República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122020018510-4 B1

(22) Data do Depósito: 20/11/2013

(45) Data de Concessão: 14/03/2023

(54) Título: MÉTODO PARA AUMENTAR INCREMENTALMENTE O TAMANHO HIDRODINÂMICO DE UM FATOR DE COAGULAÇÃO ATIVADO VIIA

(51) Int.Cl.: C07K 14/47.

(30) Prioridade Unionista: 20/11/2012 US 61/728,662.

(73) Titular(es): OPKO BIOLOGICS LTD..

(72) Inventor(es): OREN HERSHKOVITZ; AHUVA BAR-ILAN.

(86) Pedido PCT: PCT IL2013050960 de 20/11/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/080401 de 30/05/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 10/09/2020

(62) Pedido Original do Dividido: BR112015011583-7 - 20/11/2013

(57) Resumo: Essa invenção está direcionada para o uso de um peptídeo carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica (CTP) ou fragmentos do mesmo para modificar um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo para aumentar o volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento.

MÉTODO PARA AUMENTAR INCREMENTALMENTE O TAMANHO HIDRODINÂMICO DE UM FATOR DE COAGULAÇÃO ATIVADO VIIa

(Dividido do BR 112015011583-7, depositado em 20/11/2013)

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] Esta invenção é direcionada para o uso de um peptídeo carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica (CTP) para aumentar o volume hidrodinâmico de um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo.

FUNDAMENTO DA INVENÇÃO

[002]Produtos de biotecnologia cobrem uma maior proporção de todas as drogas terapêuticas, incluindo anticorpos monoclonais, vacinas, fatores de crescimento, hormônios, citocinas, fatores de coagulação, proteínas de fusão, enzimas e outras proteínas. Diferente dos anticorpos monoclonais e vacinas, muitos nesta lista possuam uma massa molecular abaixo de 50 kDa e uma meia-vida terminal curta que está no intervalo de minutos a horas.

[003]A eficácia de medicamentos de proteína é fortemente determinada por suas propriedades farmacocinéticas, incluindo suas meias-vidas de plasma, que influenciam na distribuição e excreção. Apesar de um tamanho pequeno facilitar a penetração no tecido, estas moléculas são frequentemente rapidamente eliminadas da circulação. Assim, para manter uma concentração terapeuticamente eficaz durante um período prolongado de tempo, infusões ou administrações frequentes são realizadas, ou a droga é aplicada no local/região ou por via subcutânea utilizando uma adsorção lenta na corrente sanguínea. Essas limitações de drogas de proteínas de pequeno tamanho conduziram ao desenvolvimento e

implementação de estratégias de extensão de meia-vida para prolongar a circulação destes anticorpos recombinantes no sangue e, assim, melhorar a administração e propriedades farmacocinéticas, bem como farmacodinâmicas.

[004]A presente invenção emprega essa estratégia a fim de aumentar o tamanho ou volume hidrodinâmico de proteínas de interesse ou fragmentos das mesmas, incluindo peptídeos, por um determinado fator e, portanto, melhorar a administração, farmacocinética, bem como propriedades farmacodinâmicas das mesmas. Este aumento no volume hidrodinâmico é conseguido fazendo uso de uma tecnologia baseada em peptídeo para estender a meia vida de soro de proteínas e peptídeos. Esta tecnologia é baseada no uso de um peptídeo natural, o peptídeo C-terminal (CTP) da cadeia beta da gonadotrofina coriônica humana (hCG), que fornece à hCG a longevidade necessária para manter a gravidez. A cadeia beta do hormônio luteinizante (LH), um hormônio de fertilidade que desencadeia a ovulação, é quase idêntica à hCG, mas não inclui o CTP. Como resultado, o LH tem um meia-vida significativamente menor no sangue. A ligação de um número predeterminado de CTPs de uma proteína ou peptídeo de interesse aumenta o volume hidrodinâmico do mesmo por um fator específico e resulta em propriedades melhoradas de que incluem uma meia-vida no soro potencializada e a potência da proteína ou peptídeo de interesse.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005]Em uma modalidade, a invenção se refere a um método para aumentar o tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico de um polipeptídeo de interesse ou um

fragmento do mesmo, o método compreendendo ligar um a dez peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica (CTP) para dito polipeptídeo ou um fragmento do mesmo, em que ligar dito um a dez peptídeos CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo resulta em aumento do tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico do dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 28-53 kDa por cada CTP ligado, aumentando assim o tamanho hidrodinâmico do volume hidrodinâmico do dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[006] Em outra modalidade, a invenção se refere a um método para aumentar o tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico de um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo, o método compreendendo ligação de entre um a dez peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica (CTP) do dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo, em que ligar dito um a dez CTP ao dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo resulta em aumento do tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico de dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo por uma quantidade que é dependente do polipeptídeo particular ou fragmento do mesmo ao qual está o CTP ligado para, aumentando assim o tamanho hidrodinâmico do volume hidrodinâmico de dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[007]Outras características e vantagens da presente invenção se tornarão aparentes a partir da descrição detalhada, exemplos e figuras a seguir. Deve ser entendido, no entanto, que a descrição detalhada e exemplos específicos enquanto indicam modalidades preferenciais da invenção são dados a título de ilustração apenas, uma vez que várias alterações e modificações dentro do espírito e o escopo da invenção se tornarão aparentes para os

especialistas na técnica a partir desta descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[008]Os desenhos seguintes fazem parte da presente especificação e estão incluídos para demonstrar ainda mais determinados aspectos da presente divulgação, as invenções que podem ser mais bem entendidas por referência a um ou mais destes desenhos em combinação com a descrição detalhada das modalidades específicas aqui apresentadas.

[009]A **Figura 1** mostra uma análise de SDS-PAGE de seis diferentes proteínas modificadas com CTP purificadas e suas proteínas nativas correspondentes. **1.** CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023), **2.** Biotropin (rhGH), **3.** Marcador de tamanho, **4.** CTP-EPO-CTP-CTP, **5.** CTP-CTP-EPO, **6.** CTP-CTP-EPO-CTP-CTP, **7.** EPREX® (rEPO), **8.** Marcador de tamanho, **9.** APO-A1, **10.** Marcador de tamanho, **11.** Apo-CTP, **12.** Apo-CTP-CTP, **13.** Marcador de tamanho.

[010]A **Figura 2** mostra uma análise de SDS-PAGE de cinco diferentes proteínas modificadas com CTP purificadas e suas proteínas nativas correspondentes. **1.** FIX –CTP-CTP-CTP **2.** marcador de tamanho **3.** FIX-CTP-CTP-CTP- CTP **4.** FIX –CTP-CTP-CTP-CTP-CTP **5.** Mononine® (rFIX) **6.** marcador de tamanho **7.** FVIIa –CTP-CTP-CTP **8.** FVIIa –CTP-CTP-CTP-CTP-CTP **9.** marcador de tamanho.

[011]A **Figura 3** mostra incremento do peso molecular (kDa) de uma cópia de CTP de proteínas modificadas com CTP não glicosiladas (A) e glicosiladas (B) como medido por MALDI-TOF.

[012]A **Figura 4** mostra o incremento de tamanho hidrodinâmico de proteínas modificadas com CTP glicosiladas

em comparação com suas proteínas nativas correspondentes, medidas por SEC-HPLC. (A) apresenta o incremento total de tamanho hidrodinâmico, enquanto (B) apresenta o incremento calculado por uma cópia de CTP glicosilado.

[013]A **Figura 5** mostra o incremento de tamanho hidrodinâmico de proteínas modificadas com CTP não glicosiladas em comparação com suas proteínas nativas correspondentes, medidas por coluna SEC-HPLC. (A) apresenta o incremento total de tamanho hidrodinâmico, enquanto (B) apresenta o incremento calculado por uma cópia de CTP não glicosilado.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[014]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o volume hidrodinâmico ou tamanho hidrodinâmico de um polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de fundir o polipeptídeo ou fragmento do mesmo para pelo menos um peptídeo C-terminal de gonadotrofina coriônica (CTP) na extremidade N-terminal ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[015]Em uma modalidade, os termos “proteína” e “polipeptídeo” são usados de modo intercambiável aqui. Em outra modalidade, os termos “polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo” ou “proteína de interesse ou fragmento da mesma” incluem polipeptídeos nativos (produtos de degradação, polipeptídeos sinteticamente sintetizados ou polipeptídeos recombinantes) e peptidomiméticos (normalmente, polipeptídeos sinteticamente sintetizados), bem como peptoides e semipeptoides que são análogos de polipeptídeos, que têm, em outra modalidade, modificações

tornando os polipeptídeos modificados fornecidos aqui ainda mais estáveis enquanto em um organismo ou mais capazes de penetrar nas células. Além disso, os termos incluem peptídeos de interesse também. Em outra modalidade, pelo menos um peptídeo CTP aqui apresentado é ligado aos polipeptídeos de interesse ou fragmentos dos mesmos, ou peptídeos de interesse aqui fornecidos. Em outra modalidade, o termo "fragmento do mesmo" quando em referência a uma proteína ou polipeptídeo inclui versões truncadas da proteína ou polipeptídeo de interesse, incluindo peptídeos de interesse.

[016]Em outra modalidade, o termo "fragmento do mesmo" de uma proteína ou um polipeptídeo refere-se a um fragmento funcional (por exemplo, um fragmento que tem atividade biológica como a do polipeptídeo parente ou atividade potencializada em comparação com os polipeptídeos parentes). Exemplos de fragmentos dos mesmos podem incluir variantes do polipeptídeo ou peptídeos derivados do polipeptídeo parente. Portanto, deve ser compreendido que os termos "fragmento do mesmo" de uma proteína ou polipeptídeo, e o termo "peptídeo" podem ser usados de modo intercambiável aqui.

[017]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o volume hidrodinâmico ou tamanho hidrodinâmico de um polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo em cerca de 28 kDa, o método compreendendo a etapa de fundir o polipeptídeo ou fragmento do mesmo para pelo menos um peptídeo C-terminal de gonadotrofina coriônica (CTP) na extremidade N-terminal ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[018]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico de um polipeptídeo de interesse ou um fragmento do mesmo, o método compreendendo ligar um a dez peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica (CTP) para dito polipeptídeo ou um fragmento do mesmo, em que ligar dito um a dez peptídeos CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo resulta em aumento do tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico do dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico do dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo é aumentado em cerca de 28-53 kDa por cada CTP glicosilado ligado ao dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo, desse modo aumentando o tamanho hidrodinâmico do volume hidrodinâmico do dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico do dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo é aumentado em cerca de 8,0-22 kDa por cada CTP não glicosilado ligado ao dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo, desse modo aumentando o tamanho hidrodinâmico do volume hidrodinâmico do dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico do dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo é aumentado em cerca de 8,1-21,6 kDa por cada CTP não glicosilado ligado ao dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo, desse modo aumentando o tamanho hidrodinâmico do volume hidrodinâmico do dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[019]Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o tamanho hidrodinâmico ou volume

hidrodinâmico de um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo, o método compreendendo ligação de entre um a dez peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica (CTP) do dito polipeptídeo ou fragmento, em que ligar dito um a dez CTP ao dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo resulta em aumento do tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico de dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo por uma quantidade que é dependente do polipeptídeo particular ou fragmento do mesmo ao qual está o CTP ligado para, aumentando assim o tamanho hidrodinâmico do volume hidrodinâmico de dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[020]Em uma modalidade, dito um a dez CTPS são ligados ao N-terminal do dito polipeptídeo. Em outra modalidade, dito um a dez CTPS são ligados ao C-terminal do dito polipeptídeo. Em outra modalidade, dito um a dez CTPS são ligados ao N-terminal e ao C-terminal do dito polipeptídeo. Em outra modalidade, um CTP é ligado ao N-terminal do dito polipeptídeo e dois CTPs são ligados ao dito C-terminal do dito polipeptídeo. Em outra modalidade, dois CTPs estão ligados ao N-terminal do dito polipeptídeo e dois CTPs estão ligados ao dito C-terminal do dito polipeptídeo.

[021]Em uma modalidade, os termos “tamanho hidrodinâmico” ou “volume hidrodinâmico” são usados de modo intercambiável aqui e cada um se refere ao tamanho aparente de uma molécula (por exemplo, uma molécula de proteína) com base na difusão da molécula através de uma solução aquosa. A difusão, ou movimento de uma proteína através da solução pode ser processado para derivar um tamanho aparente da proteína, onde o tamanho é dado pelo “raio de stokes” ou “raio hidrodinâmico” da partícula de proteína. O “tamanho

hidrodinâmico” de uma proteína depende da massa e forma (conformação), de forma que duas proteínas tendo a mesma massa molecular podem ter diferentes tamanhos hidrodinâmicos baseados na conformação global da proteína.

[022]Em outra modalidade, o tipo de glicosilação é O-glicosilação. Em outra modalidade, o tipo de O-glicosilação é a ligação de GalNAc para serina (Ser) ou treonina (Thr) na cadeia de proteína por uma ligação a-glicosídica. Em outra modalidade, o tipo de O-glicosilação é a ligação de N-acetilglicosamina (GlcNac) para resíduos de Ser ou Thr na cadeia de proteína. Em outra modalidade, o tipo de O-glicosilação é O-fucosilação, O-manosilação, 1 O-glicosilação do núcleo, 2 O-glicosilação do núcleo ou O-glucosilação. Em outra modalidade, a O-glicosilação é O-glicosilação do tipo mucina. Em outra modalidade, a O-glicosilação compreende glicanos O-ligados ligados ao oxigênio hidroxi da serina, treonina, tirosina, hidroxilisina, ou cadeias laterais de hidroxiprolina. Em outra modalidade, a O-glicosilação é seguida pela adição de galactose e/ou ácido siálico, onde em outras modalidades pelo menos uma molécula de galactose é adicionada, e/ou pelo menos uma molécula de ácido siálico é adicionada à proteína de interesse seguindo O-glicosilação. Em outra modalidade, cerca de 1 a 3 moléculas de galactose são adicionadas. Em outra modalidade, cerca de 1 a 3 moléculas de ácido siálico são adicionadas. Em outra modalidade, cerca de 1 a 5 moléculas de galactose são adicionadas. Em outra modalidade, cerca de 1 a 5 moléculas de ácido siálico são adicionadas. Em outra modalidade, cerca de 1 a 10 moléculas de galactose são adicionadas. Em outra

modalidade, cerca de 1 a 20 moléculas de galactose são adicionadas. Em outra modalidade, cerca de 21 a 30 moléculas de galactose são adicionadas. Em outra modalidade, cerca de 31 a 40 moléculas de galactose são adicionadas. Em outra modalidade, cerca de 41 a 50 moléculas de galactose são adicionadas. Em outra modalidade, cerca de 51 a 60 moléculas de galactose são adicionadas. Em outra modalidade, cerca de 61 a 70 moléculas de galactose são adicionadas. Em outra modalidade, cerca de 1 a 10 moléculas de ácido siálico são adicionadas. Em outra modalidade, 2 moléculas de ácido siálico são adicionadas por cada molécula de galactose adicionada. Em outra modalidade, cerca de 1 a 5 moléculas de galactose são adicionadas por cada CTP. Em outra modalidade, cerca de 1 a 10 moléculas de ácido siálico são adicionadas por cada CTP. Em outra modalidade, cerca de 1 a 60 moléculas de galactose são adicionadas e cerca de 1 a 120 moléculas de ácido siálico são adicionadas no total por cada polipeptídeo modificado com CTP ou fragmento do mesmo.

[023]Em outra modalidade, o tipo de glicosilação aqui fornecida é N-glicosilação. Em outra modalidade, os glicanos N-ligados estão ligados a um nitrogênio de asparagina ou cadeias laterais de arginina. A sequência consenso de aminoácidos N-ligados é Asn-qualquer aminoácido-Ser ou Thr, onde qualquer aminoácido não pode ser prolina.

[024]Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico de um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo, o método compreendendo ligar pelo menos um peptídeo carbóxi

terminal de gonadotrofina coriônica (CTP) não glicosilado para o N-terminal ou C-terminal do polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo, em que a ligação de pelo menos um CTP para o polipeptídeo ou fragmento do mesmo resulta em aumento do tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em uma quantidade que é dependente do polipeptídeo particular ou fragmento do mesmo ao qual o CTP está ligado para, aumentando assim o tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico do dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[025]Em uma modalidade, CTP glicosilado aumenta o volume hidrodinâmico de uma proteína para a qual está ligada ou fundida. Em outra modalidade, CTP não glicosilado aumenta o volume hidrodinâmico de uma proteína para a qual está ligada ou fundida.

[026]Em uma modalidade, proteínas modificadas com CTP que contêm glicanos na parte nativa da proteína contribuem com um incremento superior ao volume hidrodinâmico de uma cópia de CTP glicosilado, por exemplo, Exemplo 3/Tabela 5 aqui demonstra que as proteínas modificadas com CTP FIX e FVIIa que contêm os glicanos na parte nativa da proteína contribuem para um incremento superior ao volume hidrodinâmico de uma cópia do CTP glicosilado.

[027]Será apreciado pelo especialista na técnica, quando guiado pela especificação da presente invenção, que combinações de CTPs glicosilados e não glicosilados podem ser empregados para uso para aumentar o tamanho ou volume hidrodinâmico de polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos. Essas manipulações podem ser realizadas a fim de aumentar o volume hidrodinâmico dos polipeptídeos ou

fragmentos dos mesmos para um nível ideal ou desejado. Em uma modalidade, esse nível ideal ou desejado de aumento do volume hidrodinâmico é associado com um tempo de retenção potencializado em um sujeito, uma taxa de depuração baixa do sujeito, e uma atividade biológica potencializada do polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo. Em uma modalidade, de 1 a 5 CTPs glicosilados e 1 a 5 CTPs não glicosilados são simultaneamente ligados a um polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui. Em outra modalidade, os peptídeos CTP glicosilados ou não glicosilados são conectados em tandem em N - ou C-terminal ou são aleatoriamente ligados para N- e C-terminal. Também será apreciado pelo especialista que combinações adicionais de peptídeos CTP glicosilados e não glicosilados podem ser usadas e, portanto, são incluídas pela presente invenção.

[028]Em uma modalidade, o termo “ligado” e variantes gramaticais dos mesmos se refere à ligação de uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo à outra proteína, polipeptídeo ou peptídeo. Em outra modalidade, essa ligação se refere à ligação de uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo de interesse para pelo menos um peptídeo CTP aqui fornecido. Em outra modalidade, essa ligação se refere à ligação de uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo de interesse para de um a dez peptídeos CTP aqui fornecidos. Essa ligação pode ser realizada através de numerosos meios que incluem, entre outros, ligação covalente, ligação de hidrogênio, ligação iônica, ligação metálica, ligação covalente polar, ligação não covalente (interações de van der waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, etc.), ligação com o uso de ligantes, e afins.

[029]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico de um polipeptídeo de interesse ou um fragmento do mesmo, o método compreendendo ligar pelo menos um peptídeo carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica (CTP) não glicosilado para o N-terminal ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, em que a ligação de pelo menos um CTP para o dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo resulta em aumento do tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em uma quantidade que é dependente do polipeptídeo particular ou fragmento do mesmo ao qual o CTP está ligado para, aumentando assim o tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico do dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[030]Em outra modalidade, o CTP aqui fornecido é desglicosilado usando métodos conhecidos na técnica que incluem, entre outros, desglicosilação baseada em enzima.

[031]Será apreciado pelo especialista que os termos "não glicosilação" e "desglicosilação" e variantes gramaticais dos mesmos são usadas de modo intercambiável aqui.

[032]Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar a atividade biológica *in vivo*, aumentando a meia-vida no soro, aumentando a biodisponibilidade, aumentando a potência ou estendendo a área sob a curva (AUC), etc., como ainda fornecido aqui, de um polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de fundir de pelo menos um peptídeo CTP glicosilado para o polipeptídeo ou fragmento do mesmo, em que a fusão do peptídeo CTP glicosilado para o polipeptídeo ou

fragmento do mesmo resulta em aumento do volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em pelo menos cerca de 28 kDa em comparação com o volume hidrodinâmico de um polipeptídeo não modificado ou fragmento do mesmo.

[033]Em outra modalidade, o polipeptídeo modificado com CTP tem atividade biológica *in vitro* mais baixa, mas esta baixa atividade é compensada por uma meia-vida estendida. Em outra modalidade, o polipeptídeo modificado com CTP tem uma atividade biológica *in vitro* aumentada.

[034]Em outra modalidade, o aumento do volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo aqui fornecido reduz a frequência de administração do polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o aumento do volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo também aumenta o peso molecular aparente do polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[035]Em uma modalidade, o peso molecular aparente é determinado usando métodos conhecidos na técnica, incluindo, entre outros, cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), métodos de dispersão dinâmica da luz (DLS), velocidade de sedimentação, centrifugação de equilíbrio de sedimentação e detecção espectrofotométrica. Em outra modalidade, o peso molecular teórico é determinado usando um software de proteômica disponível na técnica. Esses softwares incluem, entre outros, Expasy portal, ProteoIQ, Scaffold 3, e afins. Em outra modalidade, o peso molecular real é determinado usando métodos conhecidos na técnica, incluindo, entre outros, MALDI-TOF.

[036]Em outra modalidade, é fornecido aqui um método

para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo em pelo menos 28 kDa. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo em pelo menos cerca de 1-14 kDa, o método compreendendo ligar ao polipeptídeo ou fragmento do mesmo pelo menos um CTP. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 15 - 27 kDa, o método compreendendo ligar ao polipeptídeo ou fragmento do mesmo pelo menos um CTP. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 28 – 40,0 kDa, o método compreendendo ligar ao polipeptídeo ou fragmento do mesmo pelo menos um CTP. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 28 – 55,0 kDa, o método compreendendo ligar ao polipeptídeo ou fragmento do mesmo pelo menos um CTP. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 28 – 70,0 kDa, o método compreendendo ligar ao polipeptídeo ou fragmento do mesmo pelo menos um CTP. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 28 – 80,0 kDa, o método compreendendo ligar ao polipeptídeo ou fragmento do mesmo pelo menos um CTP. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca

de 28 – 90,0 kDa, o método compreendendo ligar ao polipeptídeo ou fragmento do mesmo pelo menos um CTP. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 28 – 100,0 kDa, o método compreendendo ligar ao polipeptídeo ou fragmento do mesmo pelo menos um CTP. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 41,0-50 kDa, o método compreendendo ligar ao polipeptídeo ou fragmento do mesmo pelo menos um CTP. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 51,0-60 kDa, o método compreendendo ligar ao polipeptídeo ou fragmento do mesmo pelo menos um CTP. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 61,0-70 kDa, o método compreendendo ligar ao polipeptídeo ou fragmento do mesmo pelo menos um CTP. Em outra modalidade, o CTP é glicosilado. Em outra modalidade, o CTP é um CTP não glicosilado.

[037]Em uma modalidade, os métodos fornecidos aqui inesperadamente demonstram que adições posteriores de peptídeos CTP glicosilados para um polipeptídeo de interesse ou um fragmento do mesmo contribuem linearmente em cerca do mesmo peso molecular aparente de uma ligação anterior a um peptídeo CTP para o polipeptídeo de interesse ou um fragmento do mesmo (ver Tabela 4).

[038]Em outra modalidade, pelo menos um CTP glicosilado contribui em cerca de 28 a 40 kDa por cada CTP

glicosilado à proteína de interesse. Em outra modalidade, pelo menos um CTP glicosilado contribui em cerca de 28 a 55 kDa por cada CTP glicosilado à proteína de interesse, independente do número de CTP ligados.

[039] Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo por um fator de cerca de 2 acima do peso molecular teórico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de ligar de um a dez peptídeos CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator de cerca de 3-5 acima do peso molecular teórico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de ligar pelo menos um peptídeo CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator de cerca de 6-10 acima do peso molecular teórico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de ligar de um a dez peptídeos CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator de cerca de 11-20 acima do peso molecular teórico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de ligar de um a dez peptídeos CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um

polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator de cerca de 21-30 acima do peso molecular teórico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de ligar de um a dez peptídeos CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de ligar pelo menos um peptídeo CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator de cerca de 31-40 acima do peso molecular teórico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de ligar de um a dez peptídeos CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator de cerca de 41-50 acima do peso molecular teórico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de ligar pelo menos um peptídeo CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator de cerca de 51-60 acima do peso molecular teórico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de ligar de um a dez peptídeos CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator de cerca de 61-70 acima do peso molecular teórico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de ligar de um a dez peptídeos CTP para dito polipeptídeo ou

fragmento do mesmo. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator de cerca de 71-80 acima do peso molecular teórico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de ligar de um a dez peptídeos CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator de cerca de 81-90 acima do peso molecular teórico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de ligar de um a dez peptídeos CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar o peso molecular aparente de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator de cerca de 91-100 acima do peso molecular teórico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, o método compreendendo a etapa de ligar de um a dez peptídeos CTP para dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, pelo menos um peptídeo CTP é ligado ao dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, de um a cinco peptídeos CTP são ligados ao dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, de um a quinze peptídeos CTP são ligados ao dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, de um a vinte peptídeos CTP são ligados ao dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, pelo menos um peptídeo CTP é glicosilado. Em outra modalidade, pelo menos um peptídeo CTP é um peptídeo CTP não glicosilado.

