conforme a la fórmula $t_{1/2} = \ln 2/k$, en donde k es la pendiente de la línea de regresión obtenida representando los niveles FIX:Ag en escala logarítmica y el tiempo en escala lineal.
- Las semividas *in vivo* calculadas se resumen en la Tabla 6. Se encontró que tanto en las ratas como en los conejos las semividas *in vivo* de las proteínas de fusión FIX-albúmina aumentaban significativamente en comparación con el FIX recombinante tipo salvaje no fusionado preparado en el laboratorio de los inventores o en comparación con el producto FIX recombinante disponible comercialmente BeneFIX®. Las semividas *in vivo* de las proteínas de fusión de albúmina comparadas con BeneFIX® se incrementaban a aproximadamente 200-400%, dependiendo de la especie animal o constructo utilizado (Tabla 6).
- Para evaluar la recuperación *in vivo*, los niveles de antígeno de FIX medidos por ml de plasma a sus concentraciones máximas después de administración intravenosa (t = 5 min) estaban relacionados con la cantidad de producto aplicada por kg. Alternativamente, se calculó un porcentaje relacionando el nivel de antígeno determinado (UI/ml) 5 min después de la infusión con el nivel teórico de producto esperado para 100% de recuperación (producto aplicado por kg dividido por un volumen supuesto de plasma de 40 ml por kg). Las recuperaciones *in vivo* (IVR) de las proteínas de fusión FIX-albúmina eran significativamente mayores que las recuperaciones *in vitro* de rFIX (496/797) o BeneFIX® (Tabla 7).

Tabla 6:

Semividas <i>in vivo</i> terminales de preparaciones de FIX derivadas de proteínas de expresión recombinantes (BeneFIX®, rFIX 496/797) y proteínas de fusión FIX-albúmina (rFIX 980/797, rFIX 986/797, rFIX 1088/797, y rFIX 1089/797) después de administración intravenosa de 50 UI/kg en ratas y/o 50 UI/kg en conejos, respectivamente.				
	Experimentos en rata PSR18-05, PSR06-05, PSR02-05		Experimento en conejo PSK11-05	
	Semivida terminal (h)	con relación a BeneFIX [%]	Semivida terminal (h)	con relación a BeneFIX [%]
rFIX 496/797	4,5*	91	n. t.	n. t.
rFIX 980/797	11,6*	234	36,9° 29,3° (segundo exp.)	410 326
rFIX 986/797	10,5*	212	n. t.	n. t.
rFIX 1088/797	8,3*	168	30,3°	337
rFIX 1089/797	10,5*	212	n. t.	n. t.
BeneFIX	4,95* (valor medio de 5,3 y 4,6)	100	9,0°	100
* Determinado entre 120 y 1440 min ° Determinado entre 4 y 96 horas				

Tabla 7:

Recuperaciones <i>in vivo</i> (cantidad de sustancia 5 min después de la administración) de preparaciones FIX recombinantes (BeneFIX, rFIX 496/797) y proteínas de fusión FIX-albúmina (rFIX 1088/797, rFIX 1089/797) después de administración intravenosa de 50 UI/kg en ratas. El porcentaje de recuperación <i>in vivo</i> se calculó basándose en un volumen supuesto de plasma de 40 ml/kg.		
	Experimento en rata	
	Recuperación <i>in vivo</i> UI/dL por UI/kg / [%]*	Con relación a BeneFIX [%]
rFIX 496/797	0,462/18,5	74,6
rFIX 1088/797	1,034/41,4	166,5
rFIX 1089/797	1,063/42,5	171,2
BeneFIX	0,621 /24,8	100
* Calculado sobre la base de un volumen de plasma de 40 mL/kg		

Ejemplo 8: Activación *in vitro* de proteínas de fusión FIX-albúmina con/sin enlazador escindible (1088/797 y 980/797) y determinación de la farmacocinética en ratas

- 5 Proteínas de fusión FIX-albúmina y rec FIX se activaron *in vitro* utilizando Factor Xla disponible comercialmente (Kordia). Resumidamente, se activaron cantidades molares idénticas de proteína de fusión FIX o FIX-albúmina ($3,0 \times 10^{-6}$ moles/litro) a 37 °C en solución en presencia de FXIa ($1,9 \times 10^{-8}$ mol/litro) y CaCl_2 (1,5 mmol/litro) tamponada a pH 6,8. Después de activación completa como se mostró por SDS-PAGE, la reacción se paró por adición de un exceso molar 5 x de inhibidor C1 (Berinert P) basado en la cantidad de FXIa. Las muestras se guardaron congeladas por
- 10 debajo de -70 °C hasta el comienzo de la investigación farmacocinética.

Se realizó una investigación farmacocinética de las proteínas de fusión FIX y FIX-albúmina activadas en ratas como se describe en el ejemplo 7 y los resultados se compararon con un resultado farmacocinético que abarcaba proteínas de fusión no activadas.