[040]Em outra modalidade, o método para aumentar a

atividade biológica, meia-vida no soro, biodisponibilidade, potência, etc., de um polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo ou um peptídeo de interesse, compreende aumentar o volume hidrodinâmico total do polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo em cerca de 28 kDa, em comparação com um polipeptídeo não modificado ou fragmento do mesmo, ligando ao dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo um CTP glicosilado. Em outra modalidade, o método para aumentar a atividade biológica, a meia-vida no soro, biodisponibilidade, etc., de um polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo compreende aumentar o volume hidrodinâmico total do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 1-10 kDa, 11-20 kDa, 21-30 kDa, 31-40 kDa, 41-50 kDa, 51-60 kDa, 61-70 kDa, 71-80 kDa, 81-90 kDa, 91-100 kDa, 100-150 kDa, 151-200 kDa, 201-400 kDa, 401-1000 kDa ou 1001-5000 kDa em comparação com um polipeptídeo não modificado de interesse ou fragmento do mesmo, ligando ao dito polipeptídeo ou fragmento do mesmo um CTP fornecido aqui.

[041]Em outra modalidade, nos métodos fornecidos aqui, pelo menos um CTP é glicosilado. Em outra modalidade, nos métodos fornecidos aqui pelo menos um CTP contribui para o volume hidrodinâmico de cerca de 28,3 a 38,7 kDa por cada CTP para o polipeptídeo ou fragmento do mesmo também fornecido aqui. Em outra modalidade, o CTP glicosilado contribui em 28,3 a 38,7 kDa por cada CTP independentemente de qual polipeptídeo ou fragmento do mesmo está ligado (ver Exemplo 3 aqui). Em outra modalidade, o CTP glicosilado contribui em 28,3 a 38,7 kDa por cada CTP independentemente do número de peptídeos CTP ligados ao polipeptídeo (ver

Exemplo 3 aqui). Em outra modalidade, a contribuição de pelo menos um CTP é pelo menos 20 kDa. Em outra modalidade, a contribuição de pelo menos um CTP é pelo menos cerca de 20 kDa a 27,9 kDa. Em outra modalidade, a contribuição de um CTP é pelo menos 28 kDa. Em outra modalidade, a contribuição de um CTP é cerca de 28 kDa a 40 kDa. Em outra modalidade, a contribuição de um CTP é cerca de 41 kDa a 50 kDa. Em outra modalidade, a contribuição de um CTP é cerca de 51 kDa a 60 kDa.

[042] Em outra modalidade, o método para aumentar a meia-vida no soro de ou potencializar a potência do polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo compreende aumentar o volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 84 kDa em comparação com um polipeptídeo não modificado ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o aumento do volume hidrodinâmico em cerca de 84 kDa corresponde ao polipeptídeo ou fragmento do mesmo sendo modificado ligando o mesmo para 3 peptídeos CTP glicosilados, de acordo com os métodos fornecidos aqui. Em outra modalidade, fora os 3 peptídeos CTP glicosilados ligados ao polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui, um peptídeo CTP glicosilado é ligado ao N-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, enquanto 2 peptídeos CTP glicosilados estão ligados em tandem ao C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[043]Em uma modalidade, o método para aumentar a meia-vida no soro do ou a atividade biológica do polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo, compreende aumentar o tamanho hidrodinâmico ou volume do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 84 – 159 kDa em comparação

com um polipeptídeo não modificado ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 56-110 kDa é alcançado ligando 2 peptídeos CTP glicosilados para o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 84-162 kDa é alcançado ligando 3 peptídeos CTP glicosilados para o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 112-230 kDa é alcançado ligando 4 peptídeos CTP glicosilados para o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 140-280 kDa é alcançado ligando 5 peptídeos CTP glicosilados para o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 168-330 kDa é alcançado ligando 6 peptídeos CTP glicosilados para o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 196-390 kDa é alcançado ligando 7 peptídeos CTP glicosilados para o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 224-425 kDa é alcançado ligando 8 peptídeos CTP glicosilados para o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 252-480 kDa é alcançado ligando 9 peptídeos CTP glicosilados para o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 280-330 kDa é alcançado

ligando 10 peptídeos CTP glicosilados para o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo.

[044]Em uma modalidade, os métodos fornecidos aqui também compreendem ligar um CTP não glicosilado para um polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo. Deve ser entendido que várias maneiras de modificar um polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo, com um CTP glicosilado e/ou não glicosilado podem ser realizadas. Em uma modalidade, um polipeptídeo de interesse ou um fragmento do mesmo é modificado com pelo menos um CTP glicosilado sozinho, ou pelo menos um CTP não glicosilado sozinho. Em outra modalidade, um polipeptídeo de interesse ou um fragmento do mesmo é modificado com pelo menos um CTP glicosilado e pelo menos um CTP não glicosilado. Em outra modalidade, versões truncadas de ambos, CTPs glicosilados e/ou não glicosilados são empregados para uso em métodos fornecidos aqui.

[045]Em outra modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar a atividade biológica, meia-vida no soro, biodisponibilidade, potência, etc., de um polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aumentando o volume hidrodinâmico do polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo com uma quantidade específica, o método compreendendo ligar pelo menos um peptídeo carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica (CTP) para o N-terminal ou C-terminal do polipeptídeo, em que a ligação de pelo menos um peptídeo CTP não glicosilado para o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo resulta em aumento do tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo, em comparação com uma

forma não modificada do polipeptídeo ou do fragmento do mesmo, e em que a quantidade específica é dependente do polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo ao qual o CTP não glicosilado está ligado. Em outra modalidade, quando pelo menos um CTP não glicosilado está ligado para o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo, o polipeptídeo de interesse para o qual o CTP não glicosilado está ligado para determinar a quantidade de aumento do peso molecular aparente ou volume hidrodinâmico. Em outra modalidade, quando um CTP não glicosilado está ligado ao hGH, o CTP não glicosilado contribui em cerca de 8 kDa ao tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico de hormônio do crescimento humano (hGH). Em outra modalidade, quando um CTP não glicosilado está ligado à eritropoietina (EPO), o CTP não glicosilado contribui em cerca de 16 kDa ao tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico de EPO. Em outra modalidade, quando um CTP não glicosilado está ligado à apolipoproteína-A1 (APO-A1), o CTP não glicosilado contribui em cerca de 21 kDa ao tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico de APO-A1. Em outra modalidade, quando um CTP não glicosilado está ligado ao Fator IX (FIX), o CTP não glicosilado contribui em cerca de 20 kDa ao tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico de FIX. Em outra modalidade, quando um CTP não glicosilado está ligado ao Fator VIIa (FVIIa), o CTP não glicosilado contribui em cerca de 20 kDa ao tamanho hidrodinâmico ou volume hidrodinâmico de FIX.

[046]Em uma modalidade, o método para aumentar o volume hidrodinâmico de um polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo fornecido aqui potencializa a

biodisponibilidade do polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[047]Em outra modalidade, o método para aumentar o volume hidrodinâmico de um polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo fornecido aqui reduz a frequência de dosagem do polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo.

[048]Em uma modalidade, o polipeptídeo que é modificado pelos métodos aqui fornecidos é uma citocina, um anticorpo monoclonal, um fator de crescimento, uma hormônio, uma citocina, um fator de coagulação, uma enzima e afins.

[049]Em outra modalidade, o polipeptídeo ao qual pelo menos um peptídeo CTP é ligado é eritropoietina (EPO), hormônio do crescimento humano (hGH), apolipoproteína A1 (APO-A1), Fator IIa (FVIIa), fator IX (FIX) ou oxintomodulina (OXM).

[050] Em uma modalidade, pelo menos um CTP não glicosilado contribui em cerca de 16 kDa para EPO. Em outra modalidade, pelo menos um CTP não glicosilado contribui em cerca de 16 kDA ao peso molecular aparente de EPO, quando ligado à EPO. Em outra modalidade, pelo menos um CTP não glicosilado contribui em cerca de 8 kDa para hGH. Em outra modalidade, pelo menos um CTP não glicosilado contribui em cerca de 8 kDA ao peso molecular aparente de hGH, quando ligado ao hGH. Em outra modalidade, pelo menos um CTP não glicosilado contribui em cerca de 21 kDa para APO-A1. Em outra modalidade, pelo menos um CTP não glicosilado contribui em cerca de 21 kDA ao peso molecular aparente de APO-A1, quando ligado à APO-A1.

[051]Em uma modalidade, o CTP não glicosilado contribui para um volume hidrodinâmico diferente para cada

polipeptídeo ao qual o CTP não glicosilado está ligado. Em outra modalidade, essa diferença depende do polipeptídeo ou fragmento do mesmo ao qual o CTP não glicosilado está ligado (ver Exemplo 3 aqui). Em outra modalidade, o CTP não glicosilado contribui inesperadamente para o mesmo tamanho hidrodinâmico por cada CTP em cada polipeptídeo particular independentemente do número de peptídeos CTP não glicosilado ligados ao polipeptídeo (ver Exemplo 3 aqui).

[052]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar a meia-vida no soro de, ou a atividade biológica de hGH, o método compreendendo a etapa de aumentar o tamanho ou volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 28-40 kDa em comparação com um hGH não modificado. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 56-80 kDa é alcançado ligando cerca de 2 peptídeos CTP glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 84-120 kDa é alcançado ligando cerca de 3 peptídeos CTP glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 112-160 kDa é alcançado ligando cerca de 4 peptídeos CTP glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 140-200 kDa é alcançado ligando cerca de 5 peptídeos CTP glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 168-240 kDa é alcançado ligando cerca de 6 peptídeos CTP glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 196-280 kDa é alcançado ligando cerca de 7 peptídeos CTP glicosilados

para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 224-320 kDa é alcançado ligando cerca de 8 peptídeos CTP glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 252-360 kDa é alcançado ligando cerca de 9 peptídeos CTP glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 280-400 kDa é alcançado ligando cerca de 10 peptídeos CTP glicosilados para hGH. Em outra modalidade, de um a dez peptídeos CTP truncado ou parciais são ligados para o polipeptídeo de interesse ou fragmento dos mesmos.

[053]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar a meia-vida no soro de, ou a atividade biológica de EPO, o método compreendendo a etapa de aumentar o tamanho ou volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 28-40 kDa em comparação com uma EPO não modificada. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 56-80 kDa é alcançado ligando cerca de 2 peptídeos CTP glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 84-120 kDa é alcançado ligando cerca de 3 peptídeos CTP glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 112-160 kDa é alcançado ligando cerca de 4 peptídeos CTP glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 140-200 kDa é alcançado ligando cerca de 5 peptídeos CTP glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 168-240 kDa é alcançado ligando cerca de 6 peptídeos CTP

glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 196-280 kDa é alcançado ligando cerca de 7 peptídeos CTP glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 224-320 kDa é alcançado ligando 8 peptídeos CTP glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 252-360 kDa é alcançado ligando cerca de 9 peptídeos CTP glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 280-400 kDa é alcançado ligando cerca de 10 peptídeos CTP glicosilados para EPO.

[054]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar a meia-vida no soro de, ou a atividade biológica de APO-A1, o método compreendendo a etapa de aumentar o tamanho ou volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 28-40 kDa em comparação com uma APO-A1 não modificada. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 56-80 kDa é alcançado ligando 2 peptídeos CTP glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 84-120 kDa é alcançado ligando 3 peptídeos CTP glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 112-160 kDa é alcançado ligando 4 peptídeos CTP glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 140-200 kDa é alcançado ligando 5 peptídeos CTP glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 168-240 kDa é alcançado ligando 6

peptídeos CTP glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 196-280 kDa é alcançado ligando 7 peptídeos CTP glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 224-320 kDa é alcançado ligando 8 peptídeos CTP glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 252-360 kDa é alcançado ligando 9 peptídeos CTP glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 280-400 kDa é alcançado ligando 10 peptídeos CTP glicosilados para APO-A1.

[055]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar a meia-vida no soro de, ou a atividade biológica de FIX, o método compreendendo a etapa de aumentar o tamanho ou volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 48-53 kDa em comparação com um FIX não modificado. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 96-106 kDa é alcançado ligando 2 peptídeos CTP glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 144-159 kDa é alcançado ligando 3 peptídeos CTP glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 192-212 kDa é alcançado ligando 4 peptídeos CTP glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 240-265 kDa é alcançado ligando 5 peptídeos CTP glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 288-318 kDa é alcançado ligando 6 peptídeos CTP

glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 336-371 kDa é alcançado ligando 7 peptídeos CTP glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 384-424 kDa é alcançado ligando 8 peptídeos CTP glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 432-530 kDa é alcançado ligando 9 peptídeos CTP glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 480-530 kDa é alcançado ligando 10 peptídeos CTP glicosilados para FIX.

[056]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar a meia-vida no soro de, ou a atividade biológica de FVIIa, o método compreendendo a etapa de aumentar o tamanho ou volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 43-50 kDa em comparação com um FVIIa não modificado. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 86-100 kDa é alcançado ligando 2 peptídeos CTP glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 129-150 kDa é alcançado ligando 3 peptídeos CTP glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 172-200 kDa é alcançado ligando 4 peptídeos CTP glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 215-250 kDa é alcançado ligando 5 peptídeos CTP glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 258-300 kDa é alcançado ligando 6 peptídeos CTP glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade,

o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 301-350 kDa é alcançado ligando 7 peptídeos CTP glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 344-400 kDa é alcançado ligando 8 peptídeos CTP glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 387-450 kDa é alcançado ligando 9 peptídeos CTP glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 430-500 kDa é alcançado ligando 10 peptídeos CTP glicosilados para FVIIa.

[057]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar a meia-vida no soro de, ou a atividade biológica de hGH, o método compreendendo a etapa de aumentar o tamanho ou volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 8 kDa em comparação com um hGH não modificado. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 16 kDa é alcançado ligando 2 peptídeos CTP não glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 24 kDa é alcançado ligando 3 peptídeos CTP não glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 32 kDa é alcançado ligando 4 peptídeos CTP não glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 40 kDa é alcançado ligando 5 peptídeos CTP não glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 48 kDa é alcançado ligando 6 peptídeos CTP não glicosilados para hGH. Em outra

modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 56 kDa é alcançado ligando 7 peptídeos CTP não glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 64 kDa é alcançado ligando 8 peptídeos CTP não glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 72 kDa é alcançado ligando 9 peptídeos CTP não glicosilados para hGH. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 80 kDa é alcançado ligando 10 peptídeos CTP não glicosilados para hGH.

[058]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar a meia-vida no soro de, ou a atividade biológica de EPO, o método compreendendo a etapa de aumentar o tamanho ou volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 16 kDa em comparação com uma EPO não modificado. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 32 kDa é alcançado ligando 2 peptídeos CTP não glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 48 kDa é alcançado ligando 3 peptídeos CTP não glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 16 kDa é alcançado ligando 4 peptídeos CTP não glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 80 kDa é alcançado ligando 5 peptídeos CTP não glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 96 kDa é alcançado ligando 6 peptídeos CTP não glicosilados para EPO. Em outra

modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 112 kDa é alcançado ligando 7 peptídeos CTP não glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 128 kDa é alcançado ligando 8 peptídeos CTP não glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 144 kDa é alcançado ligando 9 peptídeos CTP não glicosilados para EPO. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 160 kDa é alcançado ligando 10 peptídeos CTP não glicosilados para EPO.

[059]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar a meia-vida no soro de, ou a atividade biológica de APO-A1, o método compreendendo a etapa de aumentar o tamanho ou volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 21 kDa em comparação com uma APO-A1 não modificada. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 42 kDa é alcançado ligando 2 peptídeos CTP não glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 63-120 kDa é alcançado ligando 3 peptídeos CTP não glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 84 kDa é alcançado ligando 4 peptídeos CTP não glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 105 kDa é alcançado ligando 5 peptídeos CTP não glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 126 kDa é alcançado ligando 6 peptídeos CTP não glicosilados para APO-A1. Em outra

modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 147 kDa é alcançado ligando 7 peptídeos CTP não glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 168 kDa é alcançado ligando 8 peptídeos CTP não glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 189 kDa é alcançado ligando 9 peptídeos CTP não glicosilados para APO-A1. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 210 kDa é alcançado ligando 10 peptídeos CTP não glicosilados para APO-A1.

[060]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar a meia-vida no soro de ou a atividade biológica de FIX, o método compreendendo a etapa de aumentar o tamanho ou volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 20 kDa em comparação com um FIX não modificado. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 40 kDa é alcançado ligando 2 peptídeos CTP não glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 60 kDa é alcançado ligando 3 peptídeos CTP não glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 80 kDa é alcançado ligando 4 peptídeos CTP não glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 100 kDa é alcançado ligando 5 peptídeos CTP não glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 120 kDa é alcançado ligando 6 peptídeos CTP não glicosilados para FIX. Em outra

modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 140 kDa é alcançado ligando 7 peptídeos CTP não glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 160 kDa é alcançado ligando 8 peptídeos CTP não glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 180 kDa é alcançado ligando 9 peptídeos CTP não glicosilados para FIX. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 200 kDa é alcançado ligando 10 peptídeos CTP não glicosilados para FIX.

[061]Em uma modalidade, é fornecido aqui um método para aumentar a meia-vida no soro de ou a atividade biológica de FVIIa, o método compreendendo a etapa de aumentar o tamanho ou volume hidrodinâmico do polipeptídeo ou fragmento do mesmo em cerca de 20 kDa em comparação com um FVIIa não modificado. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 40 kDa é alcançado ligando 2 peptídeos CTP não glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 60 kDa é alcançado ligando 3 peptídeos CTP não glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 80 kDa é alcançado ligando 4 peptídeos CTP não glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 100 kDa é alcançado ligando 5 peptídeos CTP não glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 120 kDa é alcançado ligando 6 peptídeos CTP não glicosilados para FVIIa. Em outra

modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 140 kDa é alcançado ligando 7 peptídeos CTP não glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 160 kDa é alcançado ligando 8 peptídeos CTP não glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 180 kDa é alcançado ligando 9 peptídeos CTP não glicosilados para FVIIa. Em outra modalidade, o aumento do tamanho ou volume hidrodinâmico em cerca de 200 kDa é alcançado ligando 10 peptídeos CTP não glicosilados para FVIIa.

[062]Em uma modalidade, o volume hidrodinâmico aumenta o tempo de retenção da proteína de interesse em uma amostra biológica. Em outra modalidade, o volume hidrodinâmico aumenta a área sob a curva (AUC) da proteína de interesse em uma amostra biológica. Em outra modalidade, a amostra biológica é sangue, tecidos alvo (por exemplo, articulação, CNS), fluido cérebro-espinhal (CSF) linfa, ou soros.

[063]Em outra modalidade, o aumento do volume hidrodinâmico aumenta a biodisponibilidade do polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo fornecido aqui. Em outra modalidade, o aumento do volume hidrodinâmico do polipeptídeo também estende a meia-vida no soro do polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[064]Em outra modalidade, o aumento do volume hidrodinâmico aumenta a bioatividade do polipeptídeo.

[065]Em outra modalidade, os termos “peptídeo CTP”, “peptídeo carbóxi terminal” e “sequência CTP” são usados de modo intercambiável aqui. Em outra modalidade, o peptídeo carbóxi terminal é um CTP inteiro. Em outra modalidade, o

peptídeo carbóxi terminal é um CTP truncado. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[066]Em outra modalidade, um peptídeo sinal é ligado ao amino terminal do CTP, conforme descrito em U.S. 7.553.940, que é incorporado como referência aqui na íntegra.

[067]Em outra modalidade, pelo menos um CTP está ligado ao polipeptídeo através de um ligante. Em outra modalidade, o ligante é uma ligação peptídica. Em outra modalidade, a proteína fundida forma um polipeptídeo modificado com CTP. Em uma modalidade, o método para aumentar um volume hidrodinâmico de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo compreende fundir os polipeptídeos ou fragmentos doe mesmos para pelo menos um peptídeo CTP em amino ou carboxil terminal dos polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos. Em outra modalidade, o CTP é fundido de forma recombinante aos polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos. Em outra modalidade, o CTP é conjugado quimicamente aos polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos.

[068]Em uma modalidade, o polipeptídeo modificado com CTP compreende um peptídeo que compreende menos de 50 aminoácidos e pelo menos um peptídeo carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica, ligado a um N-(amino) ou um C-(carbóxi) terminal do peptídeo.

[069]Em uma modalidade, polipeptídeos projetados de interesse da invenção compreendendo pelo menos um único CTP ligado ao seu N-terminal e/ou C-terminal são pelo menos equivalentes aos polipeptídeos não CTP modificado de interesse, em termos de atividade biológica. Em outra

modalidade, polipeptídeos projetados de interesse da invenção compreendendo pelo menos um único CTP ligado ao seu N-terminal e/ou C-terminal são pelo menos equivalentes aos polipeptídeos não CTP modificado de interesse, em termos medidas farmacológicas como farmacocinética e farmacodinâmica.

[070]Em uma modalidade, a sequência CTP aqui fornecida compreende: DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL (SEQ ID NO: 1). Em outra modalidade, a sequência CTP compreende: SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 2). Em outra modalidade, a sequência CTP compreende uma sequência de aminoácidos selecionada das sequências estabelecidas em SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2. Ainda em outra modalidade, a sequência CTP é selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2.

[071]Em uma modalidade, o peptídeo carbóxi terminal (CTP) da presente invenção compreende a sequência de aminoácidos do aminoácido 112 para posição 145 da gonadotrofina coriônica humana. Em outra modalidade, a sequência do CTP da presente invenção compreende a sequência de aminoácidos do aminoácido 118 para posição 145 da gonadotrofina coriônica humana, como estabelecido em SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade, a sequência do CTP também começa a partir de qualquer posição entre posições 112-118 e termina na posição 145 da gonadotrofina coriônica humana. Em outra modalidade, o peptídeo da sequência do CTP tem 28, 29, 30, 31, 32, 33 ou 34 aminoácidos de comprimento e começa na posição 112, 113, 114, 115, 116, 117 ou 118 da sequência de aminoácidos do CTP.

[072]Em uma modalidade, o CTP truncado compreende os

primeiros 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 3 compreende a seguinte sequência de aminoácidos (AA): SSSSKAPPPSLP.

[073]Em uma modalidade, o CTP truncado compreende os primeiros 11 aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade, o CTP truncado compreende os primeiros 12 aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade, o CTP truncado compreende os primeiros 8 aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3. Em uma modalidade, o CTP truncado compreende os primeiros 13 aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade, o CTP truncado compreende os primeiros 14 aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade, o CTP truncado compreende os primeiros 6 aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3. Em uma modalidade, o CTP truncado compreende os primeiros 5 aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3.

[074]Em outra modalidade, o peptídeo CTP é uma variante da CTP de gonadotrofina coriônica que difere do CTP nativo por 1-5 substituições de aminoácido conservadoras conforme descrito em Patente US 5.712.122, que está incorporada aqui como referência. Em outra modalidade, o peptídeo CTP é uma variante da CTP de gonadotrofina coriônica que difere do CTP nativo por 1 substituição de aminoácido conservadora. Em outra modalidade, o peptídeo CTP é uma variante da CTP de gonadotrofina coriônica que difere do CTP nativo por 2 substituições de aminoácido conservadoras. Em outra modalidade, o peptídeo CTP é uma variante da CTP de gonadotrofina coriônica que difere do CTP nativo por 3 substituições de aminoácido conservadoras. Em outra

modalidade, o peptídeo CTP é uma variante da CTP de gonadotrofina coriônica que difere do CTP nativo por 4 substituições de aminoácido conservadoras. Em outra modalidade, o peptídeo CTP é uma variante da CTP de gonadotrofina coriônica que difere do CTP nativo por 5 substituições de aminoácido conservadoras.

[075]Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do peptídeo CTP da presente invenção é pelo menos 40% homóloga para a sequência de aminoácidos do CTP nativa ou um peptídeo do mesmo. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do peptídeo CTP da presente invenção é pelo menos 50% homóloga para a sequência de aminoácidos do CTP nativa ou um peptídeo do mesmo. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do peptídeo CTP da presente invenção é pelo menos 60% homóloga para a sequência de aminoácidos do CTP nativa ou um peptídeo do mesmo. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do peptídeo CTP da presente invenção é pelo menos 70% homóloga para a sequência de aminoácidos do CTP nativa ou um peptídeo do mesmo. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do peptídeo CTP da presente invenção é pelo menos 80% homóloga para a sequência de aminoácidos do CTP nativa ou um peptídeo do mesmo. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do peptídeo CTP da presente invenção é pelo menos 90% homóloga para a sequência de aminoácidos do CTP nativa ou um peptídeo do mesmo. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do peptídeo CTP da presente invenção é pelo menos 95% homóloga para a sequência de aminoácidos do CTP nativa ou um peptídeo do mesmo. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do peptídeo CTP da

presente invenção é pelo menos 98% homóloga para a sequência de aminoácidos do CTP nativa ou um peptídeo do mesmo.

[076]Em outra modalidade, o polinucleotídeo que codifica o peptídeo CTP da presente invenção é pelo menos 70% homólogo à sequência de DNA do CTP humano nativa ou um peptídeo do mesmo. Em outra modalidade, o polinucleotídeo que codifica o peptídeo CTP da presente invenção é pelo menos 80% homólogo à sequência de DNA do CTP humano nativa ou um peptídeo do mesmo. Em outra modalidade, o polinucleotídeo que codifica o peptídeo CTP da presente invenção é pelo menos 90% homólogo à sequência de DNA do CTP nativa ou um peptídeo do mesmo. Em outra modalidade, o polinucleotídeo que codifica o peptídeo CTP da presente invenção é pelo menos 95% homólogo à sequência de DNA do CTP nativa ou um peptídeo do mesmo. Em outra modalidade, o polinucleotídeo que codifica o peptídeo CTP da presente invenção é pelo menos 98% homólogo à sequência de DNA do CTP nativa ou um peptídeo do mesmo.

[077]Em uma modalidade, pelo menos uma das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica é truncada. Em outra modalidade, ambas as sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são truncadas. Em outra modalidade, duas das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são truncadas. Em outra modalidade, três das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são truncadas. Em outra modalidade, quatro das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são truncadas. Em outra modalidade, cinco das sequências de

aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são truncadas. Em outra modalidade, seis das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são truncadas. Em outra modalidade, sete das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são truncadas. Em outra modalidade, oito das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são truncadas. Em outra modalidade, duas ou mais das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são truncadas. Em outra modalidade, todas as sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são truncadas.

[078]Em uma modalidade, os peptídeos CTP aqui fornecidos estão ligados aos polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos através de um ligante. Em uma modalidade, de um a dez peptídeos CTP aqui fornecidos estão ligados aos polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos através de um ligante. Em uma modalidade, pelo menos um CTP está ligado aos polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos através de um ligante. Em outra modalidade, o ligante é uma ligação peptídica.

[079]Em uma modalidade, pelo menos uma das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica é glicosilada. Em outra modalidade, ambas as sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são glicosiladas. Em outra modalidade, duas das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são glicosiladas. Em outra modalidade, três das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são glicosiladas. Em outra modalidade, quatro das sequências de

aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são glicosiladas. Em outra modalidade, cinco das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são glicosiladas. Em outra modalidade, duas ou mais das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são glicosiladas. Em outra modalidade, todas as sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são glicosiladas.

[080]Em uma modalidade, pelo menos uma das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica é não glicosilada. Em outra modalidade, ambas as sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são não glicosiladas. Em outra modalidade, duas das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são não glicosiladas. Em outra modalidade, três das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são não glicosiladas. Em outra modalidade, quatro das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são não glicosiladas. Em outra modalidade, cinco das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são não glicosiladas. Em outra modalidade, duas ou mais das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são não glicosiladas. Em outra modalidade, todas as sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica são não glicosiladas.

[081]Em uma modalidade, a sequência do CTP glicosilada da presente invenção compreende pelo menos um sítio de glicosilação. Em outra modalidade, a sequência do CTP glicosilada da presente invenção compreende dois sítios de glicosilação. Em outra modalidade, a sequência do CTP

glicosilada da presente invenção compreende três sítios de glicosilação. Em outra modalidade, a sequência do CTP glicosilada da presente invenção compreende quatro sítios de glicosilação. Em outra modalidade, a sequência do CTP glicosilada da presente invenção compreende cinco sítios de glicosilação. Em outra modalidade, a sequência do CTP glicosilada da presente invenção compreende seis sítios de glicosilação. Em outra modalidade, a sequência do CTP glicosilada da presente invenção compreende sete sítios de glicosilação. Em outra modalidade, a sequência do CTP glicosilada da presente invenção compreende oito sítios de glicosilação. Em outra modalidade, a sequência do CTP glicosilada da presente invenção compreende de um a quatro sítios de glicosilação. Em outra modalidade, a sequência do CTP glicosilada da presente invenção compreende de quatro a nove sítios de glicosilação. Em outra modalidade, a sequência do CTP glicosilada da presente invenção compreende de seis a doze sítios de glicosilação.

[082]Em uma modalidade, pelo menos uma das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica é totalmente glicosilada. Em outra modalidade, pelo menos uma das sequências de aminoácidos do CTP de gonadotrofina coriônica é parcialmente glicosilada. Em uma modalidade, parcialmente glicosilada indica que pelo menos um dos sítios de glicosilação do CTP é glicosilado. Em outra modalidade, os sítios de glicosilação são sítios de O-glicosilação. Em outra modalidade, os sítios de glicosilação são sítios de N-glicosilação.

[083]Em uma modalidade, a modificação da sequência do CTP é vantajosa em permitir o uso de doses mais baixas

quando ligado a um polipeptídeo, droga ou agente de interesse. Em outra modalidade, a modificação da sequência do CTP é vantajosa em permitir menos doses de um polipeptídeo, droga ou agente de interesse. Em outra modalidade, a modificação das sequências do CTP é vantajosa um efeito seguro, de longa duração quando administrando um polipeptídeo modificado com CTP, droga, ou agente de interesse.

[084]Em outra modalidade, modificações de polipeptídeos de interesse e peptídeos CTP aqui incluem, entre outras, a modificação C terminal, modificação de ligação de polipeptídeo, incluindo, entre outras, CH2-NH, CH2-S, CH2-S=O, O=C-NH, CH2-O, CH2-CH2, S=C-NH, CH=CH ou CF=CH, modificações de estrutura e modificação de resíduo. Métodos para preparar compostos peptidomiméticos são bem conhecidos na técnica e são especificados, por exemplo, em Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), que é incorporado como referência como se totalmente estabelecido aqui. Mais detalhes a este respeito são fornecidos abaixo.

[085]Em outra modalidade, ligações de polipeptídeos (-CO-NH-) dentro do polipeptídeo são substituídas. Em outra modalidade, as ligações de polipeptídeo são substituídas por ligações N-metiladas (-N(CH3)-CO-). Em outra modalidade, as ligações de polipeptídeo são substituídas por ligações éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-). Em outra modalidade, as ligações de polipeptídeo são substituídas por ligações cetometileno (-CO-CH2-). Em outra modalidade, as ligações de polipeptídeo são substituídas por ligações α-aza (-NH-N(R)-CO-), em que R é qualquer alquil, por

exemplo, metil, ligações carba (-CH2-NH-). Em outra modalidade, as ligações de polipeptídeo são substituídas por ligações hidroxietileno (-CH(OH)-CH2-). Em outra modalidade, as ligações de polipeptídeo são substituídas por ligações tioamida (-CS-NH-). Em outra modalidade, as ligações de polipeptídeo são substituídas por ligações duplas olefínicas (-CH=CH-). Em outra modalidade, as ligações de polipeptídeo são substituídas por ligações amida retro (-NH-CO-). Em outra modalidade, as ligações de peptídeo são substituídas por derivados de polipeptídeo (-N(R)-CH2-CO-), em que R é a cadeia lateral "normal", naturalmente presente no átomo de carbono. Em outra modalidade, essas modificações ocorrem em qualquer uma das ligações ao longo da cadeia de polipeptídeo e em uma modalidade em várias (2-3 ligações) ao mesmo tempo.

[086]Em uma modalidade, aminoácidos aromáticos naturais do polipeptídeo como Trp, Tyr e Phe, são substituídos por aminoácidos não naturais sintéticos como Fenilglicina, TIC, naftilelanina (Nol), derivados metilados no anel de Phe, derivados halogenados de Phe ou o-metil-Tyr. Em outra modalidade, os polipeptídeos da presente invenção incluem um ou mais aminoácidos modificados ou um ou mais monômeros não aminoácidos (por exemplo, ácidos graxos, carboidratos complexos, etc).

[087]Em uma modalidade, "aminoácido" ou "sequência de aminoácidos" entende-se para incluir os 20 aminoácidos de ocorrência natural; esses aminoácidos frequentemente modificados de forma pós-traducional *in vivo*, incluindo, por exemplo, hidroxiprolina, fosfosserina e fosfotreonina; e outros aminoácido incomuns, incluindo, entre outros,

ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina e ornitina. Em uma modalidade, o "aminoácido" inclui D- e L-aminoácidos.

[088]Em outra modalidade, os polipeptídeos ou peptídeos projetados da presente invenção são bioquimicamente sintetizados como usando técnicas padrão de fase sólida. Em outra modalidade, estes métodos bioquímicos incluem síntese exclusiva de fase sólida, síntese parcial de fase sólida, condensação de fragmento, ou síntese de solução clássica.

[089]Em uma modalidade, técnicas de proteína recombinante são usadas para gerar os polipeptídeos projetados de interesse ou fragmentos dos mesmos da presente invenção. Em outra modalidade, técnicas recombinantes são descritas por Bitter et al., (1987) Methods in Enzymol. 153:516-544, Studier et al. (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89, Brisson et al. (1984) Nature 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) EMBO J. 6:307-311, Coruzzi et al. (1984) EMBO J. 3:1671-1680 e Brogli et al., (1984) Science 224:838-843, Gurley et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565 e Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463, que são aqui incorporados como referência em suas totalidades.

[090]Em outra modalidade, o polipeptídeo modificado com CTP de interesse ou fragmento do mesmo compreende um peptídeo que compreende menos de 50 aminoácidos e pelo menos um peptídeo carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica glicosilado e/ou não glicosilado, ligado a um N- ou um C-terminal do polipeptídeo. Em uma modalidade, o

polipeptídeo modificado com CTP de interesse ou fragmento do mesmo compreende um peptídeo que compreende menos de 40 aminoácidos e pelo menos um peptídeo carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica, ligado a um N- ou um C-terminal do polipeptídeo. Em outra modalidade, o polipeptídeo modificado com CTP de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido compreende um peptídeo que compreende menos de 30, 20 ou 10 aminoácidos. Em uma modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo compreendendo menos de 50 aminoácidos inclui peptídeos aqui fornecidos. Em outra modalidade, o peptídeo compreendendo menos de 50 aminoácidos é hGH, OXM, EPO, apolipoproteína A1(APO-A1), um interferon, uma citocina ou um fator de coagulação.

[091]Em uma modalidade o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é uma EPO. Em uma modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um APO. Em uma modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um FVIIa. Em uma modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um FIX. Em uma modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um interferon. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um hGH. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um OXM. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um GLP-1. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é uma insulina. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui

fornecido é uma encefalina. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um ACTH. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um glucagon. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um fator de crescimento tipo insulina. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um fator de crescimento epidérmico. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um fator de crescimento de fibroblasto ácido ou básico. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um fator de crescimento derivado de plaqueta. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um granulócito-CSF. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um macrófago-CSF. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um IL-2. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um IL-3. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um fator de necrose tumoral. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um LHRH. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um análogo de LHRH. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é uma somatostatina. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do

mesmo aqui fornecido é um fator de liberação de hormônio do crescimento. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é uma endorfina. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é uma proteína surfactante alveolar. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um fator natriurético. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é uma adesina. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é uma angiostatina. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é uma endostatina. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um peptídeo receptor. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um ligante de ligação de receptor. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um anticorpo. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um fragmento de anticorpo. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é um peptídeo ou uma proteína incluindo qualquer forma modificada.

[092]Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo compreende adicionalmente pelo menos um peptídeo de aminoácido do CTP ligado no N-terminal e/ou um peptídeo de aminoácido do CTP ligado no C-terminal. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo é selecionado na lista seguinte: insulina,

Albuteina/albumina Activase altiplase/tPA, adenosina deaminase, imunoglobulina, glucocerebrosidase, Leucina-sargramostim/GM-CSF, G-CSF, Venoglobulina-S/IgG, Proleucina aldesleucina, DNase, fator VIII, Helixate, L-asparaginase, WinRho SDF Rh I, Retavase retaplase/tPA, Fator IX, FSH, globulina, fibrina, interleucina-11, becaplermina/PDGF, lepirudina/herudina, TNF, Timoglobulina, fator VII, interferon alfa-2a, interferon alfa n-1, interferon alfa-N3, interferon beta-1b, interferon gama-1b, interleucina-2, HGH ou anticorpos monoclonais.

[093]Em uma modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido ainda compreende um peptídeo sinal. Em outra modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo é um hormônio do crescimento. Em outra modalidade, o hormônio do crescimento ainda mais compreende um peptídeo sinal. Em outra modalidade, após expressão e secreção, o peptídeo sinal é clivado dos peptídeos/polipeptídeos precursores projetados resultando nos peptídeos/polipeptídeos maduros projetados. Em outra modalidade, sequências sinal incluem, entre outras, as sequências de sinal endógeno.

[094]Em outra modalidade, os polipeptídeos e métodos da presente invenção fornecem um hormônio do crescimento tendo adicionalmente um peptídeo sinal compreendendo a seguinte sequência de aminoácidos: MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA (SEQ ID NO: 4).

[095] Em outra modalidade, hormônios de crescimento modificados com CTP ou conjugados desta invenção são usados da mesma maneira como hormônios de crescimento sem modificações.Em outra modalidade, hormônios do crescimento

conjugados desta invenção têm um tempo de meia-vida e tempo de residência no plasma aumentado, depuração diminuída, e atividade clínica aumentada *in vivo*. Em outra modalidade, devido às propriedades melhoradas dos hormônios do crescimento conjugados conforme descrito aqui, estes conjugados são administrados menos frequentemente do que hormônios do crescimento sem modificações. Em outra modalidade, hormônios do crescimento conjugados conforme descrito aqui são administrados uma vez por semana para uma vez a cada duas semanas. Em outra modalidade, hormônios do crescimento conjugados conforme descrito aqui são administrados uma vez a cada duas semanas para uma vez a cada três semanas. Em outra modalidade, hormônios do crescimento conjugados conforme descrito aqui são administrados uma vez por dia a três vezes por semana. Em outra modalidade, a diminuição da frequência de administração irá resultar em melhor adesão do paciente levando para os melhorados resultados do tratamento, bem como a qualidade de vida melhorada do paciente. Em outra modalidade, em comparação com os conjugado convencionais de hormônios do crescimento ligados a poli(etileno glicol), verificou-se que o hormônio do crescimento conjugados com CTP tendo o peso molecular e estrutura de ligante dos conjugados desta invenção têm uma potência melhorada, estabilidade melhorada, níveis de área sob a curva elevados (AUC) e meia-vida de circulação potencializada. Em outra modalidade, em comparação com os conjugado convencionais de hormônios do crescimento ligados a poli(etileno glicol), verificou-se que os hormônios do crescimento tendo o peso molecular e estrutura de ligante dos conjugados desta

invenção têm uma potência melhorada, estabilidade melhorada, níveis de AUC elevados e meia-vida de circulação potencializada. Em outra modalidade, em comparação com os conjugado convencionais de hormônios do crescimento ligados a poli(etileno glicol), verificou-se que os hormônios do crescimento tendo o volume hidrodinâmico ideal dos conjugados desta invenção têm uma potência melhorada, estabilidade melhorada, níveis de AUC elevados e meia-vida de circulação potencializada. Em outra modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz um conjugado de hormônio do crescimento é a quantidade de conjugado necessária para a atividade biológica esperada mensurável *in vivo*. Em outra modalidade, um hormônio do crescimento utilizado de acordo com os ensinamentos da presente invenção apresenta potência aumentada. Em outra modalidade, a ligação de sequências do CTP para N- e C-terminal de um hormônio do crescimento resulta em atividade prolongada *in vivo*.

[096]Em outra modalidade, o hormônio do crescimento é qualquer hormônio do crescimento conhecido por um especialista na técnica. Em outra modalidade, o hormônio do crescimento é um hormônio do crescimento humano. Em outra modalidade, a sequência de nucleotídeos e/ou a sequência de aminoácidos de um hormônio do crescimento está disponível em um banco de dados do banco de gene. Em outra modalidade, o hormônio do crescimento é um homólogo de um hormônio do crescimento fornecido aqui e/ou um hormônio do crescimento fornecido em um banco de dados do banco de gene. Em outra modalidade, um homólogo também se refere a uma variante de deleção, inserção ou substituição, incluindo uma substituição de aminoácido da mesma e fragmentos de

polipeptídeo biologicamente ativo das mesmas.

[097]Em outra modalidade, o hormônio do crescimento é a variante de 2, 3, 4 éxons faltantes de hGH ou qualquer combinação dos mesmos. Em outra modalidade, o hormônio do crescimento compreende um peptídeo sinal. Em outra modalidade, o hormônio do crescimento compreende um sítio de clivagem sinal. Em outra modalidade, polipeptídeos compreendendo GH modificados por CTPs da presente invenção compreendem GH recombinante.

[098]Em outra modalidade, um hormônio de crescimento conforme descrito aqui é um membro da superfamília de citocinas tipo hormônio do crescimento (GH). Em outra modalidade, um hormônio do crescimento conforme descrito aqui é hormônio do crescimento humano (hGH). Em outra modalidade, um hormônio do crescimento humano compreende a seguinte sequência de aminoácidos (Acessão Genbank No. P01241):

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEE AYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQF LRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSH NDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 5).

[099] Em outra modalidade, um hormônio do crescimento humano compreende a seguinte sequência de aminoácidos: MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESI PTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDL EEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETF LRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 6). Em outra modalidade, um hormônio do crescimento humano compreende a seguinte sequência de aminoácidos: MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLA (SEQ ID NO: 7). Em outra modalidade, um hGH compreende a seguinte

sequência de aminoácidos: MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEE AYIPKVQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQF LRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSH NDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 8). Na outra modalidade, um hGH é uma variante de substituição na qual glutamina na posição 65 do hGH é substituída por uma valina.

[0100] Em outra modalidade, um hormônio do crescimento da invenção compreende a sequência depositada de aminoácidos do banco do gene sob Adesão no. AAA72260. Em outra modalidade, um hormônio do crescimento da invenção compreende a sequência depositada de aminoácidos do banco do gene sob Adesão no. AAK69708. Em outra modalidade, um hormônio do crescimento da invenção compreende a sequência depositada de aminoácidos do banco do gene sob Adesão no. CAA01435. Em outra modalidade, um hormônio do crescimento da invenção compreende a sequência depositada de aminoácidos do banco do gene sob Adesão no. CAA01329. Em outra modalidade, um hormônio do crescimento da invenção compreende a sequência depositada de aminoácidos do banco do gene sob Adesão no. CAA00380. Em outra modalidade, um hormônio do crescimento da invenção compreende a sequência depositada de aminoácidos do banco do gene sob Adesão no. AAA72555. Em outra modalidade, um hormônio do crescimento da invenção compreende a sequência depositada de aminoácidos do banco do gene sob adesão no. NP_000506.2. Em outra modalidade, um hormônio do crescimento da invenção compreende a sequência depositada de aminoácidos do banco do gene sob adesão no. NP_072053.1. Em outra modalidade, um

hormônio do crescimento da invenção compreende a sequência depositada de aminoácidos do banco do gene sob adesão no. NP_072054.1. Em outra modalidade, um hormônio do crescimento da invenção compreende a sequência depositada de aminoácidos do banco do gene sob adesão no. NP_072055.1. Em outra modalidade, um hormônio do crescimento da invenção compreende a sequência depositada de aminoácidos do banco do gene sob adesão no. NP_072056.1.

[0101] Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico que codifica um hormônio do crescimento conforme descrito aqui codifica qualquer sequência de aminoácidos de um hormônio do crescimento conhecido por um especialista na técnica. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico que codifica um hormônio do crescimento conforme descrito aqui codifica um hGH. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico que codifica um hormônio do crescimento compreende a sequência depositada de ácido nucleico no banco de gene sob adesão no. NM_000515.3. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico que codifica um hormônio do crescimento compreende a sequência depositada de ácido nucleico no banco de gene sob adesão no. NM_022559.2. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico que codifica um hormônio do crescimento compreende a sequência depositada de ácido nucleico no banco de gene sob adesão no. NM_022560.2. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico que codifica um hormônio do crescimento compreende a sequência depositada de ácido nucleico no banco de gene sob adesão no. NM_022561.2. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico que codifica um hormônio do crescimento compreende a sequência depositada

de ácido nucleico no banco de gene sob adesão no. NM_022562.2.

[0102] Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo um hormônio do crescimento da invenção compreende um CTP ligado a um C-terminal de um hormônio do crescimento (hGH-CTP) e tendo a seguinte sequência de aminoácidos:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEE AYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQF LRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSH NDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPSPSRLPG PSDTPILPQ (SEQ ID NO: 9).

[0103] Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo um hormônio do crescimento da invenção compreende dois CTPs ligados em tandem a um C-terminal de um hormônio do crescimento (hGH-CTP-CTP) e tendo a seguinte sequência de aminoácidos:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEE AYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQF LRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSH NDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPSPSRLPG PSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 10).

[0104] Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo um hormônio do crescimento da invenção compreende dois CTPs ligados em tandem a um C-terminal de um hormônio do crescimento e um CTP ligado a um N-terminal de um hormônio do crescimento (CTP-hGH-CTP-CTP) e tendo a seguinte sequência de aminoácidos:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIP LSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNR

EETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQT LMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQC RSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSD TPILPQ (SEQ ID NO: 11).

[0105] Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo um hormônio do crescimento da invenção compreende dois CTPs ligados em tandem a um C-terminal de um hormônio do crescimento, em que um CTP dos dois CTPs é truncado, e um CTP adicional ligado a um N-terminal de um hormônio do crescimento (tCTP-hGH-CTP-CTP) e tendo a seguinte sequência de aminoácidos: MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLH QLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISL LLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIF KQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAP PPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 12).

[0106] Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo um hormônio do crescimento da invenção compreende um CTPs ligado a um C-terminal de um hormônio do crescimento e um CTP ligado a um N-terminal de um hormônio do crescimento (CTP-hGH-CTP) e tendo a seguinte sequência de aminoácidos:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIP LSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNR EETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQT LMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQC RSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 13).

[0107] Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo um hormônio do crescimento e um CTP

compreende a seguinte sequência de aminoácidos: MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIP LSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNR EETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQT LMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQC RSVEGSCGF (SEQ ID NO: 14).

[0108] Em outra modalidade, uma molécula de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo CTP-hGH-CTP compreende a seguinte sequência de ácidos nucleicos:

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcct gctgtgcctgccatggctgcaggagggcagcgccagctcttcttctaaggctccacccc catctctgcccagccccagcagactgccgggccccagcgacacacccattctgccccag ttccccaccatccccctgagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggctcacaggct gcaccagctggcctttgacacctaccaggagttcgaggaagcctacatccccaaggagc agaagtacagcttcctgcagaacccccagacctccctgtgcttcagcgagagcatcccc acccccagcaacagagaggagacccagcagaagagcaacctggagctgctgaggatctc cctgctgctgatccagagctggctggagcccgtgcagttcctgagaagcgtgttcgcca acagcctggtgtacggcgccagcgacagcaacgtgtacgacctgctgaaggacctggag gagggcatccagaccctgatgggccggctggaggacggcagccccaggaccggccagat cttcaagcagacctacagcaagttcgacaccaacagccacaacgacgacgccctgctga agaactacgggctgctgtactgcttcagaaaggacatggacaaggtggagaccttcctg aggatcgtgcagtgcagaagcgtggagggcagctgcggcttcagctccagcagcaaggc ccctcccccgagcctgccctccccaagcaggctgcctgggccctccgacacaccaatcc tgcctcagtgatgaaggtctggatgcggccgc (SEQ ID NO: 15).