- 15 Se encontró que las proteínas de fusión activadas demostraban semividas, así como valores AUC significativamente reducidos comparadas con las moléculas no activadas (Figura 2). Después de la activación, la proteína de fusión FIX con enlazador escindible (1088/797) exhibía un comportamiento farmacocinético muy similar a rec FIX activada (BeneFIX), mientras que la proteína de fusión activada con enlazador no-escindible (980/797) daba como resultado una semivida mayor tanto inicial como terminal comparada con la proteína de fusión activada 1088/797 con enlazador escindible. Por tanto, los resultados demuestran claramente que el enlazador escindible da como resultado la
- 20 eliminación aumentada del factor de coagulación después de la activación y, por consiguiente, evita la acumulación de proteínas de fusión activadas potencialmente trombógenas con semividas aumentadas.

Ejemplo 9: comparación de las proteínas de fusión FIX-albúmina con/sin enlazador escindible con respecto a la velocidad de desactivación de los factores de coagulación activados por antitrombina III (AT)

- 25 Se activaron proteínas de fusión FIX con (1088/797) y sin (980/797) enlazador escindible por incubación con FXIa como se describe en el ejemplo 8. Los factores activados se incubaron con AT durante 120 min y se determinó la actividad residual de FIXa utilizando un procedimiento manual de ensayo de coagulación de FIX sin activación (naPTT, véase más adelante) de acuerdo con Schnitger y Gross. Como muestras de control se utilizaron las proteínas de fusión FIX-albúmina activadas en presencia de la misma cantidad de AT, pero sin incubación.

- 30 Se determinó la actividad de FIX con ayuda de un ensayo de tiempo parcial de tromboplastina no-activado (naPTT) utilizando plasma deficiente en FIX de Dade Behring. Las muestras se diluyeron previamente en un tampón de pH 6,8 que contenía His, Gly, sacarosa, y Tween 80. La determinación completa se realizó utilizando coagulómetros de acuerdo con Schnitger & Gross. Una mezcla de 0,1 ml de plasma deficiente en FIX, 0,1 ml de muestra, y 0,1 ml de fosfolípidos al 0,1% (Rhone-Poulenc-Nattermann, prediluidos 1:3 en tampón de imidazol suplementado con 1% HSA) se incubó durante 2 minutos a 37 °C. La reacción de coagulación se inició por adición de 0,1 ml de solución de 0,025
- 35 mol/l CaCl_2 y se determinó el tiempo de coagulación.

- La Figura 3 muestra los resultados de un experimento de desactivación correspondiente. En el caso de la proteína de fusión con enlazador escindible (1088/797) un aumento en el tiempo de coagulación desde 210 a 540 sec (Factor de 2,57x) demostró un proceso de desactivación acelerado de la actividad de FIXa por AT comparado con una proteína de fusión con enlazador no-escindible (980/797) que exhibía solamente un aumento desde 196 a 411 sec (Factor de 2,10x). Muy probablemente, el residuo albúmina afecta estéricamente al proceso de desactivación dependiente de AT
- 40 en el caso de la proteína de fusión con enlazador no-escindible, mientras que en el caso de la proteína de fusión con enlazador escindible el residuo albúmina se escinde dando como resultado una desactivación acelerada por AT.

Listado de secuencias

<110> CSL Behring GmbH

<120> Proteínas de fusión escindibles proteolíticamente con alta actividad específica molar

<130> P073645EP

5 <150> Para ser asignado

<151> 2006-06-14

<160> 112

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

10 <211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1          5          10          15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20          25          30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35          40          45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50          55          60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65          70          75          80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85          90          95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100         105         110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115         120         125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130         135         140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145         150         155         160

```

ES 2 889 920 T3

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

ES 2 889 920 T3

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 2

<211> 415

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30

Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
35 40 45

ES 2 889 920 T3

Asp	Gln	Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	50	55	60
Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	65	70	75
Asn	Cys	Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	85	90	95
Gln	Phe	Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	100	105	110
Glu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	115	120	125
Pro	Phe	Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	130	135	140
Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu	145	150	155
Ala	Glu	Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	165	170	175
Asp	Phe	Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	180	185	190
Pro	Trp	Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	195	200	205
Ser	Ile	Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	210	215	220
Thr	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	225	230	235
Thr	Glu	His	Thr	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His	245	250	255
His	Asn	Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Asn	Lys	Tyr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	260	265	270
Leu	Glu	Leu	Asp	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	Asn	Ser	Tyr	Val	Thr	Pro	Ile	275	280	285
Cys	Ile	Ala	Asp	Lys	Glu	Tyr	Thr	Asn	Ile	Phe	Leu	Lys	Phe	Gly	Ser	290	295	300

ES 2 889 920 T3

Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305 310 315 320

Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
325 330 335

Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
340 345 350

Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
355 360 365

His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
370 375 380

Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385 390 395 400

Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
405 410 415

<210> 3

<211> 1386

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta      60
ggatatctac tcagtgtga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt      120
ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaacctt      180
gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaaac      240
actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat      300
ccatgtttta atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc      360
tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga      420
tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaagggtg tttgctcctg tactgagggg      480
tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga      540
gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgtttttcc tgatgtggac      600
tatgtaaatt ctactgaagc tgaaccatt ttggataaca tactcaaag cacccaatca      660
tttaatgact tcaactcgggt tggttggtgga gaagatgcca aaccaggtca attcccttgg      720
caggttggtt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa      780
tggattgtaa ctgctgcccc ctgtgttgaa actggtgtta aaattacagt tgcgcaggt      840