[0109] Em outra modalidade, uma molécula de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo CTP-hGH-CTP-CTP compreende a seguinte sequência de ácidos nucleicos:

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgt gcctgccatggctgcaggagggcagcgccagctcttcttctaaggctccacccccatct

ctgcccagccccagcagactgccgggccccagcgacacacccattctgccccagttccc
caccatccccctgagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggctcacaggctgcacc
agctggcctttgacacctaccaggagttcgaggaagcctacatccccaaggagcagaag
tacagcttcctgcagaaccccccagacctccctgtgcttcagcgagagcatccccacccc
cagcaacagagaggagacccagcagaagagcaacctggagctgctgaggatctccctgc
tgctgatccagagctggctggagcccgtgcagttcctgagaagcgtgttcgccaacagc
ctggtgtacggcgccagcgacagcaacgtgtacgacctgctgaaggacctggaggaggg
catccagaccctgatgggccggctggaggacggcagccccaggaccggccagatcttca
agcagacctacagcaagttcgacaccaacagccacaacgacgacgccctgctgaagaac
tacgggctgctgtactgcttcagaaaggacatggacaaggtggagaccttcctgaggat
cgtgcagtgcagaagcgtggagggcagctgcggcttcagctccagcagcaaggcccctc
ccccgagcctgccctccccaagcaggctgcctgggccctccgacacaccaatcctgcca
cagagcagctcctctaaggcccctcctccatccctgccatccccctcccggctgcctgg
cccctctgacacccctatcctgcctcagtgatgaaggtctggatgcggccgc (SEQ
ID NO: 16).

[0110] Em outra modalidade, uma molécula de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo CTP-hGH-CTP-CTP compreende a seguinte sequência de ácidos nucleicos:

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgt
gcctgccatggctgcaggagggcagcgccagctcttcttctaaggctccacccccgagc
ctgcccttccccaccatccccctgagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggctca
caggctgcaccagctggcctttgacacctaccaggagttcgaggaagcctacatcccca
aggagcagaagtacagcttcctgcagaaccccccagacctccctgtgcttcagcgagagc
atccccacccccagcaacagagaggagacccagcagaagagcaacctggagctgctgag
gatctccctgctgctgatccagagctggctggagcccgtgcagttcctgagaagcgtgt
tcgccaacagcctggtgtacggcgccagcgacagcaacgtgtacgacctgctgaaggac
ctggaggagggcatccagaccctgatgggccggctggaggacggcagccccaggaccgg
ccagatcttcaagcagacctacagcaagttcgacaccaacagccacaacgacgacgccc
tgctgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaaggacatggacaaggtggagacc

ttcctgaggatcgtgcagtgcagaagcgtggagggcagctgcggcttcagctccagcag caaggccccctcccccgagcctgccctccccaagcaggctgcctgggccctccgacacac caatcctgccacagagcagctcctctaaggcccctcctccatccctgccatccccctcc cggctgcctggcccctctgacacccctatcctgcctcagtgatgaaggtctggatgcgg ccgc (SEQ ID NO: 17).

[0111] Em outra modalidade, um hormônio do crescimento da invenção é homólogo para uma sequência conhecida de um hormônio do crescimento. Em outra modalidade, um hormônio do crescimento da invenção é homólogo para uma sequência do hormônio do crescimento como divulgada aqui. Em outra modalidade, homologia de acordo com a presente invenção também inclui variantes de deleções, inserções ou substituição, incluindo uma substituição de aminoácido, do mesmo e fragmentos de polipeptídeo biologicamente ativos do mesmo. Em uma modalidade, a variante de substituição é uma, em que a glutamina na posição 65 do hGH é substituída por uma valina [Gellerfors et al., J Pharm Biomed Anal 1989, 7:173-83].

[0112] Em uma modalidade, a frase "hormônio do crescimento humano" (hGH) refere-se a um polipeptídeo, como estabelecido no Acessão Genbank No. P01241 apresentando atividade de hGH (ou seja, estimulação do crescimento).

[0113] Em uma modalidade, "hormônio do crescimento humano" (hGH) refere-se a um polipeptídeo, como estabelecido no Acessão Genbank No. P01241, apresentando atividade de hGH (ou seja, estimulação do crescimento). Em uma modalidade, hGH da presente invenção também se refere aos homólogos. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos do hGH da presente invenção é pelo menos 50% homóloga a uma sequência do hGH estabelecida em Acessão

Genbank No. P01241 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão). Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos do hGH da presente invenção é pelo menos 60% homóloga a uma sequência do hGH estabelecida em Acessão Genbank No. P01241 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão). Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos do hGH da presente invenção é pelo menos 70% homóloga a uma sequência do hGH estabelecida em Acessão Genbank No. P01241 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão). Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos do hGH da presente invenção é pelo menos 80% homóloga a uma sequência do hGH estabelecida em Acessão Genbank No. P01241 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão). Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos do hGH da presente invenção é pelo menos 90% homóloga a uma sequência do hGH estabelecida em Acessão Genbank No. P01241 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão). Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos do hGH da presente invenção é pelo menos 95% homóloga a uma sequência do hGH estabelecida em Acessão Genbank No. P01241 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão).

[0114] Em uma modalidade, o peptídeo de interesse aqui fornecido é oxintomodulina. Em outra modalidade, oxintomodulina (OXM) compreende a seguinte sequência de aminoácidos (AA): HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA (SEQ ID NO: 18). Em outra modalidade, OXM consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 18. Em outra modalidade, OXM compreende ou consiste na sequência de aminoácidos mostrada em CAS No. 62340-29-8.

[0115] Em uma modalidade, o termo oxintomodulina ainda inclui um homólogo de uma oxintomodulina conhecida. Em uma modalidade, o homólogo é um homólogo funcional. Em outra modalidade, o termo "funcional" refere-se à capacidade um homólogo, polipeptídeo ou fragmentos do mesmo aqui fornecido tem de suprimir o apetite. O termo também se refere à capacidade de um homólogo, polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui de estender a meia-vida biológica de outra proteína ou peptídeo. Em outra modalidade, a meia-vida ($T_{½}$) biológica de uma proteína, peptídeo ou homólogo fornecida aqui se refere ao tempo que leva para que metade da quantidade da proteína, peptídeo ou homólogo para seja degradada ou não esteja presente em um meio biológico em um sujeito. Em outra modalidade, o meio biológico é soro, líquido cerebospinal, tecido, mucosa e afins.

[0116] Em outra modalidade, OXM é OXM humana ou OXM de qualquer mamífero. Em outra modalidade, OXM é também referida como glucagon-37 ou enteroglucagon bioativo. Em outra modalidade, OXM é um polipeptídeo duplo ou fragmentos do mesmo. Em outra modalidade, OXM é um fragmento biologicamente ativo da OXM. Em outra modalidade, OXM

biologicamente ativa se estende do aminoácido 30 ao aminoácido 37 de SEQ ID NO: 18. Em outra modalidade, OXM biologicamente ativa se estende do aminoácido 19 ao aminoácido 37 de SEQ ID NO: 18. Em outra modalidade, OXM da invenção corresponde a um octapeptídeo do qual os dois aminoácidos C-terminais são deletados. Em outra modalidade, OXM da invenção corresponde a qualquer fragmento de SEQ ID NO: 18 que mantém a atividade OXM conforme descrita aqui. Em outra modalidade, a invenção também inclui homólogos, por exemplo, polipeptídeos que são pelo menos 50%, pelo menos, 55%, pelo menos 60%, pelo menos, 65%, pelo menos 70%, pelo menos, 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 87%, pelo menos 89%, pelo menos de 91%, pelo menos 93%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% homólogos para uma oxintomodulina como determinado usando o software de BlastP de National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão.

[0117] Em outras modalidades, o termo oxintomodulina projetada se refere à sequência de aminoácidos de uma oxintomodulina madura. Em outras modalidades, o termo oxintomodulina projetada se refere à sequência de aminoácidos da oxintomodulina incluindo sua sequência sinal ou peptídeo sinal.

[0118] Em outra modalidade, os polipeptídeos ou fragmentos da mesma aqui fornecidos compreendem um peptídeo sinal ou sequência sinal.

[0119] Em outra modalidade, “sequência sinal” e “peptídeo sinal” são usados de modo intercambiável aqui. Em outra modalidade, “sequência” quando em referência a uma

molécula de polinucleotídeo pode se referir a uma parte codificadora. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0120] Em uma modalidade, o polipeptídeo ou peptídeo de interesse fornecido aqui é eritropoietina (EPO). Em outra modalidade, o termo "eritropoietina" refere-se à eritropoetina de mamífero. Em uma modalidade, "eritropoietina" refere-se à eritropoetina humana, como estabelecido em Acessão Genbank No. AAA52400.

[0121] Em uma modalidade, uma sequência de eritropoietina ou EPO da presente invenção também se refere aos homólogos. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos da eritropoietina da presente invenção é pelo menos 50% homóloga a uma sequência da eritropoietina estabelecida em Acessão Genbank No. AAA52400 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos da eritropoietina da presente invenção é pelo menos 60% homóloga a uma sequência da eritropoietina estabelecida em Acessão Genbank No. AAA52400 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos da eritropoietina da presente invenção é pelo menos 70% homóloga a uma sequência da eritropoietina estabelecida em Acessão Genbank No. AAA52400 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos da

eritropoietina da presente invenção é pelo menos 80% homóloga a uma sequência da eritropoietina estabelecida em Acessão Genbank No. AAA52400 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos da eritropoietina da presente invenção é pelo menos 90% homóloga a uma sequência da eritropoietina estabelecida em Acessão Genbank No. AAA52400 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos da eritropoietina da presente invenção é pelo menos 95% homóloga a uma sequência da eritropoietina estabelecida em Acessão Genbank No. AAA52400 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão.

[0122] Em outra modalidade, os métodos da presente invenção fornecem um peptídeo EPO estabelecido em SEQ ID NO: 19 tendo adicionalmente pelo menos um peptídeo de aminoácidos do CTP no N-terminal e pelo menos mais um peptídeo de aminoácidos do CTP no C-terminal. Em outra modalidade, os métodos da presente invenção fornecem um peptídeo EPO estabelecido em SEQ ID NO: 19: MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEH CSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPL QLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLR GKLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 19).

[0123] Em outra modalidade, o peptídeo EPO

adicionalmente tem pelo menos um peptídeo de aminoácidos do CTP no N-terminal e pelo menos um peptídeo de aminoácidos do CTP adicional no C-terminal para o tratamento da anemia. Em outra modalidade, os métodos da presente invenção fornecem um peptídeo EPO estabelecido em SEQ ID NO: 20 tendo adicionalmente pelo menos um peptídeo de aminoácidos do CTP no N-terminal e pelo menos mais um peptídeo de aminoácidos do CTP no C-terminal:
MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEH
CSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPL
QLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLR
GKLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPS
RLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 20).

[0124] Em outra modalidade, os métodos da presente invenção fornecem um peptídeo EPO estabelecido em SEQ ID NO: 21 tendo adicionalmente pelo menos um peptídeo de aminoácidos do CTP no N-terminal e pelo menos mais um peptídeo de aminoácidos do CTP no C-terminal:
MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQAPPR
LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEV
WQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPP
DAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLPSPS
RLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 21).

[0125] Em outra modalidade, os métodos da presente invenção fornecem um peptídeo EPO estabelecido em SEQ ID NO: 22 tendo adicionalmente pelo menos um peptídeo de aminoácidos do CTP no N-terminal e pelo menos mais um peptídeo de aminoácidos do CTP no C-terminal:
MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEH
CSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPL

QLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLR GKLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQAPPRLICDSRVLERY LLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAV LRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTI TADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO: 22).

[0126] Em outra modalidade, os métodos da presente invenção fornecem um peptídeo EPO estabelecido em SEQ ID NO: 23 tendo adicionalmente pelo menos um peptídeo de aminoácidos do CTP no N-terminal e pelo menos mais um peptídeo de aminoácidos do CTP no C-terminal: MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQAPPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEV WQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPP DAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO: 23).

[0127] Em outra modalidade, os métodos da presente invenção fornecem um peptídeo EPO estabelecido em SEQ ID NO: 24 tendo adicionalmente pelo menos um peptídeo de aminoácidos do CTP no N-terminal e pelo menos mais um peptídeo de aminoácidos do CTP no C-terminal: MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQAPPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEV WQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPP DAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLPSPS RLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 24).

[0128] Em outra modalidade, os métodos da presente invenção fornecem um peptídeo EPO estabelecido em SEQ ID NO: 25 tendo adicionalmente pelo menos um peptídeo de aminoácidos do CTP no N-terminal e pelo menos mais um peptídeo de aminoácidos do CTP no C-terminal:

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEH CSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPL QLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLR GKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO: 25).

[0129] Em outra modalidade, os métodos do presente invenção fornecem um ácido nucleico estabelecido em SEQ ID NO: 26 que codifica um peptídeo EPO e um peptídeo de aminoácidos do CTP no N-terminal e dois peptídeos de aminoácidos do CTP no C-terminal: tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tcctgcctgg ctgtggcttc tcctgtcccttc tgtcgctc cctctgggcc tcccagtcct gggctcctct tcctcaaagg ccccctcccc gagccttcca agtccatccc gactcccggg gccctcggac accccaatat taccacaagc cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga acactgcagc ttgaatgaga atatcactgt cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt agaagtctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt ggtcaactct tcccagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg ccttcgcagc ctcaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg caggacaggg gacagatcct cttcctcaaa ggcccctccc ccgagccttc caagtccatc ccgactcccg gggccctccg acacaccaat cctgccacag agcagctcct ctaaggcccctcctccatcc ctgccatccc cctcccggct gcctggcccc tctgacaccc ctatcctgcc tcagtgatga aggtcttctg gatccgcggc cgc (SEQ ID NO: 26). Em outra modalidade, os métodos da presente invenção fornecem uma sequência de aminoácidos compreendendo um peptídeo EPO estabelecido em SEQ ID NO: 66 tendo dois peptídeos de aminoácidos do CTP no N-terminal:

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSS
KAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSL
NENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLH
VDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKL
KLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO: 66).

[0130] Em outra modalidade, os métodos do presente invenção fornecem uma sequência de ácido nucleico estabelecida em SEQ ID NO: 67 que codifica um peptídeo EPO e dois peptídeos de aminoácidos do CTP no N-terminal:
ATGGGCGTGCACGAGTGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGAGCCTGCTGTCCCTGCC
TCTGGGCCTGCCTGTGCTGGGCAGCAGCAGCTCTAAGGCCCCTCCACCCAGCCTGCCCA
GCCCTTCTAGACTGCCTGGCCCCAGCGACACCCCCATCCTGCCTCAGAGCAGCAGCAGC
AAGGCCCCACCACCATCCCTGCCTAGCCCCAGCAGACTGCCAGGCCCTTCCGATACCCC
AATCCTGCCCCAGGCCCCTCCCAGACTGATCTGCGACAGCCGGGTGCTGGAAAGATACC
TGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGAGCACTGCAGCCTG
AACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAACTTCTACGCCTGGAAGCGGATGGA
AGTGGGCCAGCAGGCCGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCCCTGCTGAGCGAGGCCGTGC
TGAGAGGACAGGCCCTGCTGGTGAACAGCAGCCAGCCCTGGGAGCCCCTGCAGCTGCAT
GTGGATAAGGCCGTGTCCGGCCTGCGGAGCCTGACCACACTGCTGAGAGCCCTGGGCGC
TCAGAAAGAGGCCATCTCTCCCCCTGATGCCGCCTCTGCCGCCCCTCTGAGAACCATCA
CCGCCGACACCTTCCGGAAGCTGTTCCGGGTGTACAGCAACTTCCTGCGGGGCAAGCTG
AAGCTGTACACCGGCGAGGCCTGCCGGACCGGCGATAGATAAGCTTGGCGCGCC (SEQ
ID NO: 67).

[0131] Em outra modalidade, os métodos da presente invenção fornecem um peptídeo EPO estabelecido em SEQ ID NO: 68 tendo dois peptídeos de aminoácidos do CTP no N-terminal e dois peptídeos de aminoácidos do CTP no C-terminal:
MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSS
KAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSL

NENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLH VDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKL KLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLP GPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 68).

[0132] Em outra modalidade, os métodos do presente invenção fornecem uma sequência de ácido nucleico estabelecida em SEQ ID NO: 69 que codifica um peptídeo EPO e dois peptídeos de aminoácidos do CTP no N-terminal e dois peptídeos de aminoácidos do CTP no C-terminal: ATGGGCGTGCACGAGTGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGAGCCTGCTGTCCCTGCC TCTGGGCCTGCCTGTGCTGGGCAGCAGCAGCTCTAAGGCCCCTCCACCCAGCCTGCCCA GCCCTTCTAGACTGCCTGGCCCCAGCGACACCCCCATCCTGCCTCAGAGCAGCAGCAGC AAGGCCCCACCACCATCCCTGCCTAGCCCCAGCAGACTGCCAGGCCCTTCCGATACCCC AATCCTGCCCCAGGCCCCTCCCAGACTGATCTGCGACAGCCGGGTGCTGGAAAGATACC TGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGAGCACTGCAGCCTG AACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAACTTCTACGCCTGGAAGCGGATGGA AGTGGGCCAGCAGGCCGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCCCTGCTGAGCGAGGCCGTGC TGAGAGGACAGGCCCTGCTGGTGAACAGCAGCCAGCCCTGGGAGCCCCTGCAGCTGCAT GTGGATAAGGCCGTGTCCGGCCTGCGGAGCCTGACCACACTGCTGAGAGCCCTGGGCGC TCAGAAAGAGGCCATCTCTCCCCCTGATGCCGCCTCTGCCGCCCCTCTGAGAACCATCA CCGCCGACACCTTCCGGAAGCTGTTCCGGGTGTACAGCAACTTCCTGCGGGGCAAGCTG AAGCTGTACACCGGCGAGGCCTGCCGGACCGGCGATAGAAGCAGCTCCAGCAAGGCTCC ACCCCCCAGCCTGCCATCCCCAAGTAGACTGCCCGGGCCCTCTGACACACCTATCCTGC CACAGTCCAGCAGCTCCAAAGCTCCCCCACCATCCCTCCCATCCCCATCCAGACTGCCT GGACCATCCGACACTCCAATTCTGCCTCAGTAAGCTTGGCGCGCC (SEQ ID NO: 69).

[0133] Em uma modalidade, “interferon” refere-se ao polipeptídeo de interferon mamífero Tipo I. Em uma modalidade, “interferon” refere-se ao polipeptídeo de interferon mamífero Tipo II. Em algumas modalidades,

polipeptídeos de interferon apropriados adicionais como conhecidos pelos especialistas na técnica são utilizados. Em algumas modalidades, o interferon é alfa-interferon. Em algumas modalidades, o interferon é beta-interferon. Em algumas modalidades, o interferon é o gama-interferon. Em algumas modalidades, o interferon é omega-interferon. Em algumas modalidades, o interferon é um interferon de subespécies. Em uma modalidade, o interferon de subespécies (IFN) é IFN-α2a. Em uma modalidade, o interferon de subespécies (IFN) é IFN-α2a. Em uma modalidade, o interferon de subespécies (IFN) é IFN-β1a. Em uma modalidade, o interferon subespécies (IFN) é IFN-β1b.

[0134] Em uma modalidade, o interferon da presente invenção apresenta atividade de interferon, como atividade antiviral ou antiproliferativa. Em algumas modalidades, Acessão Genbank nos. de exemplos não limitantes de interferons estão listados na Tabela 1 abaixo.

[0135] Em uma modalidade, um interferon da presente invenção também se refere aos homólogos. Em uma modalidade, uma sequência de aminoácidos do interferon da presente invenção é pelo menos 50% homóloga a uma sequência do interferon listada na Tabela 1 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, uma sequência de aminoácidos do interferon da presente invenção é pelo menos 60% homóloga a uma sequência do interferon listada na Tabela 1 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, uma sequência de aminoácidos do

interferon da presente invenção é pelo menos 70% homóloga a uma sequência do interferon listada na Tabela 1 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, uma sequência de aminoácidos do interferon da presente invenção é pelo menos 80% homóloga a uma sequência do interferon listada na Tabela 1 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, uma sequência de aminoácidos do interferon da presente invenção é pelo menos 90% homóloga a uma sequência do interferon listada na Tabela 1 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, uma sequência de aminoácidos do interferon da presente invenção é pelo menos 95% homóloga a uma sequência do interferon listada na Tabela 1 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em algumas modalidades, homologia de acordo com a presente invenção também inclui variantes de deleções, inserções ou substituição, incluindo uma substituição de aminoácido, do mesmo e fragmentos de polipeptídeo biologicamente ativos do mesmo. Em uma modalidade, a cisteína na posição 17 do interferon β é substituída por uma Serina.

[0136] A tabela 1 a seguir lista exemplos de interferons com seus respectivos números de sequência NCBI

Tabela 1

Nome do Interferon	***Sequência de número NCBI***

interferon, α1	NP 076918.1
interferon, α 10	NP 002162.1
interferon, α 13	NP 008831.2
interferon, α 14	NP 002163.1
interferon, α 16	NP 002164.1
interferon, α 17	NP 067091.1
interferon, α 2	NP 000596.2
interferon, α 21	NP 002166.1
interferon, α 4	NP 066546.1
interferon, α 5	NP 002160.1
interferon, α 6	NP 066282.1
interferon, α 7	NP 066401.2
interferon, α 8	NP 002161.2
interferon, beta precursor	NP 002167.1
interferon, ε1	NP 795372.1
interferon, γ	NP 000610.2
interferon, ε	NP 064509.1
interferon, Ω1	NP 002168.1

[0137] Em outra modalidade, o interferon (IFN) fornecido aqui como o peptídeo ou como um polipeptídeo é um interferon tipo I. Em outra modalidade, o interferon (IFN) é IFN-α. Em outra modalidade, o interferon (IFN) é IFN-β. Em outra modalidade, o interferon (IFN) é IFN-γ. Em outra modalidade, um peptídeo de interferon (IFN) conforme descrito aqui compreende uma sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 27. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 28 compreende a seguinte sequência de aminoácidos (AA): MTNKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNF DIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINH LKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYF INRLTGYLRN (SEQ ID NO: 27, Interferon-β1a Humano). Em outra

modalidade, um peptídeo de interferon (IFN) conforme descrito aqui compreende uma sequência de aminoácidos de interferon β1a (hIFN β1a) humano. Em outra modalidade, um peptídeo de interferon (IFN) conforme descrito aqui compreende uma sequência de aminoácidos estabelecida em Acessão Genbank No. NP_002167.1.

[0138] Em outra modalidade, um peptídeo de interferon (IFN) conforme descrito aqui compreende é codificado por uma sequência de nucleotídeos estabelecida em SEQ ID NO: 28. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 28 compreende a seguinte sequência de nucleotídeos (AA): tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagca ccaccgccctgagcatgagctacaacctgctgggcttcctgcagaggtccagcaacttc cagtgccagaagctgctgtggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggacag gatgaacttcgacatcccagaggaaatcaagcagctgcagcagttccagaaggaggacg ccgccctgaccatctacgagatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggcaggacagc agcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccacca gatcaaccacctgaaaaccgtgctggaagagaagctggaaaaggaggacttcaccaggg gcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggtactacggcagaatcctgcactacctg aaggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggtggagatcctgaggaa cttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaactgatgagtccgcggccgc (SEQ ID NO: 28, Interferon-β1a Humano). Em outra modalidade, um peptídeo de interferon (IFN) conforme descrito aqui compreende é codificado por uma molécula de ácido nucleico (NA) de interferon β1a (hIFN β1a) humano. Em outra modalidade, um peptídeo de interferon (IFN) conforme descrito aqui é codificado por uma molécula de ácido nucleico (NA) compreendendo uma sequência de ácido nucleico estabelecida em Acessão Genbank No. NM_002176.

[0139] Em outra modalidade, um peptídeo de

interferon (IFN) conforme descrito aqui compreende uma sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 29. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 29 compreende a seguinte sequência de aminoácidos (AA): TF*LQPFEAFALAQQVVGDTVRVVNMTNKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSS NFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQ DSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILH YLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRN (SEQ ID NO: 29).

[0140] Em outra modalidade, um peptídeo de interferon (IFN) conforme descrito aqui compreende é codificado por uma sequência de nucleotídeos estabelecida em SEQ ID NO: 30. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 30 compreende a seguinte sequência de nucleotídeos (AA): acattctaactgcaacctttcgaagcctttgctctggcacaacaggtagtaggcgacac tgttcgtgttgtcaacatgaccaacaagtgtctcctccaaattgctctcctgttgtgct tctccactacagctctttccatgagctacaacttgcttggattcctacaaagaagcagc aattttcagtgtcagaagctcctgtggcaattgaatgggaggcttgaatactgcctcaa ggacaggatgaactttgacatccctgaggagattaagcagctgcagcagttccagaagg aggacgccgcattgaccatctatgagatgctccagaacatctttgctattttcagacaa gattcatctagcactggctggaatgagactattgttgagaacctcctggctaatgtcta tcatcagataaaccatctgaagacagtcctggaagaaaaactggagaaagaagatttca ccaggggaaaactcatgagcagtctgcacctgaaaagatattatgggaggattctgcat tacctgaaggccaaggagtacagtcactgtgcctggaccatagtcagagtggaaatcct aaggaacttttacttcattaacagacttacaggttacctccgaaactga (SEQ ID NO: 30).

[0141] Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN) e uma unidade CTP. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN) e uma unidade CTP ligada ao C-terminal. Em outra

modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN) e pelo menos uma unidade CTP ligada ao C-terminal. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN) e uma unidade CTP ligada ao N-terminal. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN) e pelo menos uma unidade CTP ligada ao N-terminal. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN), e pelo menos uma unidade CTP ligada ao N-terminal e/ou pelo menos uma unidade CTP ligada ao C-terminal. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN), e pelo menos uma unidade CTP ligada ao N-terminal, e duas unidades CTP em tandem ligadas ao C-terminal. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN), e pelo menos uma unidade CTP ligada ao N-terminal, e duas unidades CTP ligadas ao C-terminal. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN), uma unidade CTP ligada ao N-terminal, e pelo menos duas unidades CTP ligadas ao C-terminal. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN), uma unidade CTP ligada ao N-terminal, e pelo menos duas unidades CTP em tandem ligadas ao C-terminal.

[0142] Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN) e pelo menos três unidades CTP. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo

de interferon (IFN) e três unidades CTP. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN)- polipeptídeo CTP codificado por uma sequência de aminoácidos compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 31. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 31 compreende a seguinte sequência de aminoácidos (AA):
MTNKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNF
DIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINH
LKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYF
INRLTGYLRNSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 31).

[0143] Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreendendo um peptídeo de interferon (IFN) - e CTP é codificado por uma molécula de ácido nucleico estabelecida em SEQ ID NO: 32. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 32 compreende a seguinte sequência de nucleotídeos (AA):
tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagca
ccaccgccctgagcatgagctacaacctgctgggcttcctgcagaggtccagcaacttc
cagtgccagaagctgctgtggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggacag
gatgaacttcgacatcccagaggaaatcaagcagctgcagcagttccagaaggaggacg
ccgccctgaccatctacgagatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggcaggacagc
agcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccacca
gatcaaccacctgaaaaccgtgctggaagagaagctggaaaaggaggacttcaccaggg
gcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggtactacggcagaatcctgcactacctg
aaggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggtggagatcctgaggaa
cttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggccc
ctccaccttccctgcccagtccaagccgactccctgggccctccgatacaccaattctg
ccacagtgatga (SEQ ID NO: 32).

[0144] Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme

descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN) e duas unidades CTP ligadas no carbóxi terminal. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN)-CTP (x2) codificado por uma sequência de aminoácidos compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 33. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 33 compreende a seguinte sequência de aminoácidos (AA): MTNKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNF DIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINH LKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYF INRLTGYLRNSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPS DTPILPQ (SEQ ID NO: 33).

[0145] Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreendendo um peptídeo de interferon (IFN) - e duas unidades de CTP ligado ao seu carbóxi terminal é codificado por uma molécula de ácido nucleico estabelecida em SEQ ID NO: 34. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 34 compreende a seguinte sequência de nucleotídeos (AA):
tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagca ccaccgccctgagcatgagctacaacctgctgggcttcctgcagaggtccagcaacttc cagtgccagaagctgctgtggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggacag gatgaacttcgacatcccagaggaaatcaagcagctgcagcagttccagaaggaggacg ccgccctgaccatctacgagatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggcaggacagc agcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccacca gatcaaccacctgaaaaccgtgctggaagagaagctggaaaaggaggacttcaccaggg gcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggtactacggcagaatcctgcactacctg aaggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggtggagatcctgaggaa cttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggccc ctccaccttccctgcccagtccaagccgactccctgggccctccgacacaccaatcctg

ccacagagcagctcctctaaggcccctcctccatccctgccatccccctcccggctgcc tggcccctctgacacccctatcctgcctcagtgatgaaggtctggatccgcggccgc (SEQ ID NO: 34).

[0146] Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN), uma única unidade CTP ligada ao amino terminal do INF, e duas unidades CTP ligadas ao carbóxi terminal do INF. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN), uma única unidade CTP ligada ao amino terminal do INF, e duas unidades CTP ligadas em tandem ao carbóxi terminal do INF. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende (de amino para carbóxi terminal): Peptídeo de interferon (IFN) CTP (x1) - CTP (x2) compreendendo uma sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 365. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 35 compreende a seguinte sequência de aminoácidos (AA):

MTNKCLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQMSYNLLGFLQ RSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAI FRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGR ILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRNSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPS DTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 35).

[0147] Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN), uma única unidade CTP ligada ao amino terminal do INF, e duas unidades CTP ligadas ao carbóxi terminal do INF é codificado por uma molécula de ácido nucleico estabelecida em SEQ ID NO: 36. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 36 compreende a seguinte sequência de nucleotídeos (AA):

tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagca

ccaccgccctgagcagcagcagctccaaggccccacccccagcctgcccagccccagc
agactgccaggccccagcgacacccccatcctgccccagatgagctacaacctgctggg
cttcctgcagaggtccagcaacttccagtgccagaagctgctgtggcagctgaacggca
ggctggaatactgcctgaaggacaggatgaacttcgacatcccagaggaaatcaagcag
ctgcagcagttccagaaggaggacgccgccctgaccatctacgagatgctgcagaacat
cttcgccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggaga
acctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccacctgaaaaccgtgctggaagagaag
ctggaaaaggaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggta
ctacggcagaatcctgcactacctgaaggccaaggagtacagccactgcgcctggacca
tcgtgagggtggagatcctgaggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctg
aggaacagctccagcagcaaggcccctccaccttccctgcccagtccaagccgactccc
tgggccctccgacacaccaatcctgccacagagcagctcctctaaggcccctcctccat
ccctgccatccccctcccggctgcctggcccctctgacacccctatcctgcctcagtga
tgaaggtctggatccgcggccgc (SEQ ID NO: 36).

[0148] Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN), uma única unidade CTP ligada ao amino terminal do INF, uma única unidade CTP localizada dentro da sequência codificadora do INF. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende (de amino para carbóxi terminal): Peptídeo de interferon (IFN) CTP (1x) (fragmento 1) – peptídeo de interferon (INF) CTP (fragmento 2) compreendendo uma sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 37 Em outra modalidade, SEQ ID NO: 37 compreende a seguinte sequência de aminoácidos (AA):

MTNKCLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQMSYNLLGFLQ
RSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAI
FRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGR
ILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRNSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPS
DTPILPQMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQK

EDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDF
TRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRN
(SEQ ID NO: 37).

[0149] Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN), uma única unidade CTP ligada ao amino terminal do INF, e uma única unidade CTP localizada dentro da sequência codificadora do INF é codificado por uma molécula de ácido nucleico estabelecida em SEQ ID NO: 38. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 38 compreende a seguinte sequência de nucleotídeos (AA):

tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagca
ccaccgccctgagcagcagcagctccaaggccccacccccagcctgcccagccccagc
aggctgccaggccccagcgacacccccatcctgccccagatgagctacaacctgctggg
cttcctgcagaggtccagcaacttccagtgccagaaactgctgtggcagctgaacggca
ggctggaatactgcctgaaggaccggatgaacttcgacatccccgaagagatcaagcag
ctgcagcagttccagaaagaggacgccgccctgaccatctacgagatgctgcagaacat
cttcgccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggaga
acctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccacctgaaaaccgtgctggaagagaag
ctggaaaaagaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggta
ctacggcagaatcctgcactacctgaaggccaaagagtacagccactgcgcctggacca
tcgtgagggtggagatcctgcggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctg
aggaacagctccagcagcaaggcccctccaccctccctgccctccccaagcagactgcc
cggaccctccgacacaccaattctgccacagatgtcctacaatctgctcggatttctgc
agcgctcctccaactttcagtgtcagaagctcctctggcagctcaatggccgcctggaa
tattgtctgaaagacagaatgaattttgacatcccagaggaaattaaacagctccagca
gtttcagaaagaagatgctgctctcacaatctatgaaatgctccagaatatctttgcaa
tctttcgccaggacagctcctccaccgggtggaatgagacaattgtcgagaatctgctc
gccaatgtctatcatcagatcaatcacctcaagacagtcctcgaagaaaaactcgaaaa
agaagatttcacacgcggcaaactgatgtcctccctgcatctgaagcgctactatgggc

gcatcctgcattatctgaaagctaaagaatactcccactgtgcttggacaattgtgcgc gtcgagatcctgagaaacttttatttcattaaccgcctgacaggatacctgcgcaactg atgaaggtctggatgcggccgc (SEQ ID NO: 38).

[0150] Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN) e uma única unidade CTP ligada no amino terminal. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN) - CTP compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 39. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 39 compreende a seguinte sequência de aminoácidos (AA): MTNKCLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQMSYNLLGFLQ RSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAI FRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGR ILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRN* (SEQ ID NO: 39).

[0151] Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN) - e uma única unidade CTP ligada ao amino terminal é codificado por uma molécula de ácido nucleico estabelecida em SEQ ID NO: 40. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 40 compreende a seguinte sequência de nucleotídeos (AA): tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagca ccaccgccctgagcagcagcagctccaaggccccacccccagcctgcccagccccagc aggctgccaggccccagcgacacccccatcctgccccagatgagctacaacctgctggg cttcctgcagaggtccagcaacttccagtgccagaaactgctgtggcagctgaacggca ggctggaatactgcctgaaggaccggatgaacttcgacatccccgaagagatcaagcag ctgcagcagttccagaaagaggacgccgccctgaccatctacgagatgctgcagaacat cttcgccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggaga acctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccacctgaaaaccgtgctggaagagaag ctggaaaaagaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggta

ctacggcagaatcctgcactacctgaaggccaaagagtacagccactgcgcctggacca tcgtgagggtggagatcctgcggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctg aggaactgatgagtccgcggccgc (SEQ ID NO: 40).

[0152] Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN), uma única unidade CTP ligada ao seu amino terminal, e uma única unidade CTP ligada ao seu carbóxi terminal. Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreende um peptídeo de interferon (IFN) - CTP compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 41. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 41 compreende a seguinte sequência de aminoácidos (AA):
MTNKCLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQMSYNLLGFLQ RSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAI FRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGR ILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRNSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPS DTPILPQ* (SEQ ID NO: 41).

[0153] Em outra modalidade, o polipeptídeo conforme descrito aqui compreendendo um peptídeo de interferon (IFN), uma única unidade CTP ligada ao seu amino terminal, e uma única unidade CTP ligada ao seu carbóxi terminal é codificado por uma molécula de ácido nucleico estabelecida em SEQ ID NO: 42. Em outra modalidade, SEQ ID NO: 42 compreende a seguinte sequência de nucleotídeos (AA):
tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagca ccaccgccctgagcagcagcagctccaaggccccacccccagcctgcccagccccagc agactgccaggccccagcgacacccccatcctgccccagatgagctacaacctgctggg cttcctgcagaggtccagcaacttccagtgccagaagctgctgtggcagctgaacggca ggctggaatactgcctgaaggacaggatgaacttcgacatcccagaggaaatcaagcag ctgcagcagttccagaaggaggacgccgccctgaccatctacgagatgctgcagaacat

cttcgccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggaga
acctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccacctgaaaaccgtgctggaagagaag
ctggaaaaggaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggta
ctacggcagaatcctgcactacctgaaggccaaggagtacagccactgcgcctggacca
tcgtgagggtggagatcctgaggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctg
aggaacagctccagcagcaaggcccctccaccttccctgcccagtccaagccgactccc
tgggccctccgatacaccaattctgccacagtgatgaaggtctggatgcggccgc
(SEQ ID NO: 42).

[0154] Em outra modalidade, um peptídeo de interferon β compreende SEQ ID NO: 43 compreendendo a seguinte sequência de aminoácidos (AA):
MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTI
YEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMS
SLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRN (SEQ ID NO: 43).

[0155] Em uma modalidade, o polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui é um peptídeo tipo glucagon-1. Em outra modalidade, peptídeo tipo glucagon-1 é utilizado de acordo com os ensinamentos da presente invenção. Em outra modalidade, a ligação das sequências do CTP para o amino e carbóxi terminal de um "peptídeo tipo glucagon-1" resulta em potência aumentada. Em outra modalidade, a ligação para CTP para amino e carbóxi terminal de um peptídeo resulta em atividade prolongada *in vivo*. Em outra modalidade, a ligação para CTP para amino e carbóxi terminal de um peptídeo tipo glucagon resulta em atividade prolongada *in vivo*.

[0156] Em uma modalidade, "peptídeo tipo glucagon-1" (GLP-1) se refere a um polipeptídeo de mamífero. Em uma modalidade, "peptídeo tipo glucagon-1" (GLP-1) se refere a

um polipeptídeo humano. Em outra modalidade, GLP-1 é clivado da preproproteína de glucagon (Genbank ID No. NP002045) que tem a capacidade de se ligar ao receptor GLP-1 e iniciar uma via de transdução de sinal resultando em atividade insulinotrópica. Em uma modalidade, "atividade insulinotrópica" refere-se à capacidade de estimular a secreção de insulina em resposta aos níveis elevados de glicose, causando assim a absorção de glicose pelas células e níveis de glicose no plasma diminuídos. Em algumas modalidades, polipeptídeos GLP-1 incluem, entre outros, os descritos em Patente US 5.118.666; que é incorporada como referência aqui.

[0157] Em uma modalidade, GLP-1 da presente invenção também se refere aos homólogos de GLP-1. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos do GLP-1 da presente invenção é pelo menos 50% homóloga a uma sequência do GLP-1 estabelecida em GenBank ID No. NP002045 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos do GLP-1 da presente invenção é pelo menos 60% homóloga a uma sequência do GLP-1 estabelecida em GenBank ID No. NP002045 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos do GLP-1 da presente invenção é pelo menos 70% homóloga a uma sequência do GLP-1 estabelecida em GenBank ID No. NP002045 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, a

sequência de aminoácidos do GLP-1 da presente invenção é pelo menos 80% homóloga a uma sequência do GLP-1 estabelecida em GenBank ID No. NP002045 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos do GLP-1 da presente invenção é pelo menos 90% homóloga a uma sequência do GLP-1 estabelecida em GenBank ID No. NP002045 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos do GLP-1 da presente invenção é pelo menos 95% homóloga a uma sequência do GLP-1 estabelecida em GenBank ID No. NP002045 conforme determinado utilizando o software BlastP do National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão.

[0158] Em uma modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é uma apolipoproteína. Em outra modalidade, o polipeptídeo ou fragmento do mesmo aqui fornecido é uma apolipoproteína A1 (APO-A1). Em outra modalidade, a apolipoproteína é ligada pelo menos um peptídeo CTP no N- e/ou C-terminal. Em outra modalidade, a apolipoproteína é de apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, apolipoproteína AIV, ou um análogo ou variante da mesma.

[0159] Em uma modalidade, os construtos de apolipoproteína de acordo com a presente invenção amplamente podem ser encarados como análogos de HDL devido à sua capacidade de formar complexos com o colesterol e outros lipídios em ajudar no transporte desses compostos

para o fígado.

[0160] Em outra modalidade, a equivalência funcional para apolipoproteína A-I, A-II ou A-IV nativa pode convenientemente ser medida usando um ensaio de ligação de lipídio. A capacidade de a apolipoproteína modificada com CTP substancialmente eliciar a mesma resposta fisiológica em um mamífero pode convenientemente ser medida pela medição da capacidade de realizar o transporte reverso de colesterol em um organismo teste como coelhos ou roedores como camundongos.

[0161] Em uma modalidade, o polipeptídeo compreendendo a apolipoproteína modificada CTP é capaz de realizar o transporte reverso de colesterol, bem como ou até melhor do que apolipoproteínas nativas *in vivo*, apesar da modificação causada pela adição de pelo menos um CTP. Em outra modalidade, *in vitro*, a apolipoproteína modificada com CTP tem atividade biológica *in vitro* mais baixa, mas é compensada por uma meia-vida estendida. Em outra modalidade, a meia-vida no plasma da apolipoproteína modificada com CTP é preferencialmente aumentada em comparação com a de apolipoproteína de tipo selvagem. Em uma modalidade, a meia-vida aumentada é devido ao tamanho hidrodinâmico do construto de apolipoproteína, que pode reduzir a taxa de filtração através dos rins.

[0162] Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos da APO-A1 é DEPPQSPWDRVKDKATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSAGKGLNLKLLDNWDSVTSTFSKL REQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRGEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKV EPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELRQRLAARL EALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYT

KKLNTQ (SEQ ID NO: 44) ou um homólogo ou variante ou fragmento da mesma. Em uma modalidade, os métodos da presente invenção fornecem uma sequência de aminoácidos compreendendo um peptídeo APO-A1 tendo um peptídeo de aminoácidos do CTP no C-terminal: MKAAVLTLAVLFLTGSQARHFWQQDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEG SALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVK AKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRAR AHVDALRTHLAPYSDELRQRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALE DLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 70).

[0163] Em outra modalidade, os métodos do presente invenção fornecem uma sequência de ácido nucleico estabelecida em SEQ ID NO: 71 que codifica um peptídeo APO-A1 e um peptídeo de aminoácidos do CTP no C-terminal: ATGAAGGCCGCCGTGCTGACCCTGGCCGTGCTGTTTCTGACCGGCTCTCAGGCCCGGCA CTTCTGGCAGCAGGACGAGCCTCCCCAGTCCCCCTGGGACAGAGTGAAGGACCTGGCCA CCGTGTACGTGGACGTGCTGAAGGACTCCGGCAGAGACTACGTGTCCCAGTTCGAGGGC TCTGCCCTGGGCAAGCAGCTGAACCTGAAGCTGCTGGACAACTGGGACTCCGTGACCTC CACCTTCTCCAAGCTGCGCGAACAGCTGGGACCTGTGACCCAGGAATTCTGGGACAACC TGGAAAAAGAGACAGAGGGCCTGAGACAGGAAATGTCCAAGGACCTGGAAGAGGTCAAA GCCAAGGTGCAGCCCTACCTGGACGACTTCCAGAAGAAATGGCAGGAAGAGATGGAACT GTACCGGCAGAAGGTGGAACCCCTGCGGGCCGAGCTGCAGGAAGGCGCTAGACAGAAGC TGCACGAACTGCAGGAAAAGCTGTCCCCCCTGGGCGAGGAAATGCGGGACAGAGCCAGA GCCCACGTGGACGCCCTGAGAACCCACCTGGCCCCCTACTCTGACGAGCTGCGGCAGAG GCTGGCCGCCAGACTGGAAGCCCTGAAAGAGAACGGCGGAGCCCGGCTGGCCGAGTACC ACGCTAAGGCTACCGAGCACCTGTCCACCCTGTCCGAGAAGGCCAAGCCCGCCCTGGAA GATCTGCGGCAGGGCCTGCTGCCCGTGCTGGAATCCTTCAAGGTGTCCTTCCTGTCCGC TCTGGAAGAGTACACCAAGAAGCTGAACACCCAGTCCTCCAGCTCCAAGGCCCCTCCAC CCTCCCTGCCTAGCCCTAGTAGACTGCCTGGGCCCTCCGACACCCCCATCCTGCCCCAG

TGATGAGGATCCGCGGCCGCGAGCTC (SEQ ID NO: 71).

[0164] Em uma modalidade, os métodos da presente invenção fornecem uma sequência de aminoácidos compreendendo um peptídeo APO-A1 tendo dois peptídeos de aminoácidos do CTP no C-ter006Dinal: MKAAVLTLAVLFLTGSQARHFWQQDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEG SALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVK AKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRAR AHVDALRTHLAPYSDELRQRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALE DLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 72).

[0165] Em outra modalidade, os métodos do presente invenção fornecem uma sequência de ácido nucleico estabelecida em SEQ ID NO: 73 que codifica um peptídeo APO-A1 e dois peptídeos de aminoácidos do CTP no C-terminal: ATGAAGGCCGCCGTGCTGACCCTGGCCGTGCTGTTTCTGACCGGCTCTCAGGCCCGGCA CTTCTGGCAGCAGGACGAGCCTCCCCAGTCCCCCTGGGACAGAGTGAAGGACCTGGCCA CCGTGTACGTGGACGTGCTGAAGGACTCCGGCAGAGACTACGTGTCCCAGTTCGAGGGC TCTGCCCTGGGCAAGCAGCTGAACCTGAAGCTGCTGGACAACTGGGACTCCGTGACCTC CACCTTCTCCAAGCTGCGCGAACAGCTGGGACCTGTGACCCAGGAATTCTGGGACAACC TGGAAAAAGAGACAGAGGGCCTGAGACAGGAAATGTCCAAGGACCTGGAAGAGGTCAAA GCCAAGGTGCAGCCCTACCTGGACGACTTCCAGAAGAAATGGCAGGAAGAGATGGAACT GTACCGGCAGAAGGTGGAACCCCTGCGGGCCGAGCTGCAGGAAGGCGCTAGACAGAAGC TGCACGAACTGCAGGAAAAGCTGTCCCCCCTGGGCGAGGAAATGCGGGACAGAGCCAGA GCCCACGTGGACGCCCTGAGAACCCACCTGGCCCCCTACTCTGACGAGCTGCGGCAGAG GCTGGCCGCCAGACTGGAAGCCCTGAAAGAGAACGGCGGAGCCCGGCTGGCCGAGTACC ACGCTAAGGCTACCGAGCACCTGTCCACCCTGTCCGAGAAGGCCAAGCCCGCCCTGGAA GATCTGCGGCAGGGCCTGCTGCCCGTGCTGGAATCCTTCAAGGTGTCCTTCCTGTCCGC TCTGGAAGAGTACACCAAGAAGCTGAACACCCAGTCCTCCAGCTCCAAGGCCCCTCCAC CCTCCCTGCCTAGCCCTAGTAGACTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCCTGCCACAG

AGCAGCTCCTCTAAGGCCCCTCCTCCATCCCTGCCATCCCCCTCCCGGCTGCCTGGCCC CTCTGACACCCCTATCCTGCCTCAGTGATGAAGGTCTGGATCCGCGGCCGC (SEQ ID NO: 73).

[0166] Em uma modalidade, um equivalente funcional de uma apolipoproteína ou fragmentos da mesma pode ser obtido por adição, substituição ou deleção de pelo menos um aminoácido. Quando a sequência de aminoácidos compreende uma substituição de um aminoácido por outro, essa substituição pode ser uma substituição de aminoácido conservadora. Fragmentos de SEQ ID NO: 44 podem compreender mais de uma dessas substituições, como, por exemplo, duas substituições de aminoácidos conservadoras, por exemplo, três ou quatro substituições de aminoácidos conservadoras, como cinco ou seis substituições de aminoácidos conservadoras, por exemplo, sete ou oito substituições de aminoácidos conservadoras, como de 10 a 15 substituições de aminoácidos conservadoras, por exemplo, de 15 a 25 substituições de aminoácidos conservadoras, por exemplo, de 25 a 75 substituições de aminoácidos conservadoras, por exemplo, de 75 a 125 substituições de aminoácidos conservadoras, com de 125 a 175 substituições de aminoácidos conservadoras. Substituições podem ser feitas dentro de qualquer um ou mais grupos de aminoácidos predeterminados.

[0167] Em outra modalidade, um fragmento de apolipoproteína contém a região de ligação de lipídio.

[0168] "Equivalência funcional" como usado na presente invenção é de acordo com uma modalidade preferencial estabelecida por meio de referência para a funcionalidade correspondente de um fragmento

predeterminado das sequências fornecidas aqui.