```

ES 2 889 920 T3

gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt	900
cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ctttctggaa	960
ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa	1020
tacacgaaca tcttcctcaa atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc	1080
cacaaagga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc	1140
acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat	1200
gaaggagga gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa	1260
gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa	1320
tatggaatat ataccaaggt atcccggat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc	1380
acttaa	1386

<210> 4

<211> 1830

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<4> 4

atgaagtggg taacctttat ttcccttctt tttctcttta gctcggctta ttccaggggt	60
gtgtttcgtc gagatgcaca caagagtgag gttgctcatc ggtttaaaga tttgggagaa	120
gaaaatttca aagccttggg gttgattgcc tttgctcagt atcttcagca gtgtccattt	180
gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat	240
gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt catacccttt ttggagacaa attatgcaca	300
gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct	360
gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattgggtg	420
agaccagagg ttgatgtgat gtgactgct tttcatgaca atgaagagac atttttgaaa	480
aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ccttactttt atgccccgga actccttttc	540
tttgctaaaa ggtataaagc tgcttttaca gaatgttgcc aagctgctga taaagctgcc	600
tgcctgttgc caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag	660
agactcaagt gtgccagtct caaaaaattt ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta	720
gctcgcctga gccagagatt tcccaaagct gagtttgagc aagtttccaa gttagtgcac	780
gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac	840
aggcgggacc ttgccaaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag	900
gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa tcccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat	960
gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc	1020
aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc ctgggcatgt ttttgtatga atatgcaaga	1080

ES 2 889 920 T3

```

aggcatcctg attactctgt cgtgctgctg ctgagacttg ccaagacata tgaaccact 1140
ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatcct catgaatgct atgccaaagt gttcgatgaa 1200
tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag 1260
cagcttggag agtataaaatt ccagaatgctg ctattagttc gttacaccaa gaaagtaccc 1320
caagtgtcaa ctccaactct tgtagaggctc tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa 1380
tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg ccctgtgcag aagactatct atccgtggctc 1440
ctgaaccagt tatgtgtgtt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaatgc 1500
tgcacagaat ccttggtgaa caggcgacca tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca 1560
tacgttccca aagagtttaa tgctgaaaca ttcaccttcc atgcagatat atgcacactt 1620
tctgagaagg agagacaaat caagaaacaa actgcacttg ttgagctcgt gaaacacaag 1680
cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc tttttagtag 1740
aagtgtgca aggctgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttggt 1800
gctgcaagtc aagctgcctt aggcttataa 1830

```

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 5

ccacttcac aatctgctag c 21

10 <210> 6

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Artificial

<400> 6

caattccaat gaattaacct tgg 23

<210> 7

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 7

atgcagcgcg tgaacatgat c 21
 <210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 <400> 8
 tcattaagtg agcttggtt ttcc 25
 10 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Artificial
 <400> 9
 gattcgaatt cgcccttatg c 21
 <210> 10
 <211> 32
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 <400> 10
 25 cgctcgagggt gagcttgggt ttctcctaa tc 32
 <210> 11
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Artificial
 <400> 11
 ctcgagcggg ggaatctggcg ggtctggagg ctctggaggg tcgggaggct ct 52
 <210> 12
 35 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Artificial
 <400> 12
 ggatccagat ccccagagc ctccagagcc tccgaccct ccagag 46
 5 <210> 13
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Artificial
 <400> 13
 ctgagcaat ggatctggcg ggtctggagg ctctggaggg tcgaatggct ctggag 56
 <210> 14
 <211> 64
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 <400> 14
 ggatccgttc cctccagacc cgccagatcc cccagagcct ccagagccat tcgaccctcc 60
 20 agag 64
 <210> 15
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Artificial
 <400> 15
 cctcgagctc tgtgagccag acctccaagc tcaccagggc cgagac 46
 <210> 16
 30 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 35 <400> 16

gggatccgtc cacatcaggg aagacagtct cggccctggt gagg 44
 <210> 17
 <211> 33
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 <400> 17
 ggaaaaaaca aagtcactt ctgtgagcca gac 33
 10 <210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Artificial
 <400> 18
 gtctggctca cagaagtgag cttgtttt tcc 33
 <210> 19
 <211> 38
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 <400> 19
 25 cctcgagcag agcttcaatg acttcacccg ggtggtgg 38
 <210> 20
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Artificial
 <400> 20
 gggatccatc ctccccgcc accacccggg tgaagtcatt g 41
 <210> 21
 35 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Artificial
 <400> 21
 ggaaaaaaca aagctcactc agagcttcaa tgac 34
 5 <210> 22
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Artificial
 <400> 22
 gtcattgaag ctctgagtga gctttgttt ttcc 34
 <210> 23
 <211> 31
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 <400> 23
 20 gtgggatccg atgcacacaa gagtgaggtt g 31
 <210> 24
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Artificial
 <400> 24
 cacggatccc tataagccta aggcagcttg acttg 35
 <210> 25
 30 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 35 <400> 25
 caaggagacg ggcgctcc 18
 <210> 26