[0169] Equivalentes funcionais das variantes das sequências fornecidas aqui serão entendidos para apresentar sequências de aminoácidos gradualmente se diferenciando da sequência predeterminada preferencial, à medida que o número e o escopo de inserções, deleções e substituições, incluindo substituições conservadoras aumenta. Esta diferença é medida como uma redução de homologia entre a sequência predeterminada preferencial e o fragmento ou equivalente funcional.

[0170] Em uma modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é uma citocina. Em outra modalidade, a citocina é uma citocina hematopoietina. Em outra modalidade, a citocina é uma citocina Interferon. Em outra modalidade, a citocina é um quimiocina. Em outra modalidade, o citocina é uma citocina de Fator de Necrose Tumoral. Em outra modalidade, uma citocina como usada aqui compreende atividade biológica e eficácia clínica. Em outra modalidade, uma citocina como usada aqui é uma proteína terapêutica.

[0171] Todos os fragmentos ou equivalentes funcionais de apolipoproteína estão incluídos no escopo da presente invenção, independentemente do grau de homologia que mostram para uma sequência predeterminada preferencial de apolipoproteína. A razão para isto é que algumas regiões da sequência de SEQ ID NO: 44 são mais prováveis de mutação rapidamente, ou capazes de ser completamente deletadas, sem qualquer efeito significativo sobre a atividade de ligação do fragmento resultante. Métodos para gerar variantes funcionalmente equivalentes de SEQ ID NO:44 são descritos

em Patente US 6.897.039, incorporados aqui como referência.

[0172] Em uma modalidade, o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo aqui fornecido é uma fator de coagulação. Em outra modalidade, um fator de coagulação da invenção é uma proteína. Em outra modalidade, um fator de coagulação da invenção é um peptídeo. Em outra modalidade, um fator de coagulação da invenção é um polipeptídeo. Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma enzima. Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma serina protease Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma glicoproteína Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma transglutaminase Em outra modalidade, o fator de coagulação é um zimogênio inativo. Em outra modalidade, o fator de coagulação é qualquer fator de coagulação conhecido por um especialista na técnica. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FVIII. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FV. Em outra modalidade, o fator de coagulação é Fator XIII. Em outra modalidade, o fator de coagulação é fator X. Em outra modalidade, o fator de coagulação é trombina. Em outra modalidade, o fator de coagulação é fibrina. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FVIIIa. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FVII. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FIX. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FX. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FXIa. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FXII. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FXa. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FVa. Em outra modalidade, o fator de coagulação é protrombina. Em outra

modalidade, o fator de coagulação é trombina. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FV. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FXI. Em outra modalidade, o fator de coagulação é vWF. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FVIIIa. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FVIII de Domínio B deletado (FVIIIBDD). Em outra modalidade, o fator de coagulação é FIXa. Em outra modalidade, o fator de coagulação é precalicreína. Em outra modalidade, o fator de coagulação é calicreína. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FXIIa. Em outra modalidade, o fator de coagulação é fibrinogênio. Em outra modalidade, o fator de coagulação é trombomodulina. Em outra modalidade, o fator de coagulação é FII.

[0173] Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma glicoproteína. Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma glicoproteína dependente de vitamina K Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma glicoproteína independente de vitamina K Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma proteína recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma glicoproteína recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma glicoproteína recombinante FV. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FVI recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FVII recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FVIII recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FIX recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FX recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FXI recombinante. Em outra

modalidade, o fator de coagulação é um FXII recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FvW recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FII recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FIXa recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FXIa recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma fibrina recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FVIIa recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FXa recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FVa recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma protrombina recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma trombina recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FVIIIa recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma precalicreína recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é uma calicreína recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é um FXIIa recombinante. Em outra modalidade, o fator de coagulação é qualquer fator de coagulação recombinante conhecido. Em outra modalidade, o fator de coagulação compreendendo o peptídeo sinal é qualquer fator de coagulação recombinante conhecido. Em outra modalidade, um fator de coagulação compreende 1-10 repetições de CTP ligadas ao C-terminal e nenhum CTP ligado ao N-terminal. Em outra modalidade, o fator de coagulação compreendendo o peptídeo sinal é qualquer fator de coagulação recombinante conhecido. Em outra modalidade, um fator de coagulação compreende pelo menos um CTP ligado ao C-terminal e nenhum CTP ligado ao N-terminal. Em outra modalidade, um fator de

coagulação compreendendo 1-10 repetições de CTP ligadas ao C-terminal e nenhum CTP ligado ao N-terminal é um fator de coagulação projetado. Em outra modalidade, um fator de coagulação compreendendo pelo menos um CTP ligado ao C-terminal e nenhum CTP ligado ao N-terminal é um fator de coagulação projetado. Em outra modalidade, um fator de coagulação compreendendo 1-10 repetições de CTP ligadas ao C-terminal e nenhum CTP ligado ao N-terminal é um fator de coagulação projetado. Em outra modalidade, um fator de coagulação compreendendo pelo menos um CTP ligado ao C-terminal e nenhum CTP ligado ao N-terminal é um fator de coagulação projetado.

[0174] Em outra modalidade, o fator de coagulação compreendendo uma organização de domínio semelhante ou idêntica à organização de domínio de FIX, FVII, fator X, proteína C e protrombina. Em outra modalidade, o fator de coagulação é sintetizado como precursores com N-terminal pró-peptídeo. Em outra modalidade, o fator de coagulação como usado aqui é de forma pró-enzima inativa. Em outra modalidade, o fator de coagulação é produzido em hepatócitos. Em outra modalidade, o fator de coagulação compreende um sítio de encaixe para gamacarboxilase que converte ácido glutâmico (Glu) em ácidos glutâmicos gama carbóxi (Gla). Em outra modalidade, o fator de coagulação é um fator de coagulação comercialmente disponível.

[0033] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do fator VII compreende a seguinte sequência de aminoácidos:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERE CKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPA FEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYP

CGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAH
CFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPV
VLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNV
PRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGI
VSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPR PGVLLRAPFP (SEQ ID NO: 45).

[0175] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do fator VII compreende a seguinte sequência de aminoácidos:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQ
CSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDH
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRK
VGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFG
VYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP*GCGR. (SEQ ID NO: 46).

[0176] Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica o fator VII compreende a sequência de ácido nucleico:

CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCA
GGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCCACGGCGTCCTGCA
CCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGA
GAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAA
GGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTG
TGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTAT
ATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAACTGTGAGACGCACAAGGATG
ACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACC
ACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAG
ACGGGGTGTCCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCTATTCT

AGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGT
GCCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTT
GTGTGGGGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTC
GACAAAATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTC
AGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCC
AGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACC
AGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTGGTGCCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTT
CTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAG
CTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCCTCAACGTGCCCCGGC
TGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATA
TCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCAA
GGGGGACAGTGGAGGCCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACCTGAC
GGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTA
CACCAGGGTCTCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCC
ACGCCCAGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCCTGAGGATGCGGCCGC (SEQ ID NO: 47).

[0177] Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica o fator VII-CTP (ligado ao carbóxi terminal) compreende a seguinte sequência de ácido nucleico:

CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCA
GGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCCACGGCGTCCTGCA
CCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGA
GAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAA
GGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTG
TGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTAT
ATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAACTGTGAGACGCACAAGGATG
ACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACC
ACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAG
ACGGGGTGTCCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCTATTCT

AGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGT
GCCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTT
GTGTGGGGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTC
GACAAAATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTC
AGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCC
AGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACC
AGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTGGTGCCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTT
CTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAG
CTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCCTCAACGTGCCCCGGC
TGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATA
TCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCAA
GGGGGACAGTGGAGGCCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACCTGACCGGCA
TCGTGAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCCACCGTGGGCCACTTCGGCGTGTACACCAGGGTG
TCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAGAAACTGATGAGAAGCGAGCCCAGACCCGGCGTGCT
GCTGAGAGCCCCCTTCCCCAGCAGCAGCTCCAAGGCCCCTCCCCCTAGCCTGCCCAGCC
CTAGCAGACTGCCTGGGCCCAGCGACACCCCCATCCTGCCCCAGTGAGGATCCGCGGCC
GC (SEQ ID NO: 48).

[0178] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do fator VII-CTP (ligado ao carbóxi terminal) compreende a seguinte sequência de aminoácidos:
MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQ
CSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDH
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRK
VGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFG
VYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ
* (SEQ ID NO: 49).

[0179] Em outra modalidade, a sequência de ácido

nucleico que codifica o fator VII-CTP-CTP (ligado ao carbóxi terminal) compreende a seguinte sequência de ácido nucleico:

CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCA

GGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCCACGGCGTCCTGCA

CCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGA

GAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAA

GGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTG

TGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTAT

ATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAACTGTGAGACGCACAAGGATG

ACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACC

ACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAG

ACGGGGTGTCCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCTATTCT

AGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGT

GCCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTT

GTGTGGGGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTC

GACAAAATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTC

AGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCC

AGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACC

AGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTGGTGCCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTT

CTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAG

CTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCCTCAACGTGCCCCGGC

TGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATA

TCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCAA

GGGGGACAGTGGAGGCCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACCTGAC

CGGCATCGTGAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCCACCGTGGGCCACTTCGGCGTGTA

CACCAGGGTGTCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAGAAACTGATGAGAAGCGAGCC

CAGACCCGGCGTGCTGCTGAGAGCCCCCTTCCCCAGCAGCAGCTCCAAGGCCCCT

CCCCCTAGCCTGCCCAGCCCTAGCAGACTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCC

TGCCACAGAGCAGCTCCTCTAAGGCCCCTCCTCCATCCCTGCCATCCCCCTCCCG

GCTGCCAGGCCCCTCTGACACCCCTATCCTGCCTCAGTGATGAAGGTCTGGATCC GCGGCCGC (SEQ ID NO: 50).

[0180] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do fator VII-CTP-CTP (ligado ao carbóxi terminal) compreende a seguinte sequência de aminoácidos: MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQ CSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIP ILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDH VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFG VYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ** (SEQ ID NO: 51).

[0181] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do fator VII-CTP-CTP-CTP (três ligados ao carbóxi terminal) compreende a seguinte sequência de aminoácidos:
MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQ CSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIP ILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDH VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFG VYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 52).

[0182] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do fator VII-CTP(X4) (quatro ligados ao carbóxi

terminal) compreende a seguinte sequência de aminoácidos: MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQ CSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIP ILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDH VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFG VYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSS SKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 53).

[0183] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do fator VII-CTP(x5) (cinco ligados ao carbóxi terminal) compreende a seguinte sequência de aminoácidos: MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQ CSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIP ILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDH VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFG VYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSS SKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 54).

[0184] Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica o fator IX compreende a seguinte sequência de ácido nucleico:

GCGATCGCCATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATC

ACCATTGCCTTTTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCAT

GAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTG
GAAGAGTTTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGT
TTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACTGAATTTTGG
AAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCA
GTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGG
AAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCA
GTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATAT
CGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGA
AGAGTTTCTGTTTCACAAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCCTGA
TGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAA
AGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGAGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAAC
CAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGG
AGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAACTGCTGCCCACTGTGTTGAAACT
GGTGTTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACAT
ACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTCGAATTATTCCTCACCACAACTACAATGCA
GCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAACTGGACGAACCCTTAG
TGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACAT
CTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAA
GGGAGATCAGCTTTAGTTCTCCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCA
CATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTC
CATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACT
GAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGT
GCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGG
ATTAAGGAAAAAACAAAGCTCACTTGAACGCGGCCGC (SEQ ID NO: 55).

[0185] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do fator IX compreende a seguinte sequência de aminoácidos:

MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN
LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECW
CPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFP

CGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPG
QFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN
VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVS
GWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGG
PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT* (SEQ ID
NO: 56).

[0186] Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica o fator IX-CTP (ligado ao carbóxi terminal) compreende a seguinte sequência de ácido nucleico:

GCGATCGCCATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATC
ACCATCTGCCTTTTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCA
TGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATT
GGAAGAGTTTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAG
TTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACTGAATTTTG
GAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGC
AGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAG
GAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGC
AGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATA
TCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGA
AGAGTTTCTGTTTCACAAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCCTGA
TGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAA
AGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGAGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAAC
CAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGG
AGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAACTGCTGCCCACTGTGTTGAAACT
GGTGTTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACAT
ACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTCGAATTATTCCTCACCACAACTACAATGCA
GCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAACTGGACGAACCCTTAG
TGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACAT
CTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAA

GGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCA
CATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTC
CATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACT
GAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGT
GCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGG
ATTAAGGAAAAAACAAAGCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCCCCTCCCCCGAGC
CTGCCCTCCCCAAGCAGGCTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCCTGCCACAGT
GATGAAGGTCTGGATCCGCGGCCGC (SEQ ID NO: 57).

[0187] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do fator IX-CTP (ligado ao carbóxi terminal) compreende a seguinte sequência de aminoácidos:
MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN
LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECW
CPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFP
CGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPG
QFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN
VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVS
GWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGG
PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPSL
PSPSRLPGPSDTPILPQ** (SEQ ID NO: 58).

[0188] Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica o fator IX-CTP-CTP (ligado ao carbóxi terminal) compreende a seguinte sequência de ácido nucleico:
GCGATCGCCATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATC
ACCATCTGCCTTTTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCA
TGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATT
GGAAGAGTTTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAG
TTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACTGAATTTTG
GAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGC

AGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAG
GAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGC
AGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATA
TCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGA
AGAGTTTCTGTTTCACAAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCCTGA
TGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAA
AGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGAGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAAC
CAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGG
AGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAACTGCTGCCCACTGTGTTGAAACT
GGTGTTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACAT
ACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTCGAATTATTCCTCACCACAACTACAATGCA
GCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAACTGGACGAACCCTTAG
TGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTACAAGGAATACACGAACATC
TTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAG
GGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCAC
ATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCC
ATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTG
AAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTG
CAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGA
TTAAGGAAAAAACAAAGCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCCCCTCCCCCGAGCC
TGCCCTCCCCAAGCAGGCTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCCTGCCACAGAG
CAGCTCCTCTAAGGCCCCTCCTCCATCCCTGCCATCCCCCTCCCGGCTGCCTGGCC
CCTCTGACACCCCTATCCTGCCTCAGTGATGAAGGTCTGGATCCGCGGCCGC (SEQ
ID NO: 59).

[0189] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do fator IX-CTP-CTP (ligado ao carbóxi terminal) compreende a seguinte sequência de aminoácidos:
MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN
LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECW
CPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFP

CGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPG
QFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIE
ETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNI
FLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGG
RDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTS
SSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ**
(SEQ ID NO: 60).

[0190] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do fator IX-CTP(x3) (três ligados ao carbóxi terminal) compreende a seguinte sequência de aminoácidos: MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN
LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECW
CPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFP
CGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPG
QFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN
VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVS
GWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGG
PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPSL
PSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSP
SRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 61).

[0191] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do fator IX-CTP(x4) (quatro ligados ao carbóxi terminal) compreende a seguinte sequência de aminoácidos: MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN
LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECW
CPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFP
CGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPG
QFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN
VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVS
GWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGG

PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPSL
PSPSRLPGPSDTPILPQSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSSKAPPPSLPSP
SRLPGPSDTPILPQSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 62).

[0192] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos do fator IX-CTP(x5) (cinco ligados ao carbóxi terminal) compreende a seguinte sequência de aminoácidos: MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN
LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECW
CPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFP
CGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPG
QFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN
VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVS
GWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGG
PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPSL
PSPSRLPGPSDTPILPQSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSSKAPPPSLPSP
SRLPGPSDTPILPQSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSSKAPPPSLPSPSRL
PGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 63).

[0193] Em outra modalidade, furina é adicionada a uma célula que expressa o fator de coagulação-CTP da invenção. Em outra modalidade, furina aumenta a eficiência da produção de um fator de coagulação-CTP da invenção em uma célula. Em outra modalidade, furina é co-transfectada com o vetor que compreendendo a sequência codificadora do fator de coagulação-CTP da invenção. Em outra modalidade, furina é codificada por um vetor separado. Em outra modalidade, furina e um fator de coagulação-CTP são codificados por um vetor. Em outra modalidade, a sequência codificadora de furina é inserida em pCI-DHFR. Em outra modalidade, a sequência codificadora de furina é projetada em pCI-dhfr/smaI+NotI, Furina/AsisI F.I.+NotI.

[0194] Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica furina compreende a seguinte sequência de ácido nucleico:

TCTAGAGTCGACCCCGCCATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGCTATGGGTGGTAGCAGCAAC

AGGAACCTTGGTCCTGCTAGCAGCTGATGCTCAGGGCCAGAAGGTCTTCACCAACA

CGTGGGCTGTGCGCATCCCTGGAGGCCCAGCGGTGGCCAACAGTGTGGCACGGA

AGCATGGGTTCCTCAACCTGGGCCAGATCTTCGGGGACTATTACCACTTCTGGCA

TCGAGGAGTGACGAAGCGGTCCCTGTCGCCTCACCGCCCGCGGCACAGCCGGCT

GCAGAGGGAGCCTCAAGTACAGTGGCTGGAACAGCAGGTGGCAAAGCGACGGA

CTAAACGGGACGTGTACCAGGAGCCCACAGACCCCAAGTTTCCTCAGCAGTGGT

ACCTGTCTGGTGTCACTCAGCGGGACCTGAATGTGAAGGCGGCCTGGGCGCAGG

GCTACACAGGGCACGGCATTGTGGTCTCCATTCTGGACGATGGCATCGAGAAGA

ACCACCCGGACTTGGCAGGCAATTATGATCCTGGGGCCAGTTTTGATGTCAATGA

CCAGGACCCTGACCCCCAGCCTCGGTACACACAGATGAATGACAACAGGCACGG

CACACGGTGTGCGGGGGAAGTGGCTGCGGTGGCCAACAACGGTGTCTGTGGTGT

AGGTGTGGCCTACAACGCCCGCATTGGAGGGGTGCGCATGCTGGATGGCGAGGT

GACAGATGCAGTGGAGGCACGCTCGCTGGGCCTGAACCCCAACCACATCCACAT

CTACAGTGCCAGCTGGGGCCCCGAGGATGACGGCAAGACAGTGGATGGGCCAGC

CCGCCTCGCCGAGGAGGCCTTCTTCCGTGGGGTTAGCCAGGGCCGAGGGGGGCT

GGGCTCCATCTTTGTCTGGGCCTCGGGGAACGGGGGCCGGGAACATGACAGCTG

CAACTGCGACGGCTACACCAACAGTATCTACACGCTGTCCATCAGCAGCGCCAC

GCAGTTTGGCAACGTGCCGTGGTACAGCGAGGCCTGCTCGTCCACACTGGCCACG

ACCTACAGCAGTGGCAACCAGAATGAGAAGCAGATCGTGACGACTGACTTGCGG

CAGAAGTGCACGGAGTCTCACACGGGCACCTCAGCCTCTGCCCCCTTAGCAGCCG

GCATCATTGCTCTCACCCTGGAGGCCAATAAGAACCTCACATGGCGGGACATGC

AACACCTGGTGGTACAGACCTCGAAGCCAGCCCACCTCAATGCCAACGACTGGG

CCACCAATGGTGTGGGCCGGAAAGTGAGCCACTCATATGGCTACGGGCTTTTGG

ACGCAGGCGCCATGGTGGCCCTGGCCCAGAATTGGACCACAGTGGCCCCCCAGC

GGAAGTGCATCATCGACATCCTCACCGAGCCCAAAGACATCGGGAAACGGCTCG

AGGTGCGGAAGACCGTGACCGCGTGCCTGGGCGAGCCCAACCACATCACTCGGC

TGGAGCACGCTCAGGCGCGGCTCACCCTGTCCTATAATCGCCGTGGCGACCTGGC
CATCCACCTGGTCAGCCCCATGGGCACCCGCTCCACCCTGCTGGCAGCCAGGCCA
CATGACTACTCCGCAGATGGGTTTAATGACTGGGCCTTCATGACAACTCATTCCT
GGGATGAGGATCCCTCTGGCGAGTGGGTCCTAGAGATTGAAAACACCAGCGAAG
CCAACAACTATGGGACGCTGACCAAGTTCACCCTCGTACTCTATGGCACCGCCCC
TGAGGGGCTGCCCGTACCTCCAGAAAGCAGTGGCTGCAAGACCCTCACGTCCAG
TCAGGCCTGTGTGGTGTGCGAGGAAGGCTTCTCCCTGCACCAGAAGAGCTGTGTC
CAGCACTGCCCTCCAGGCTTCGCCCCCCAAGTCCTCGATACGCACTATAGCACCG
AGAATGACGTGGAGACCATCCGGGCCAGCGTCTGCGCCCCCTGCCACGCCTCAT
GTGCCACATGCCAGGGGCCGGCCCTGACAGACTGCCTCAGCTGCCCCAGCCACG
CCTCCTTGGACCCTGTGGAGCAGACTTGCTCCCGGCAAAGCCAGAGCAGCCGAG
AGTCCCCGCCACAGCAGCAGCCACCTCGGCTGCCCCCGGAGGTGGAGGCGGGGC
AACGGCTGCGGGCAGGGCTGCTGCCCTCACACCTGCCTGAGGTGGTGGCCGGCC
TCAGCTGCGCCTTCATCGTGCTGGTCTTCGTCACTGTCTTCCTGGTCCTGCAGCTG
CGCTCTGGCTTTAGTTTTCGGGGGGTGAAGGTGTACACCATGGACCGTGGCCTCA
TCTCCTACAAGGGGCTGCCCCCTGAAGCCTGGCAGGAGGAGTGCCCGTCTGACTC
AGAAGAGGACGAGGGCCGGGGCGAGAGGACCGCCTTTATCAAAGACCAGAGCG
CCCTCTGAACGCGGCCGC (SEQ ID NO: 64).

[0195] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos da furina compreende a seguinte sequência de aminoácidos:

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFLNLGQ
IFGDYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKRDVYQEPTDPKF
PQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQGYTGHGIVVSILDDGIEKNHPDLAGNYDPGASFDVND
QDPDPQPRYTQMNDNRHGTRCAGEVAAVANNGVCGVGVAYNARIGGVRMLDGEVTDAVE
ARSLGLNPNHIHIYSASWGPEDDGKTVDGPARLAEEAFFRGVSQGRGGLGSIFVWASGN
GGREHDSCNCDGYTNSIYTLSISSATQFGNVPWYSEACSSTLATTYSSGNQNEKQIVTT
DLRQKCTESHTGTSASAPLAAGIIALTLEANKNLTWRDMQHLVVQTSKPAHLNANDWAT
NGVGRKVSHSYGYGLLDAGAMVALAQNWTTVAPQRKCIIDILTEPKDIGKRLEVRKTVT
ACLGEPNHITRLEHAQARLTLSYNRRGDLAIHLVSPMGTRSTLLAARPHDYSADGFNDW

AFMTTHSWDEDPSGEWVLEIENTSEANNYGTLTKFTLVLYGTAPEGLPVPPESSGCKTL
TSSQACVVCEEGFSLHQKSCVQHCPPGFAPQVLDTHYSTENDVETIRASVCAPCHASCA
TCQGPALTDCLSCPSHASLDPVEQTCSRQSQSSRESPPQQQPPRLPPEVEAGQRLRAGL
LPSHLPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLVLQLRSGFSFRGVKVYTMDRGLISYKGLPPEAW
QEECPSDSEEDEGRGERTAFIKDQSAL* (SEQ ID NO: 65).

[0196] Em algumas modalidades, o termo fator de coagulação ainda inclui homólogos dos fatores de coagulação conhecidos que têm uma atividade coagulante. Em algumas modalidades, homologia de acordo com a presente invenção também inclui variantes de deleções, inserções ou substituição, incluindo uma substituição de aminoácido, do mesmo e fragmentos de polipeptídeo biologicamente ativos do mesmo.

[0197] Em outra modalidade, a invenção inclui homólogos de um fator de coagulação tendo uma atividade coagulante. Em outra modalidade, a invenção inclui homólogos de um fator de coagulação como descrito aqui tendo uma atividade coagulante. Em outra modalidade, homólogos, por exemplo, polipeptídeos que são pelo menos 50%, pelo menos, 55%, pelo menos 60%, pelo menos, 65%, pelo menos 70%, pelo menos, 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 87%, pelo menos 89%, pelo menos de 91%, pelo menos 93%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% homólogos a um fator de coagulação como determinado usando o software de BlastP de National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão.

[0198] Em outra modalidade, a invenção inclui homólogos de furina. Em outra modalidade, homólogos, por exemplo, polipeptídeos que são pelo menos 50%, pelo menos, 55%, pelo menos 60%, pelo menos, 65%, pelo menos 70%, pelo

menos, 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 87%, pelo menos 89%, pelo menos de 91%, pelo menos 93%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% homólogos a uma furina como determinado usando o software de BlastP de National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parâmetros padrão.

[0199] Em uma modalidade, um homólogo de polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui também se refere a uma variante de deleção, inserção ou substituição, incluindo uma substituição de aminoácido da mesma e fragmentos de polipeptídeo biologicamente ativo das mesmas.

[0200] Em outra modalidade, três peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica estão ligados para o C-terminal do peptídeo ou polipeptídeo fornecido aqui. Em outra modalidade, quatro peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica estão ligados para o C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui. Em outra modalidade, cinco peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica estão ligados para o C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui. Em outra modalidade, 1-10 CTP estão ligados ao amino ou C-terminal de polipeptídeo ou fragmento dos mesmos aqui fornecidos. Em outra modalidade, 1-10 CTP estão ligados ao N-terminal de polipeptídeo ou fragmento dos mesmos aqui fornecidos. Em outra modalidade, 1-10 CTP estão ligados ao C-terminal de polipeptídeo ou fragmento dos mesmos aqui fornecidos.

[0201] Deve ser entendido que as composições e os métodos da presente invenção compreendendo os elementos ou etapas conforme descrito aqui podem, em outra modalidade,

consistir nesses elementos ou etapas, ou em outra modalidade, consistir essencialmente nesses elementos ou etapas. Em outra modalidade, o termo “compreende” refere-se à inclusão do agente ativo indicado, como o polipeptídeo modificado com CTP ou fragmento dos mesmos, bem como a inclusão de outros agentes ativos e carreadores, excipientes, emolientes, estabilizadores, etc. farmaceuticamente ou fisiologicamente aceitáveis, como são conhecidos na indústria farmacêutica. Em outra modalidade, o termo “consiste essencialmente em” refere-se a uma composição, cujo único ingrediente ativo é o ingrediente ativo indicado, no entanto, outros compostos podem ser incluídos que são para estabilizar, conservar, etc. a formulação, mas não são envolvidos diretamente no efeito terapêutico do ingrediente ativo indicado. Em outra modalidade, o termo “que consiste essencialmente em” pode se referir aos componentes que facilitam a liberação do ingrediente ativo. Em outra modalidade, o termo “que consiste” se refere a uma composição, que contém o ingrediente ativo e um carreador ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

[0202] Em uma modalidade, os métodos fornecidos aqui compreendem um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo ligado a pelo menos um peptídeo carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) ligados no N- ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[0203] Em outra modalidade, os métodos fornecidos aqui compreendem um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo ligado a 1 a 3 peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) ligados no N- e/ou C-terminal do polipeptídeo ou

fragmento do mesmo. Em outra modalidade, os métodos fornecidos aqui compreendem um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo ligado a 1 a 5 peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) ligados no N- e/ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, os métodos fornecidos aqui compreendem um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo ligado a 1 a 10 peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) ligados no N- e/ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, os métodos fornecidos aqui compreendem um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo ligado a 2 a 3 peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) ligados no N- e/ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, os métodos fornecidos aqui compreendem um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo ligado a 2 a 5 peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) ligados no N- e/ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, os métodos fornecidos aqui compreendem um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo ligado a 2 a 10 peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) ligados no N- e/ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, os métodos fornecidos aqui compreendem um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo ligado a 3 a 5 peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) ligados no N- e/ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, os métodos fornecidos aqui compreendem um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo ligado a 3 a 8 peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) ligados no N- e/ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, os métodos fornecidos aqui

compreendem um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo ligado a 3 a 10 peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) ligados no N- e/ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, os métodos fornecidos aqui compreendem um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo ligado a 6 a 10 peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) ligados no N- e/ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, os métodos fornecidos aqui compreendem um polipeptídeo ou fragmentos do mesmo ligado a 1 peptídeo carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) ligado no N- e/ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmentos do mesmo. Em outra modalidade, os métodos fornecidos aqui compreendem um polipeptídeo ou fragmentos do mesmo ligados a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 peptídeos carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) ligados no N- e/ou C-terminal do polipeptídeo ou fragmentos do mesmo. Em outra modalidade, os peptídeos CTP estão ligados em tandem em ambos os lados (N-terminal ou C-terminal) do polipeptídeo ou fragmentos do mesmo.

[0204] Em uma modalidade, é fornecido aqui um vetor de expressão compreendendo o polinucleotídeo fornecido aqui. Em outra modalidade, é fornecido aqui uma célula compreendendo o vetor de expressão. Em outra modalidade, é fornecida aqui uma composição compreendendo o vetor de expressão.

[0205] Em outra modalidade, a invenção fornece uma composição compreendendo a célula conforme descrito aqui. Em outra modalidade, a célula é uma célula eucariótica. Em outra modalidade, a célula é uma célula procariótica.

[0206] Em uma modalidade, uma sequência CTP na

extremidade C-terminal de um polipeptídeo ou fragmentos dos mesmos fornece proteção potencializada contra degradação do polipeptídeo ou fragmentos do mesmo. Em outra modalidade, uma sequência CTP na extremidade C-terminal de um polipeptídeo ou fragmentos dos mesmos fornece proteção potencializada contra depuração. Em outra modalidade, uma sequência CTP na extremidade C-terminal de um polipeptídeo ou fragmentos dos mesmos fornece tempo de depuração prolongado. Em outra modalidade, uma sequência CTP na extremidade C-terminal do polipeptídeo ou fragmentos do mesmo potencializa sua Cmax. Em outra modalidade, uma sequência CTP na extremidade C-terminal do polipeptídeo ou fragmentos do mesmo potencializa sua Tmax. Em outra modalidade, uma sequência CTP na extremidade C-terminal do polipeptídeo ou fragmentos do mesmo potencializa sua T½. Em outra modalidade, uma sequência CTP na extremidade C-terminal do polipeptídeo ou fragmentos do mesmo prolonga sua AUC.

[0207] Em outra modalidade, um polipeptídeo conjugado ou fragmento do mesmo da invenção é usado da mesma maneira como um polipeptídeo não modificado ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, um polipeptídeo ou fragmento do mesmo da invenção é usado da mesma maneira como um polipeptídeo não modificado ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, um polipeptídeo ou fragmento do mesmo desta invenção têm um tempo de meia-vida de circulação e tempo de residência no plasma aumentado, depuração diminuída, e atividade clínica aumentada *in vivo*. Em outra modalidade, devido às propriedades melhoradas do polipeptídeo ou fragmento do mesmo aqui apresentadas, este

conjugado é administrado menos frequentemente do que o polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[0208] Em outra modalidade, a diminuição da frequência de administração resulta em melhor estratégia de tratamento, que em uma modalidade, leva à melhor adesão do paciente levando para os resultados do tratamento melhorados, bem como a qualidade de vida melhorada do paciente. Em outra modalidade, em relação ao conjugados convencionais, os conjugados fornecidos aqui tendo o volume hidrodinâmico ainda fornecido aqui tem uma maior potência *in vivo*, melhor estabilidade, níveis elevados de AUC, e meia-vida de circulação potencializada.

[0209] Em outra modalidade, a presente invenção ainda fornece uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP compreendendo um peptídeo carbóxi terminal de gonadotrofina (CTPs) glicosilado ligado ao N-terminal e dois CTP glicosilados ligados ao C-terminal do polipeptídeo ou fragmentos dos mesmos.

[0210] Em outra modalidade, deve ser entendido que combinações de CTPs glicosilados e não glicosilados podem ser usadas para modificar os polipeptídeos de interesse ou fragmentos dos mesmos, ainda fornecidos aqui. Essas combinações podem incluir, por exemplo, pelo menos um CTP não glicosilado ligado ao N-terminal do polipeptídeo ou fragmentos do mesmo, e pelo menos um CTP glicosilado ligado ao C-terminal do mesmo e vice-versa. Além disso, e em outra modalidade, combinações de pelo menos um CTP glicosilado e pelo menos um CTP não glicosilado ligado ao mesmo terminal (N- ou C-terminal) são também previstas. Estas combinações também podem incluir truncamentos do CTP glicosilado e/ou

não glicosilado. Essas combinações podem ser determinadas por um especialista na técnica guiado pela invenção aqui fornecida a fim de chegar a um volume hidrodinâmico ideal ou tamanho hidrodinâmico para os polipeptídeos de interesse ou fragmentos do mesmo. Como resultado, os polipeptídeos de interesse ou fragmentos do mesmo tendo um volume hidrodinâmico ideal podem possuir as características ideais desejadas, ou seja, potência melhorada, estabilidade melhorada, níveis elevados de AUC, biodisponibilidade potencializada e meia-vida de circulação potencializada.

[0211] Em uma modalidade, é fornecida aqui uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz do polipeptídeo modificado com CTP de interesse ou fragmento do mesmo fornecido aqui. Em outra modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz de polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos é determinada de acordo com fatores como a condição específica a ser tratada, a condição do paciente a ser tratado, bem como os outros ingredientes na composição. Em outra modalidade, a eficácia terapêutica do polipeptídeo modificado com CTP ou fragmento do mesmo é ajustado de forma ideal adicionando ou removendo peptídeos CTP glicosilados e/ ou não glicosilado para chegar ao volume hidrodinâmico ideal. Deve ser entendido que, ao fazê-lo, um especialista na técnica pode chegar em um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmento do mesmo que possui a eficácia terapêutica ideal.

[0212] Em uma modalidade, o polipeptídeo modificado com CTP ou fragmento do mesmo fornecido aqui tem usos terapêuticos. Em outra modalidade, o polipeptídeo

modificado com CTP ou fragmento do mesmo fornecido aqui tem usos profiláticos.

[0213] Em uma modalidade, os termos "reduzir, redução, reduzindo, etc." quando usados em relação os métodos fornecidos aqui se referem à redução de 100% de um nível previamente medido ou determinado ou de um nível normal. Em outra modalidade, a redução é de 89-99% de um nível previamente determinado. Em outra modalidade, a redução é de 79-88% de um nível previamente determinado. Em outra modalidade, a redução é de 69-78% de um nível previamente determinado. Em outra modalidade, a redução é de 59-68% de um nível previamente determinado. Em outra modalidade, a redução é de 49-58% de um nível previamente determinado. Em outra modalidade, a redução é de 39-48% de um nível previamente determinado. Em outra modalidade, a redução é de 29-38% de um nível previamente determinado. Em outra modalidade, a redução é de 19-28% de um nível previamente determinado. Em outra modalidade, a redução é de 9-18% de um nível previamente determinado. Em outra modalidade, a redução é de 5-8% de um nível previamente determinado. Em outra modalidade, a redução é de 1-4% de um nível previamente determinado.

[0214] Em uma modalidade, promotores específicos de tecido apropriados para uso com a presente invenção incluem sequências que são funcionais em uma ou mais populações de células específicas. Os exemplos incluem, entre outros, os promotores como albumina que é específica de fígado [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], promotores específicos de linfoides [Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]; em particular, promotores de

receptores de células T [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] e imunoglobulinas; [Banerji et al. (1983) Cell 33729-740], promotores específicos de neurônios como promotor de neurofilamento [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477], promotores específicos de pâncreas [Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916] ou promotores específicos de glândula mamária como o promotor do soro do leite (Patente US 4.873.316 e Publicação de Pedido Europeu No. 264.166). Promotores induzíveis apropriados para uso com a presente invenção incluem, por exemplo, o promotor induzível de tetraciclina (Srour, M.A., et al., 2003. Thromb. Haemost. 90: 398-405).

[0215] Em uma modalidade, a frase "uma molécula de polinucleotídeo" se refere a uma sequência de ácido de fita simples ou dupla que é isolada e fornecida sob a forma de uma sequência de RNA, uma sequência de polinucleotídeo complementar (cDNA), uma sequência de polinucleotídeo genômica e/ou uma sequência de polinucleotídeo composta (por exemplo, uma combinação das acima).

[0216] Em uma modalidade, uma "sequência de polinucleotídeo complementar" se refere a uma sequência, que resulta da transcrição reversa do RNA mensageiro usando um transcriptase reversa ou qualquer outra DNA polimerase dependente de RNA. Em uma modalidade, a sequência pode ser posteriormente amplificada *in vivo* ou *in vitro* usando uma DNA polimerase.

[0217] Em uma modalidade, uma "sequência de polinucleotídeo genômica" se refere a uma sequência derivada (isolada) de um cromossomo e, portanto, representa uma parte contígua de um cromossomo.

[0218] Em uma modalidade, uma "sequência de polinucleotídeo composta" se refere a uma sequência, que é pelo menos parcialmente complementar e pelo menos parcialmente genômica. Em uma modalidade, uma sequência composta pode incluir algumas sequências exonais necessárias para codificar o polipeptídeo da presente invenção, bem como algumas sequências intrônicas interpondo entre essas. Em uma modalidade, as sequências intrônicas podem ser de qualquer fonte, incluindo de outros genes, e normalmente inclui sequências sinal de processamento conservado. Em uma modalidade, sequências intrônicas incluem elementos reguladores de expressão agindo de forma cis.

[0219] Em uma modalidade, polinucleotídeos da presente invenção são preparados com técnicas de PCR, ou qualquer outro método ou procedimento conhecido por um especialista na técnica. Em outra modalidade, o procedimento envolve a ligação de duas diferentes sequências de DNA (Ver, por exemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

[0220] Em uma modalidade, polinucleotídeos da presente invenção que codificam os polipeptídeos projetados de interesse ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos são inseridos em vetores de expressão (ou seja, um construto de ácido nucleico) para permitir a expressão do peptídeo/polipeptídeo recombinante. Em uma modalidade, o vetor de expressão da presente invenção inclui sequências adicionais que tornam este vetor apropriado para replicação e integração em procariontes. Em uma modalidade, o vetor de

expressão da presente invenção inclui sequências adicionais que tornam este vetor apropriado para replicação e integração em eucariontes. Em outra modalidade, o vetor de expressão da presente invenção inclui um vetor de transporte que torna este vetor apropriado para replicação e integração em procariontes e eucariontes. Em outra modalidade, vetores de clonagem compreendem sequências de iniciação da transcrição e tradução (por exemplo, promotores, potencializadores) e terminadores de transcrição e tradução (por exemplo, sinais de poliadenilação).

[0221] Em uma modalidade, uma variedade de células procarióticas ou eucarióticas pode ser usada como sistemas expressão de hospedeiro para expressar os polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos. Em outra modalidade, estes incluem, entre outros, micro-organismos, como bactérias transformadas com vetor de expressão de DNA de bacteriófago recombinante, DNA de plasmídeo ou DNA de cosmídeo contendo a sequência codificadora de polipeptídeo; levedura transformada com vetores de expressão de levedura recombinante contendo a sequência codificadora de polipeptídeo; sistemas de células de plantas infectadas com vetores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformados com vetores de expressão de plasmídeo recombinante, como plasmídeo Ti, contendo a sequência codificadora de polipeptídeo.

[0222] Em uma modalidade, sistemas de expressão não bacterianos são utilizados (por exemplo, sistemas de

expressão de mamíferos como células CHO) para expressar o polipeptídeo ou fragmento d mesmo aqui fornecido. Em outra modalidade, o vetor de expressão usado para expressar polinucleotídeos da presente invenção em células de mamíferos é vetor pCI-dhfrr. A construção do vetor pCI-dhfrr é descrita, de acordo com uma modalidade, em Materiais e Métodos de Exemplo abaixo.

[0223] Em uma modalidade, em sistemas bacterianos da presente invenção, um número de vetores da expressão pode ser vantajosamente selecionado dependendo da utilização prevista para o polipeptídeo expresso. Em uma modalidade, grandes quantidades do polipeptídeo são desejadas. Em uma modalidade, vetores que direcionam a expressão de níveis elevados do produto de proteína, possivelmente como uma fusão com uma sequência sinal hidrofóbica, que direciona o produto expresso no periplasma da bactéria ou o meio de cultura onde o produto de proteína é prontamente purificado são desejados. Em uma modalidade, certas proteínas de fusão são projetadas com um sítio de clivagem específico para ajudar na recuperação do polipeptídeo. Em uma modalidade, vetores adaptáveis para essa manipulação incluem, entre outros, a série pET de vetores de expressão de E. coli [Studier et al., Methods in Enzymol. 185:60-89 (1990)].

[0224] Em uma modalidade, sistemas de expressão de levedura são utilizados. Em uma modalidade, um número de vetores contendo promotores constitutivos ou induzíveis pode ser usado em levedura, conforme divulgado em Pedido de Patente US: 5.932.447, que é aqui incorporado como referência em sua totalidade. Em outra modalidade, vetores

que promovem a integração de sequências de DNA estrangeiras para o cromossoma de levedura são usados.

[0225] Em uma modalidade, o vetor de expressão da presente invenção pode ainda incluir sequências de polinucleotídeo adicionais que permitem, por exemplo, a tradução de várias proteínas de um único mRNA como um sítio de entrada de ribossoma interno (IRES) e sequências para integração genômica do polinucleotídeo promotor-quimérico.

[0226] Em uma modalidade, vetores de expressão de mamíferos incluem, entre outros, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que são disponíveis de Invitrogen, pCI que é disponível de Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV e pBK-CMV que são disponíveis de Strategene, pTRES que é disponível de Clontech, e seus derivados.

[0227] Em uma modalidade, vetores de expressão contendo elementos reguladores de vírus eucarióticos como retrovírus são utilizados na presente invenção. Vetores SV40 incluem pSVT7 e pMT2. Em outra modalidade, vetores derivados de vírus do papiloma bovino incluem pBV-1MTHA, e vetores derivados de vírus Epstein Bar incluem pHEBO e p2O5. Outros vetores exemplares incluem pMSG, pAV009/A+, pMTO10/a+, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus e qualquer outro vetor permitindo a expressão de proteínas sob a direção do promotor precoce SV-40, promotor tardio SV-40, promotor de metalotioneína, promotor de vírus do tumor mamário murino, promotor de vírus do sarcoma de Rous, promotor de poliedrina ou outros promotores mostrados eficazes para expressão em células eucarióticas.

[0228] Em uma modalidade, vetores virais recombinantes são úteis para expressão *in vivo* dos peptídeos/polipeptídeos da presente invenção uma vez que oferecem vantagens como infecção lateral e direcionamento de especificidade. Em uma modalidade, infecção lateral é inerente no ciclo de vida de, por exemplo, um retrovírus e é o processo pelo qual uma célula infectada única produz muitos virions descendentes saem fora e infectam as células vizinhas. Em uma modalidade, o resultado é que uma grande área rapidamente se torna infectada, a maioria da qual não foi inicialmente infectada pelas partículas virais originais. Em uma modalidade, vetores virais são produzidos que são incapazes de se espalhar lateralmente. Em uma modalidade, esta característica pode ser útil se o objetivo desejado é introduzir um gene especificado em apenas um número localizado das células alvo.

[0229] Em uma modalidade, vários métodos podem ser usados para introduzir o vetor de expressão da presente invenção em células. Esses métodos são geralmente descritos em Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) e Gilboa et at. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluem, por exemplo, transfecção estável ou transitória, lipofecção, eletroporação e infecção com vetores virais recombinantes.

Além disso, ver Patente US 5.464.764 e 5.487.992, incorporadas aqui como referência, para os métodos de seleção positivo-negativo.

[0230] Em uma modalidade, a introdução de ácidos nucleicos por infecção viral oferece diversas vantagens sobre outros métodos como lipofecção e eletroporação, uma vez que maior eficiência de transfecção pode ser obtida devido à natureza infecciosa do vírus.

[0231] Será apreciado que os polipeptídeos projetados ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui também podem ser expressos de um construto de ácido nucleico administrado ao indivíduo empregando qualquer modo apropriado de administração (por exemplo, administração subcutânea, administração oral, administração intranasal, administração intravenal ou terapia gênica *in vivo*). Em uma modalidade, o construto de ácido nucleico é introduzido em uma célula apropriada através de um veículo/método de liberação de gene apropriado (transfecção, transdução, recombinação homóloga, etc.) e um sistema de expressão conforme necessário e, em seguida, as células modificadas são expandidas em cultura e retornadas ao indivíduo (ou seja, terapia gênica *ex vivo*).

[0232] Em uma modalidade, vetores de expressão de planta são utilizados. Em uma modalidade, a expressão de uma sequência codificadora de polipeptídeo é conduzida por um número de promotores. Em outra modalidade, promotores virais como os promotores 35S RNA do 19S RNA de CaMV [Brisson et al., Nature 310:511-514 (1984)], ou o promotor de proteína de revestimento para TMV [Takamatsu et al., EMBO J. 6:307-311 (1987)] são usados. Em outra modalidade,

os promotores de planta são utilizados como, por exemplo, a subunidade pequena de RUBISCO [Coruzzi et al., EMBO J. 3:1671-1680 (1984); e Brogli et al., Science 224:838-843 (1984)] ou calor promotores de choque de temperatura, por exemplo, hsp17.5-E ou hsp17.3-B de soja [Gurley et al., Mol. Cell. Biol. 6:559-565 (1986)]. Em uma modalidade, construtos são introduzidos em células de planta usando plasmídeo Ti, plasmídeo Ri, vetores virais de planta, transformação do DNA direta, microinjeção, eletroporação e outras técnicas bem conhecidas por especialistas na técnica. Ver, por exemplo, Weissbach & Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463 (1988)]. Outros sistemas de expressão como sistemas de células de hospedeiro de insetos e mamíferos, que são bem conhecidos na técnica, também podem ser usados pela presente invenção.

[0233] Será apreciado que diferente que além de conte os elementos necessários para a transcrição e tradução da sequência codificadora inserida (que codifica o polipeptídeo),o construto de expressão da presente invenção também pode incluir sequências projetadas para otimizar a estabilidade, produção, purificação, rendimento ou atividade do polipeptídeo expresso.

[0234] Em uma modalidade, células transformadas são cultivadas sob condições efetivas, que permitem a expressão de grandes quantidades de peptídeos oxintomodulina projetados recombinantes. Em outra modalidade, as condições de cultura eficaz incluem, entre outras, meio, biorreator, temperatura, pH e condições de oxigênio eficazes que permitem a produção de proteína. Em uma modalidade, um meio

eficaz se refere a qualquer meio em que uma célula é cultivada para produzir o polipeptídeo recombinante da presente invenção. Em outra modalidade, um meio normalmente inclui uma solução aquosa tendo fontes de carbono, nitrogênio e fosfato assimiláveis e sais, minerais, metais e outros nutrientes apropriados, como vitaminas. Células da presente invenção podem ser cultivadas em biorreatores convencionais de fermentação, frascos de agitação, tubos de ensaio, placas de microtitulação e placas de petri. Em outra modalidade, o cultivo é realizado em uma temperatura, pH e conteúdo de oxigênio apropriado para uma célula recombinante. Em outra modalidade, a determinação das condições de cultivo se encontram dentro da experiência de um especialista na técnica.

[0235] Em uma modalidade, dependendo do vetor e sistema de hospedeiro usado para a produção, o polipeptídeo resultante ou fragmento do mesmo ou, em outra modalidade, o polipeptídeo modificado com CTP resultante ou fragmento do mesmo aqui fornecido é expresso dentro de uma célula recombinante para glicosilação do CTP para tomar o lugar, é secretado no meio de fermentação ou é retido na superfície externa de uma célula de mamíferos.

[0236] Em uma modalidade, após um tempo predeterminado em cultura, a recuperação do polipeptídeo recombinante ou fragmento do mesmo é efetuada.

[0237] Em uma modalidade, a frase “recuperando o polipeptídeo projetado recombinante ou fragmentar do mesmo” se refere a coletar o meio de fermentação inteiro contendo o polipeptídeo ou fragmento do mesmo e não implica etapas adicionais de separação ou purificação. Em outra

modalidade, etapas adicionais de separação ou purificação conhecidas na técnica são realizadas a fim de recuperar o polipeptídeo projetado recombinante ou fragmento do mesmo.

[0238] Em uma modalidade, polipeptídeos projetados ou fragmentos dos mesmos ou variantes dos mesmos aqui fornecidos são purificados usando uma variedade de técnicas de purificação de proteína padrão, como, entre outras, cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, filtração, eletroforese, cromatografia de interação hidrofóbica, gel de filtração em cromatografia, cromatografia em fase reversa, cromatografia A Concanavalina, cromatofocagem e solubilização diferencial.