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Artificial
 <400> 26
 gcccaaggag gggattggc 19
 <210> 27
 <211> 30
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 <400> 27
 15 gtggaattca tggagctgag gccctggtg 30
 <210> 28
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Artificial
 <400> 28
 cacgcggccg ctactacag ccgtgcccc gcctccac 38
 <210> 29
 25 <211> 704
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 29

ES 2 889 920 T3

Met	Glu	Leu	Arg	Pro	Trp	Leu	Leu	Trp	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Gly	Thr	1	5	10	15
Leu	Val	Leu	Leu	Ala	Ala	Asp	Ala	Gln	Gly	Gln	Lys	Val	Phe	Thr	Asn	20	25	30	
Thr	Trp	Ala	Val	Arg	Ile	Pro	Gly	Gly	Pro	Ala	Val	Ala	Asn	Ser	Val	35	40	45	
Ala	Arg	Lys	His	Gly	Phe	Leu	Asn	Leu	Gly	Gln	Ile	Phe	Gly	Asp	Tyr	50	55	60	
Tyr	His	Phe	Trp	His	Arg	Gly	Val	Thr	Lys	Arg	Ser	Leu	Ser	Pro	His	65	70	75	80
Arg	Pro	Arg	His	Ser	Arg	Leu	Gln	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Gln	Trp	Leu	85	90	95	
Glu	Gln	Gln	Val	Ala	Lys	Arg	Arg	Thr	Lys	Arg	Asp	Val	Tyr	Gln	Glu	100	105	110	
Pro	Thr	Asp	Pro	Lys	Phe	Pro	Gln	Gln	Trp	Tyr	Leu	Ser	Gly	Val	Thr	115	120	125	
Gln	Arg	Asp	Leu	Asn	Val	Lys	Ala	Ala	Trp	Ala	Gln	Gly	Tyr	Thr	Gly	130	135	140	
His	Gly	Ile	Val	Val	Ser	Ile	Leu	Asp	Asp	Gly	Ile	Glu	Lys	Asn	His	145	150	155	160
Pro	Asp	Leu	Ala	Gly	Asn	Tyr	Asp	Pro	Gly	Ala	Ser	Phe	Asp	Val	Asn	165	170	175	
Asp	Gln	Asp	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Arg	Tyr	Thr	Gln	Met	Asn	Asp	Asn	180	185	190	
Arg	His	Gly	Thr	Arg	Cys	Ala	Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Val	Ala	Asn	Asn	195	200	205	
Gly	Val	Cys	Gly	Val	Gly	Val	Ala	Tyr	Asn	Ala	Arg	Ile	Gly	Gly	Val				

ES 2 889 920 T3

210	215	220
Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu 225 230 235 240		
Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro 245 250 255		
Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu 260 265 270		
Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile 275 280 285		
Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn 290 295 300		
Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala 305 310 315 320		
Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr 325 330 335		
Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val 340 345 350		
Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser 355 360 365		
Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala 370 375 380		
Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr 385 390 395 400		
Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val 405 410 415		
Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly 420 425 430		
Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg 435 440 445		
Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg 450 455 460		

ES 2 889 920 T3

```

Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
465                               470                               475                               480

Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
                               485                               490                               495

Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
                               500                               505                               510

Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
                               515                               520                               525

Asn Asp Trp Ala Phe Thr Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
                               530                               535                               540

Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
545                               550                               555                               560

Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
                               565                               570                               575

Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser
                               580                               585                               590

Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys
                               595                               600                               605

Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp
                               610                               615                               620

Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val
625                               630                               635                               640

Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu
                               645                               650                               655

Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu
                               660                               665                               670

Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln
                               675                               680                               685

Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu
690                               695                               700

```

<210> 30

<211> 25

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 30

ES 2 889 920 T3

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

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser
20 25

<210> 31

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 31

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

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

10 <210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Enlazador

<400> 32

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
1 5 10 15

Ala

<210> 33

<211> 14

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 33

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser
1 5 10

25

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 889 920 T3

<220>

<223> Enlazador

<400> 34

Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
1 5 10 15

Ala

5 <210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Enlazador

<400> 35

Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Ser

<210> 36

<211> 19

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 36

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

20 Asp Val Asp

<210> 37

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Enlazador

<400> 37

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Gly Ser
20

ES 2 889 920 T3

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Enlazador

<400> 38

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

<210> 39

10 <211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

15 <400> 39

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Gly Ser
20

<210> 40

<211> 22

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 40

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Asn Gly Ser
20

25 <210> 41

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 889 920 T3

<223> Enlazador

<400> 41

Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Pro
1				5					10					15	

Asp Val Asp

<210> 42

5 <211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

10 <400> 42

Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Thr	Glu	Thr	Val	Phe	Pro
1				5					10					15	

Asp Val Asp

<210> 43

<211> 19

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 43

Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ser	Glu	Thr	Val	Phe	Pro
1				5					10					15	

Asp Val Asp

20 <210> 44

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Enlazador

<400> 44

Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Leu	Glu	Thr	Val	Phe	Pro
1				5					10					15	

Asp Val Asp

<210> 45

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Enlazador
 <400> 45

 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Thr Glu Ala Val Phe Pro
 1 5 10 15

 Asp Val Asp
 <210> 46
 <211> 19
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 46

 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Gly Glu Ala Val Phe Pro
 1 5 10 15

 Asp Val Asp
 15 <210> 47
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 47

 Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp
 1 5 10
 <210> 48
 25 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 30 <400> 48

 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
 1 5 10

ES 2 889 920 T3

<210> 49
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 49
 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 50
 10 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 15 <400> 50
 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Thr Val Gly Gly Glu Asp
 1 5 10
 <210> 51
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 51
 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Leu Val Gly Gly Glu Asp
 1 5 10
 25 <210> 52
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Enlazador
 <400> 52
 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Gly Val Gly Gly Glu Asp
 1 5 10
 <210> 53
 <211> 17
 35 <212> PRT

ES 2 889 920 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 53

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Asn Gly
1 5 10 15

5 Ser

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Enlazador

<400> 54

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Asn
1 5 10 15

<210> 55

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

20 <400> 55

Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
1 5

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 56

Arg Leu Val Gly Gly Gln Glu
1 5

30 <210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 889 920 T3

<220>
 <223> Enlazador
 <400> 57

 Arg Thr Val Gly Gly Gln Glu
 1 5
 5 <210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Enlazador
 <400> 58

 Arg Val Val Gly Gly Gln Glu
 1 5
 <210> 59
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 59

 Arg Ala Val Gly Gly Gln Glu
 1 5
 20 <210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 60

 Arg Gly Val Gly Gly Gln Glu
 1 5
 <210> 61
 30 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 35 <400> 61

ES 2 889 920 T3

	Pro	Glu	Arg	Gly	Asp	Asn	Asn	Leu	Thr	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln	Glu
	1				5					10					15	

<210> 62
 <211> 19
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 62

	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe	Pro
	1				5					10					15	

Asp Val Asp

10 <210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Enlazador
 <400> 63

	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe	Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Asn
	1				5					10					15

<210> 64
 <211> 19
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 64

	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe	Pro
	1				5					10					15	

25 Asp Val Asp

<210> 65
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Enlazador

ES 2 889 920 T3

<400> 65

Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val
1 5 10 15

<210> 66

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 66

10 Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp
1 5 10 15

<210> 67

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Enlazador

<400> 67

Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His
1 5 10 15

Pro Lys Thr

<210> 68

20 <211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

25 <400> 68

Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser
1 5 10 15

Arg His Pro Ser
20

<210> 69

<211> 21

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

ES 2 889 920 T3

<223> Enlazador

<400> 69

Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg
1 5 10 15

His Tyr Phe Ile Ala
20

<210> 70

5 <211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

10 <400> 70

Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln
1 5 10 15

<210> 71

<211> 24

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 71

Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp
1 5 10 15

Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser
20

20 <210> 72

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Enlazador

<400> 72

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

Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ala Ala Glu Glu Glu Asp
20 25 30

<210> 73

<211> 28

ES 2 889 920 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

5 <400> 73

Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser
1 5 10 15

Arg His Pro Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala
20 25

<210> 74

<211> 22

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 74

Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg
1 5 10 15

His Tyr Phe Ile Ala Ala
20

15 <210> 75

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Enlazador

<400> 75

Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln
1 5 10 15

Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
20 25 30

<210> 76

<211> 24

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 76

ES 2 889 920 T3

Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys
1 5 10 15

Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala
20

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 77

Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His
1 5 10 15

Pro

10 <210> 78

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Enlazador

<400> 78

Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser
1 5 10 15

Arg His Pro Ser
20

<210> 79

<211> 36

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 79

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

25 Asp Val Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val
20 25 30

Gly Gly Gln Glu
35

<210> 80

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Enlazador

<400> 80

Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Asn Asn Leu Thr
1 5 10 15

Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
20

<210> 81

<211> 27

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 81

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp
1 5 10 15

Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
20 25

15

<210> 82

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Enlazador

<400> 82

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg
1 5 10 15

Ile Val Gly Gly Gln Glu
20

<210> 83

25 <211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

ES 2 889 920 T3

<400> 83

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Tyr Val Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
20 25 30

<210> 84

<211> 30

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 84

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
20 25 30

10

<210> 85

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Enlazador

<400> 85

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
20 25 30

<210> 86

20 <211> 52

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

25 <400> 86

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

ES 2 889 920 T3

Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn
20 25 30

Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly
35 40 45

Gly Glu Asp Ala
50

<210> 87

<211> 32

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 87

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
20 25 30

10 <210> 88

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Enlazador

<400> 88

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
20 25 30

<210> 89

<211> 32

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 89

25 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val
20 25 30

ES 2 889 920 T3

<210> 90

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Enlazador

<400> 90

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Leu Val Gly Gly Lys Val
20 25 30

<210> 91

10 <211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

15 <400> 91

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Thr Val Gly Gly Lys Val
20 25 30

<210> 92

<211> 19

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 92

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

25 <210> 93

<211> 666

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 93

ES 2 889 920 T3

Tyr	Asn	Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	1	5	10	15
Glu	Cys	Met	Glu	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	20	25	30	
Glu	Asn	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly	35	40	45	
Asp	Gln	Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	50	55	60	
Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	65	70	75	80
Asn	Cys	Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	85	90	95	
Gln	Phe	Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	100	105	110	
Glu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	115	120	125	
Pro	Phe	Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	130	135	140	
Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu	145	150	155	160
Ala	Glu	Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	165	170	175	
Asp	Phe	Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	180	185	190	
Pro	Trp	Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	195	200	205	
Ser	Ile	Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	210	215	220	
Thr	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	225	230	235	240

ES 2 889 920 T3

Thr	Glu	His	Thr	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His	
				245					250					255		
His	Asn	Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Asn	Lys	Tyr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	
			260					265					270			
Leu	Glu	Leu	Asp	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	Asn	Ser	Tyr	Val	Thr	Pro	Ile	
		275					280					285				
Cys	Ile	Ala	Asp	Lys	Glu	Tyr	Thr	Asn	Ile	Phe	Leu	Lys	Phe	Gly	Ser	
	290					295					300					
Gly	Tyr	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Val	Phe	His	Lys	Gly	Arg	Ser	Ala	
305					310					315					320	
Leu	Val	Leu	Gln	Tyr	Leu	Arg	Val	Pro	Leu	Val	Asp	Arg	Ala	Thr	Cys	
			325						330					335		
Leu	Arg	Ser	Thr	Lys	Phe	Thr	Ile	Tyr	Asn	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	
			340					345					350			
Phe	His	Glu	Gly	Gly	Arg	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	
		355					360					365				
His	Val	Thr	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Ser	Phe	Leu	Thr	Gly	Ile	Ile	Ser	
	370					375					380					
Trp	Gly	Glu	Glu	Cys	Ala	Met	Lys	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys	
385					390					395					400	
Val	Ser	Arg	Tyr	Val	Asn	Trp	Ile	Lys	Glu	Lys	Thr	Lys	Leu	Thr	Ser	
				405					410					415		
Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	
			420					425					430			
Val	Asp	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
		435					440					445				
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
	450					455					460					
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
465					470				475						480	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
				485					490					495		

ES 2 889 920 T3

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 500 505 510
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 515 520 525
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 530 535 540
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 545 550 555 560
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 565 570 575
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 580 585 590
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 595 600 605
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 610 615 620
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 625 630 635 640
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 645 650 655
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 660 665

<210> 94

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 94

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val
 1 5

10 <210> 95

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Enlazador

ES 2 889 920 T3

<400> 95

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Gly Ser Gly Gly Ser
20

<210> 96

<211> 18

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 96

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

10 Asp Val

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Enlazador

<400> 97

Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val
1 5 10 15

<210> 98

20 <211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

25 <400> 98

Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val
1 5 10

<210> 99

<211> 16

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

ES 2 889 920 T3

<223> Enlazador

<400> 99

Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe	Pro
1				5					10					15	

<210> 100

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

10 <400> 100

Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe
1				5					10					15

<210> 101

<211> 12

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 101

Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe
1				5					10		

20 <210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Enlazador

<400> 102

Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe
1				5					10

<210> 103

<211> 13

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 103

ES 2 889 920 T3

[illegible]

ES 2 889 920 T3

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

<210> 108
 <211> 13
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 108

	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe	Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu
	1				5					10			

10 <210> 109
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Enlazador
 <400> 109

	Pro	Glu	Arg	Gly	Asp	Asn	Asn	Leu	Thr	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln	Glu
	1				5					10					15	

Gly Ser
 <210> 110
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 110

	Pro	Glu	Arg	Gly	Asp	Asn	Asn	Leu	Thr	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln
	1				5					10					15

25 <210> 111
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 111

ES 2 889 920 T3

Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln
1 5 10

<210> 112

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 112

Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly
1 5 10

10

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión terapéutica para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno de la coagulación sanguínea que comprende

- 5 (a) un factor de coagulación, en el que el factor de coagulación se selecciona de la lista que consiste en Factor IX, Factor VIII, Factor de van Willebrand, Factor V, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, Factor I, Factor II (Protrombina), Proteína C, Proteína S, GAS6 y Proteína Z,
(b) un polipéptido potenciador de la semivida, y
(c) un péptido enlazador que une el factor de coagulación y el polipéptido potenciador de la semivida;

10 en la que el enlazador peptídico se puede escindir mediante proteasas implicadas en la coagulación o se activa mediante enzimas de coagulación y en que la proteína de fusión terapéutica tiene, en comparación con la proteína de fusión terapéutica respectiva, enlazada por un enlazador no escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGV:

- 15 (i) una actividad específica molar aumentada en al menos un ensayo relacionado con la coagulación; y
(ii) una tasa de eliminación aumentada del factor de coagulación activado después de que el enlazador peptídico se escinde proteolíticamente en un modo relacionado con la coagulación.

2. La proteína de fusión terapéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha proteína de fusión tiene:

- 20 (a) una mayor recuperación *in vivo* en comparación con la recuperación *in vivo* del factor de coagulación respectivo que no está fusionado con un polipéptido potenciador de la semivida; y/o
(b) una semivida aumentada en plasma en comparación con la semivida en plasma del factor de coagulación respectivo que no está fusionado con un polipéptido potenciador de la semivida.

3. La proteína de fusión terapéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el factor de coagulación es FIX.

25 4. La proteína de fusión terapéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el factor de coagulación es FVIII.

5. La proteína de fusión terapéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en la que el enlazador se puede escindir mediante:

- 30 (a) la proteasa o proteasas, que activan el factor de coagulación; y/o
(b) la proteasa o proteasas que se activan tras la participación del factor de coagulación.

6. La proteína de fusión terapéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en la que el enlazador se puede escindir por FXIa y/o FVIIa/TF.

7. La proteína de fusión terapéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en la que el polipéptido potenciador de la semivida se selecciona del grupo que consiste en albúmina, polipéptidos de la albúmina e inmunoglobulinas sin dominio de unión al antígeno.

35 8. La proteína de fusión terapéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en la que:

- 40 (a) la actividad relacionada con la coagulación específica molar de la proteína de fusión terapéutica aumenta al menos un 25% en comparación con la de la proteína de fusión terapéutica enlazada por un enlazador no escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGV en al menos uno de los diferentes ensayos relacionados con la coagulación disponibles;
(b) la tasa de inactivación del factor de coagulación después de la escisión del enlazador peptídico que enlaza el factor de coagulación al polipéptido potenciador de la semivida aumenta en al menos un 10% en comparación con la tasa de inactivación del factor de coagulación en una fusión terapéutica correspondiente enlazada por un enlazador no escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGV; y/o
(c) la tasa de eliminación del factor de coagulación después de la escisión del enlazador peptídico que enlaza el factor de coagulación con el polipéptido potenciador de la semivida aumenta en al menos un 10% en comparación con la tasa de eliminación del factor de coagulación en una proteína de fusión terapéutica correspondiente enlazada por un enlazador no escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGV.

9. La proteína de fusión terapéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la proteína de fusión se formula como una composición farmacéutica.

50 10. La proteína de fusión terapéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 9, en la que el trastorno de la coagulación sanguínea es (a) hemofilia B, o (b) hemofilia A.

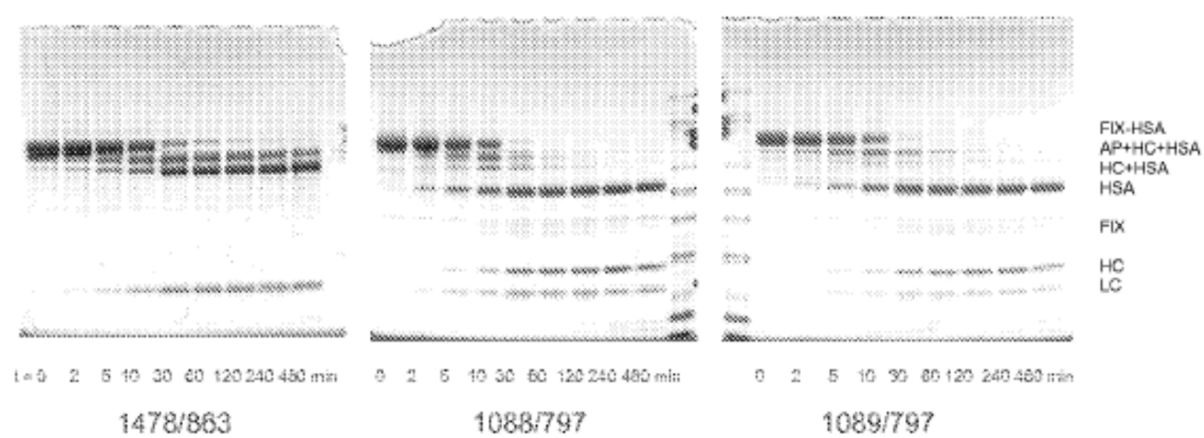


FIG.1

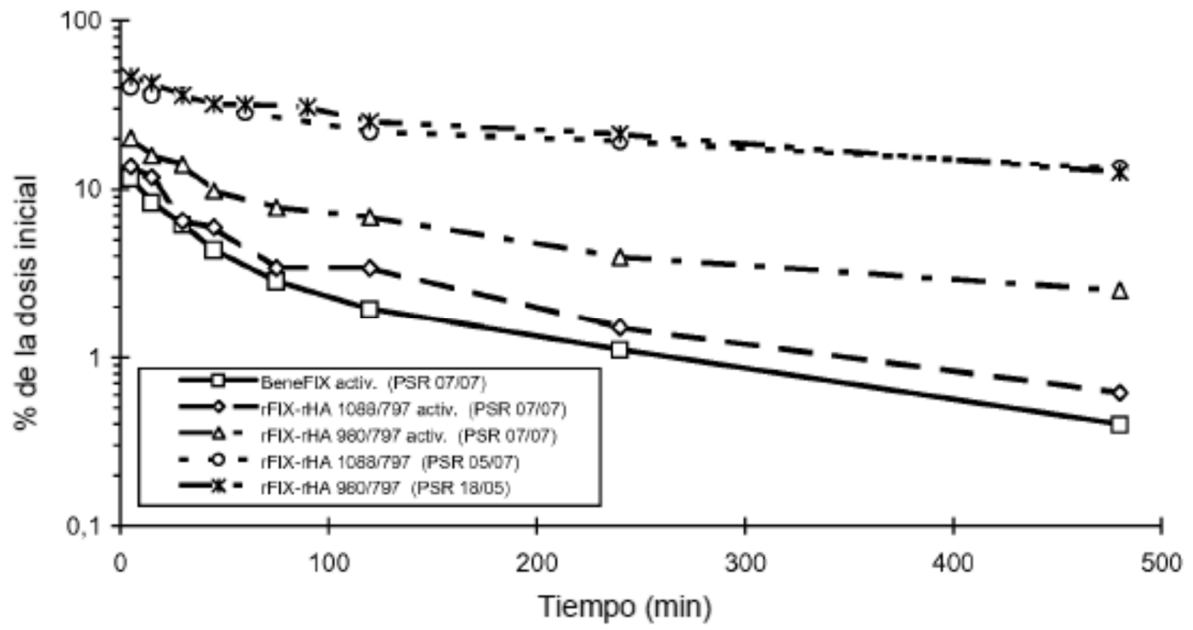


FIG.2

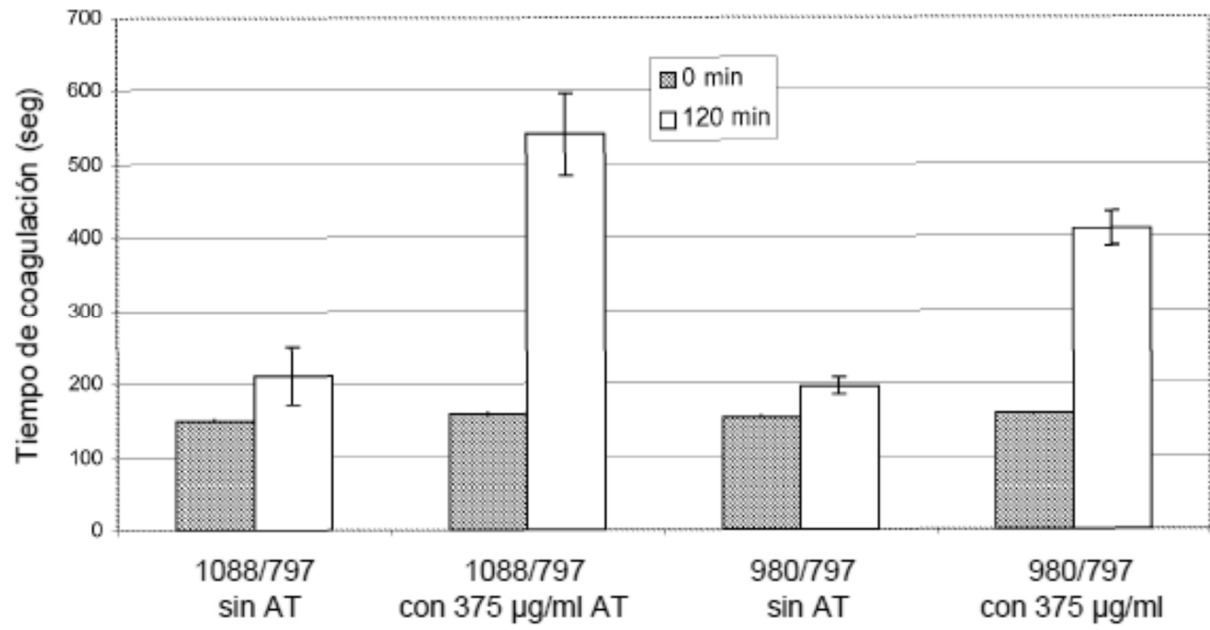


FIG.3