[0239] Para facilitar a recuperação, a sequência codificadora expressa pode ser projetada para codificar o polipeptídeo ou fragmento do mesmo aqui fornecido e fundida à fração clivável. Além disso, uma proteína de fusão pode ser projetada de modo que o polipeptídeo possa ser facilmente isolado por cromatografia de afinidade; por exemplo, por imobilização em uma coluna específica para a fração clivável. Um sítio de clivagem é projetado entre os polipeptídeos projetados ou fragmentos dos mesmos e a fração clivável e o polipeptídeo podem ser liberados da coluna cromatográfica por tratamento com uma enzima ou agente apropriado que especificamente cliva a proteína de fusão neste sítio [por exemplo, ver Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); e Gardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)].

[0240] Em uma modalidade, o peptídeo ou polipeptídeo projetado aqui fornecido é obtido na forma “substancialmente pura”.

[0241] Em uma modalidade, a frase "substancialmente pura" refere-se a um grau de pureza que permite a utilização eficaz da proteína nas aplicações descritas aqui.

[0242] O polipeptídeo projetado ou fragmento do mesmo aqui fornecido também pode ser sintetizado usando sistemas de expressão *in vitro*. Em outra modalidade, métodos de síntese *in vitro* são bem conhecidos na técnica e os componentes do sistema estão disponíveis comercialmente.

[0243] Em uma modalidade, os polipeptídeos projetados recombinantes ou fragmentos dos mesmos são sintetizados e purificados; seu efeito terapêutico pode ser analisado *in vivo* ou *in vitro*. As atividades de ligação dos polipeptídeos projetados recombinantes ou fragmentos dos mesmos da presente invenção podem ser verificadas usando vários ensaios como conhecidos por um especialista na técnica.

[0244] Em outra modalidade, os polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos da presente invenção podem ser fornecidos ao indivíduo em si. Em uma modalidade, os polipeptídeos projetados ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos podem ser fornecidos para o indivíduo como parte de uma composição farmacêutica onde é misturado com um carreador farmaceuticamente aceitável.

[0245] Em outra modalidade, uma "composição farmacêutica" refere-se a uma preparação de um ou mais dos ingredientes ativos descritos com outros componentes químicos como carreadores e excipientes fisiologicamente apropriados. O propósito de uma composição farmacêutica é facilitar a administração de um composto para um organismo.

[0246] Em outra modalidade, “ingrediente ativo” refere-se à sequência de polipeptídeo de interesse, que é responsável pelo efeito biológico.

[0247] Em outra modalidade, as frases “carreador fisiologicamente aceitável” e “carreador farmaceuticamente aceitável” que são usadas de modo intercambiável aqui se referem a um carreador ou um diluente que não causa irritação significativa para um organismo e não revoga a atividade biológica e propriedades do composto administrado. Um adjuvante está incluído com estas frases. Em uma modalidade, um dos ingredientes incluídos no carreador farmaceuticamente aceitável pode ser, por exemplo, polietileno glicol (PEG, um polímero biocompatível com uma ampla gama de solubilidade em meios aquosos e orgânicos (Mutter et al. (1979)).

[0248] Em outra modalidade, o termo “excipiente” refere-se a uma substância inerte adicionada a uma composição farmacêutica para facilitar ainda mais a administração de um ingrediente ativo. Em uma modalidade, excipientes incluem carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, diversos açúcares e tipos de amido, derivados de celulose, gelatina, óleos vegetais e polietileno glicóis.

[0249] Técnicas para a formulação e administração de drogas são encontradas em “Remington’s Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, PA, última edição, que está incorporada aqui como referência.

[0250] Várias modalidades de intervalos de dosagem são contempladas por esta invenção. A dosagem do polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo aqui fornecidos, em uma modalidade, está no intervalo de 0,005-

100 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,005-5 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,01-50 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,005-5 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,1-10 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,01-5 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,001-0,01 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,001-0,1 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,1-5 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,5-50 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,2-15 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,8-65 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 1-50 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 5-10 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 8-15 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 10-20 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 20-40 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 60-120 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 12-40 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 40-60 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 50-100mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 1-60 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 15-25 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 5-10 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 55-65 mg/dia.

[0251] Em outra modalidade, a dosagem está em um

intervalo de 50-500 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 50-150 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 100-200 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 150-250 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 200-300 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 250-400 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 300-500 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 350-500 mg/dia.

[0252] Em uma modalidade, a dosagem é 20 mg/dia. Em uma modalidade, a dosagem é 30 mg/dia. Em uma modalidade, a dosagem é 40 mg/dia. Em uma modalidade, a dosagem é 50 mg/dia. Em uma modalidade, a dosagem é 0,01 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem é 0,1 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem é 1 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem é 0,530 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem é 0,05 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem é 50 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem é 10 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem é 20-70 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem é 5 mg/dia.

[0253] Em uma modalidade, a dosagem dos polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos é 1-5 mg/dia. Em uma modalidade, a dosagem dos polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos é 1-3 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem dos polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos é 2 mg/dia.

[0254] Em outra modalidade, a dosagem é 1-90 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem é 1-90 mg/2 dias. Em

outra modalidade, a dosagem é 1-90 mg/3 dias. Em outra modalidade, a dosagem é 1-90 mg/4 dias. Em outra modalidade, a dosagem é 1-90 mg/5 dias. Em outra modalidade, a dosagem é 1-90 mg/6 dias. Em outra modalidade, a dosagem é 1-90 mg/semana. Em outra modalidade, a dosagem é 1-90 mg/9 dias. Em outra modalidade, a dosagem é 1-90 mg/11 dias. Em outra modalidade, a dosagem é 1-90 mg/14 dias.

[0255] Em outra modalidade, a dosagem do polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos dos mesmos é 10-50 mg/dia. Em outra modalidade, a dosagem é 10-50 mg/2 dias. Em outra modalidade, a dosagem é 10-50 mg/3 dias. Em outra modalidade, a dosagem é 10-50 mg/4 dias. Em outra modalidade, a dosagem é 10-50 microgramas mg/5 dias. Em outra modalidade, a dosagem é 10-50 mg/6 dias. Em outra modalidade, a dosagem é 10-50 mg/semana. Em outra modalidade, a dosagem é 10-50 mg/9 dias. Em outra modalidade, a dosagem é 10-50 mg/11 dias. Em outra modalidade, a dosagem é 10-50 mg/14 dias.

[0256] Em outra modalidade, as doses podem ser administradas como mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, dosagem do polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui, em uma modalidade, está no intervalo de 0,005-100 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,005-5 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,01-50 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,1-20 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,1-10 mg/kg ou unidades/kg. Em outra

modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,01-5 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,001-0,01 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,001-0,1 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,1-5 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,5-50 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,2-15 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 0,8-65 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 1-50 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 5-10 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 8-15 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 10-20 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 20-40 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 60-120 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 12-40 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 40-60 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 50-100mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está em um intervalo de 1-60 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 15-25 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 5-10 mg/kg ou unidades/kg. Em outra modalidade, a dosagem está no intervalo de 55-65 mg/kg ou unidades/kg.

[0257] Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui e pelo menos uma unidade do CTP é formulado em uma forma farmacêutica intranasal. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui e pelo menos uma unidade do CTP é formulado em uma forma farmacêutica injetável. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado ao sujeito em uma dose variando de 0,0001 mg a 0,6 mg. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado ao sujeito em uma dose variando de 0,001 mg a 0,005 mg. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado ao sujeito em uma dose variando de 0,005 mg a 0,01 mg. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado ao sujeito em uma dose variando de 0,01 mg a 0,3 mg. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado ao sujeito em uma dose variando de 0,2 mg a 0,6 mg. Em outra modalidade, o polipeptídeo ou fragmentos do mesmo fornecido aqui é livre de CTPs no seu amino terminal.

[0258] Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido

aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado ao sujeito em uma dose variando de 0,2 mg a 2 mg. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado ao sujeito em uma dose variando de 2 mg a 6 mg. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado ao sujeito em uma dose variando de 4 mg a 10 mg. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado ao sujeito em uma dose variando de 5 mg e 15 mg.

[0259] Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado ao sujeito em uma dose variando de 0,2 mg a 2 mg. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado ao sujeito em uma dose variando de 2 mg a 6 mg. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado ao sujeito em uma dose variando de 4 mg a 10 mg. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado ao sujeito em uma dose variando de 5 mg e 15 mg.

[0260] Em outra modalidade, a dosagem de polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos

fornecidos aqui é tal que contém 65% da quantidade do agonista em relação ao administrado usando os polipeptídeos não modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos. Em outra modalidade, a dosagem de polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui é tal que contém 55% da quantidade do agonista em relação ao administrado usando os polipeptídeos não modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos. Em outra modalidade, a dosagem de polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui é tal que contém 45% da quantidade do agonista em relação ao administrado usando os polipeptídeos não modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos. Em outra modalidade, a dosagem de polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui é tal que contém 10% da quantidade do agonista em relação ao administrado usando os polipeptídeos não modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos. Em outra modalidade, a dosagem de polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui é tal que contém 25% da quantidade do agonista em relação ao administrado usando os polipeptídeos não modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos. Em outra modalidade, a dosagem de polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui é tal que contém 35% da quantidade do agonista em relação ao administrado usando os polipeptídeos não modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos. Em outra modalidade, a dosagem de polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui é tal que contém 75% da quantidade do agonista em relação ao administrado usando os polipeptídeos não modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos. Em outra

modalidade, a dosagem de polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos fornecidos aqui é tal que contém 100% da quantidade do agonista em relação ao administrado usando o agonista não modificado com CTP. No entanto, mesmo se a dose contém a mesma quantidade de agonista de polipeptídeos CTP não modificados ou fragmentos do mesmo, ainda é vantajoso para sujeitos em que será administrado menos frequentemente por causa de sua meia-vida aumentada em comparação ao agonista normal.

[0261] Em outra modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo conjugado ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos é entre 50-500 UI por kg de peso corporal administrada uma vez ao dia. Em outra modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo conjugado ou fragmento dos mesmos é 150-250 UI por kg de peso corporal, administrada uma vez ao dia. Em outra modalidade, uma composição farmacêutica, compreendendo um polipeptídeo conjugado ou fragmento do mesmo é formulada em uma força eficaz para administração por diversos meios para um paciente humano.

[0262] Em uma modalidade, o polipeptídeo modificado com CTP compreendendo polipeptídeos ou fragmentos do mesmo aqui fornecidos é administrado em uma quantidade eficaz para trazer a atividade de polipeptídeos circulantes ou fragmentos dos mesmos para 20-30 IU/dL em um sujeito. Em outra modalidade, o polipeptídeo modificado com CTP compreendendo polipeptídeos ou fragmentos do mesmo aqui fornecidos é administrado em uma quantidade eficaz para trazer a atividade de polipeptídeos circulantes ou fragmentos dos mesmos para 25-50 IU/dL em um sujeito. Em

outra modalidade, o polipeptídeo modificado com CTP compreendendo polipeptídeos ou fragmentos do mesmo aqui fornecidos é administrado em uma quantidade eficaz para trazer a atividade de polipeptídeos circulantes ou fragmentos dos mesmos para 50-100 IU/dL em um sujeito. Em outra modalidade, o polipeptídeo modificado com CTP compreendendo polipeptídeos ou fragmentos do mesmo aqui fornecidos é administrado em uma quantidade eficaz para trazer a atividade de polipeptídeos circulantes ou fragmentos dos mesmos para 100-200 IU/dL em um sujeito. Em outra modalidade, o polipeptídeo modificado com CTP compreendendo polipeptídeos ou fragmentos do mesmo aqui fornecidos é administrado em uma quantidade eficaz para trazer a atividade de polipeptídeos circulantes ou fragmentos dos mesmos para 10-50 IU/dL em um sujeito. Em outra modalidade, o polipeptídeo modificado com CTP compreendendo polipeptídeos ou fragmentos do mesmo aqui fornecidos é administrado em uma quantidade eficaz para trazer a atividade de polipeptídeos circulantes ou fragmentos dos mesmos para 20-100 IU/dL em um sujeito.

[0263] Em uma modalidade, os polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos são administrados a um sujeito em uma base semanal. Em outra modalidade, os polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos são administrados a um sujeito duas vezes por semana. Em outra modalidade, os polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos são administrados a um sujeito de forma quinzenal (uma vez a cada duas semanas). Em outra modalidade, os polipeptídeos modificados

com CTP ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos são administrados a um sujeito duas vezes por mês. Em outra modalidade, os polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos são administrados a um sujeito uma vez por mês. Em outra modalidade, os polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos são administrados a um sujeito diariamente. Em outra modalidade, os polipeptídeos modificados com CTP ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos são administrados a um sujeito a cada dois dias. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado para um sujeito uma vez a cada três dias.

[0264] Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo um polipeptídeo ou fragmento do mesmo e pelo menos uma unidade do CTP é administrado para um sujeito uma vez a cada quatro dias. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado para um sujeito uma vez a cada cinco dias. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado para um sujeito uma vez a cada seis dias. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado para um sujeito uma vez a cada 7-14 dias. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado para um sujeito uma vez a cada 10-20 dias. Em

outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado para um sujeito uma vez a cada 5-15 dias. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é administrado para um sujeito uma vez a cada 15-30 dias.

[0265] Em outra modalidade, os métodos da invenção incluem aumentar a conformidade dos pacientes aflitos com doenças crônicas que necessitam de um polipeptídeo ou fragmentos dos mesmos em terapia fornecida aqui. Em outra modalidade, aumentando o tamanho hidrodinâmico de um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmento do mesmo por um fator fornecido aqui. Em outra modalidade, os métodos da invenção permitem a redução da frequência de dosagem do polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[0266] Em outra modalidade, o termo conformidade compreende adesão. Em outra modalidade, os métodos da invenção incluem aumentar a conformidade de pacientes que necessitam de uma terapia aumentando o tamanho hidrodinâmico de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator ou incremento aqui fornecido que resulta em reduzir a frequência de administração do polipeptídeo ou fragmento do mesmo. Em outra modalidade, a redução da frequência de administração do polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui é conseguida devido às modificações do CTP e um subsequente aumento de tamanho hidrodinâmico em um fator ou incremento fornecido aqui, que torna o polipeptídeo ou fragmentos do mesmo mais estável. Em outra modalidade, a redução da frequência de administração do

polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui é conseguida devido às modificações do CTP e um subsequente aumento de tamanho hidrodinâmico em um fator ou incremento fornecido aqui, que aumenta a meia-vida (T1/2) do polipeptídeo ou fragmentos do mesmo. Em outra modalidade, a redução da frequência de administração do polipeptídeo ou fragmentos do mesmo aqui fornecido é conseguida aumentando o tamanho hidrodinâmico de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator ou incremento fornecido aqui que resulta no aumento do tempo de depuração u reduzindo a taxa de depuração do polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui.

[0267] Em outra modalidade, a redução da frequência de administração do polipeptídeo ou fragmentos do mesmo aqui fornecido é conseguida aumentando o tamanho hidrodinâmico de um polipeptídeo ou fragmento do mesmo por um fator ou incremento fornecido aqui que resulta no aumento da medição de AUC do polipeptídeo ou fragmento do mesmo.

[0268] A administração oral, em uma modalidade, compreende uma forma farmacêutica compreendendo comprimidos, cápsulas, pastilhas, comprimidos mastigáveis, suspensões, emulsões e afins. Essas formas farmacêuticas compreendem uma quantidade segura e eficaz dos polipeptídeos desejados ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos, cada um dos quais está em uma modalidade, de cerca de 0,7 ou 3,5 mg a cerca de 280 mg/70 kg, ou em outra modalidade, cerca de 0,5 ou 10 mg a cerca de 210 mg/70 kg. Os carreadores farmaceuticamente aceitáveis apropriados para a preparação de formas farmacêuticas de unidade para

administração por via oral são conhecidas na técnica. Em outra modalidade, comprimidos normalmente compreendem adjuvantes farmaceuticamente compatíveis convencionais como diluentes inertes, como carbonato de cálcio, carbonato de sódio, manitol, lactose e celulose; aglutinantes como amido, gelatina e sacarose; desintegrantes como amido, ácido algínico e croscarmelose; lubrificantes como estearato de magnésio, ácido esteárico e talco. Em uma modalidade, glidantes como o dióxido de silício pode ser usado para melhorar as características de fluxo da mistura em pó. Em uma modalidade, agentes corantes, como corantes FD & C, podem ser adicionados para aparência. Edulcorantes e agentes flavorizantes, como aspartame, sacarina, mentol, hortelã-pimenta e sabores de frutas, são adjuvantes úteis para comprimidos mastigáveis. Cápsulas normalmente compreendem um ou mais diluentes sólidos divulgados acima. Em outra modalidade, a seleção de componentes de carreador depende de considerações secundárias como gosto, custo e estabilidade de prateleira, que não são críticos para efeitos da presente invenção, e pode ser facilmente feita por um especialista.

[0269] Em uma modalidade, a forma farmacêutica oral compreende perfil de liberação predefinido. Em uma modalidade, a forma farmacêutica oral da presente invenção compreende comprimidos, cápsulas, pastilhas ou comprimidos mastigáveis de liberação prolongada. Em uma modalidade, a forma farmacêutica oral da presente invenção compreende comprimidos, cápsulas, pastilhas ou comprimidos mastigáveis de liberação lenta. Em uma modalidade, a forma farmacêutica oral da presente invenção compreende comprimidos, cápsulas,

pastilhas ou comprimidos mastigáveis de liberação imediata. Em uma modalidade, a forma farmacêutica oral é formulada de acordo com o perfil de liberação desejado do ingrediente farmacêutico ativo como conhecido por um especialista na técnica.

[0270] Composições para via oral, em outra modalidade, compreendem soluções líquidas, emulsões, suspensões e afins. Em outra modalidade, os carreadores farmaceuticamente aceitáveis apropriados para preparação dessas composições são bem conhecidas na técnica. Em outra modalidade, composições orais líquidas compreendem de cerca de 0,001% a cerca de 0.,33% do composto ou compostos desejados, ou em outra modalidade, de cerca de 0,01% a cerca de 10%.

[0271] Em uma modalidade, composições para uso nos métodos desta invenção compreendem soluções ou emulsões, que, em outra modalidade, são soluções aquosas ou emulsões que compreendem uma quantidade segura e eficaz dos compostos da presente invenção e, opcionalmente, outros compostos, destinados para administração intranasal tópica. Em outra modalidade, as composições compreendem de cerca de 0,001% a cerca de 10,0% p/v de um composto, mais preferencialmente de cerca de 0,01% a cerca de 2,0, que é usado para liberação sistêmica dos compostos pela via intranasal.

[0272] Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo um polipeptídeo ou fragmento do mesmo e pelo menos uma unidade do CTP é injetado no músculo (injeção intramuscular). Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo um polipeptídeo ou fragmento do mesmo e pelo

menos uma unidade do CTP é injetado abaixo da pele (injeção subcutânea). Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é injetado no músculo. Em outra modalidade, um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui e pelo menos uma unidade do CTP é injetado na pele. Em outra modalidade, um polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui conforme descrito aqui é administrado através de administração sistêmica. Em outra modalidade, um polipeptídeo ou fragmento do mesmo fornecido aqui conforme descrito aqui é administrado através de injeção intravenosa. Em outra modalidade, a administração pode ser parenteral, pulmonar, oral, tópica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intranasal, transnasal, intraocular, oftálmica, peridural, bucal, retal, transmucosa, liberação intestinal ou parenteral, incluindo injeções intramedulares, bem como administração intratecal ou intraventricular direta.

[0273] Em outra modalidade, a preparação é administrada de forma local, ao invés de sistêmica, por exemplo, através da injeção da preparação diretamente em uma região específica do organismo do paciente.

[0274] Em uma modalidade, a via de administração pode ser enteral. Em outra modalidade, a via pode ser conjuntival, transdérmica, intradérmica, intra-arterial, vaginal, retal, intratumoral, parcanceral, transmucosa, intramuscular, intravascular, intraventricular, intracraniana, intranasal, sublingual ou uma combinação das mesmas.

[0275] Em outra modalidade, as composições farmacêuticas são administradas por injeção intravenosa, intra-arterial, ou intramuscular de uma preparação líquida. Em outra modalidade, formulações líquidas incluem soluções, suspensões, dispersões, emulsões, óleos e afins. Em uma modalidade, as composições farmacêuticas são administradas por via intravenosa, e, portanto, são formuladas em uma forma apropriada para administração intravenosa. Em outra modalidade, as composições farmacêuticas são administradas por via intra-arterial, e, portanto, são formuladas em uma forma apropriada para administração intra-arterial. Em outra modalidade, as composições farmacêuticas são administradas por via intramuscular, e, portanto, são formuladas em uma forma apropriada para administração intramuscular.

[0276] Além disso, e em outra modalidade, as composições farmacêuticas são administradas por via tópica para superfícies corporais, e, portanto, são formuladas em uma forma apropriada para administração tópica. Formulações tópicas apropriadas incluem géis, pomadas, cremes, loções, gotas e afins. Para administração tópica, os compostos da presente invenção são combinados com um agente ou agentes terapêuticos apropriados adicionais, preparados e aplicados como soluções, suspensões ou emulsões em um diluente fisiologicamente aceitável com ou sem um carreador farmacêutico.

[0277] Em uma modalidade, composições farmacêuticas da presente invenção são fabricadas por processos bem conhecidos na técnica, por exemplo, por meio de processos de mistura, dissolução, granulação, preparação de drágea,

levigação, emulsão, encapsulamento, aprisionamento ou liofilização convencionais.

[0278] Em uma modalidade, composições farmacêuticas para uso em conformidade com a presente invenção são formuladas de forma convencional usando um ou mais carreadores fisiologicamente aceitáveis compreendendo excipientes e auxiliares, que facilitam a transformação dos ingredientes ativos em preparações que, podem ser utilizadas farmaceuticamente. Em uma modalidade, a formulação é dependente da via de administração escolhida.

[0279] Em uma modalidade, injetáveis da invenção são formulados em soluções aquosas. Em uma modalidade, injetáveis da invenção são formulados em tampões fisiologicamente compatíveis como solução de Hank, solução de Ringer ou tampão de sal fisiológico. Em outra modalidade, para administração transmucosa, penetrantes apropriados para a barreira a serem permeadas são utilizados na formulação. Esses penetrantes são geralmente conhecidos na técnica.

[0280] Em uma modalidade, as preparações aqui descritas são formulados para administração parenteral, por exemplo, por injeção em bolus ou infusão contínua. Em outra modalidade, formulações para injeção são apresentadas na forma farmacêutica de unidade, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de doses múltiplas com conservante adicionado opcionalmente. Em outra modalidade, as composições são suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e contêm agentes de formulação como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão.

[0281] As composições também compreendem, em outra

modalidade, conservantes, como cloreto de benzalcônio e timerosal e afins; agentes quelantes, como edetato de sódio e outros; tampões como fosfato, citrato e acetato; agentes de tonicidade, como cloreto de sódio, cloreto de potássio, glicerina, manitol e outros; antioxidantes como o ácido ascórbico, acetilcisteína, metabissulfito de sódio e outros; agentes aromáticos; ajustadores de viscosidade, como polímeros, incluindo celulose e derivados dos mesmos; e álcool polivinílico e ácido e bases para ajustar o pH dessas composições aquosas conforme necessário. As composições também compreendem, em outra modalidade, anestésicos locais ou outros ativos. As composições podem ser usadas como sprays, névoas, gotas e afins.

[0282] Em uma modalidade, composições farmacêuticas para administração parenteral incluem soluções aquosas de preparação ativa na forma solúvel em água. Além disso, as suspensões dos ingredientes ativos podem ser preparadas como óleo apropriado ou suspensões de injeção com base de água. Solventes lipofílicos apropriados ou veículos incluem, em outra modalidade, óleos graxos como o óleo de gergelim, ou ésteres de ácidos graxos sintéticos como oleato de etil, triglicerídeos ou lipossomas. Suspensões de injeção aquosas contêm, em outra modalidade, substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, como carboximetil celulose de sódio, sorbitol ou dextrano. Em outra modalidade, a suspensão também contém estabilizadores apropriados ou agentes que aumentam a solubilidade dos ingredientes ativos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

[0283] Em outra modalidade, o composto ativo pode

ser liberado em uma vesícula, em particular um lipossoma (ver Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez- Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327; J. E. Diederichs and al., Pharm./nd. 56 (1994) 267- 275).

[0284] Em outra modalidade, a composição farmacêutica liberada em um sistema de liberação controlada é formulada para infusão intravenosa, bomba osmótica implantável, adesivo transdérmico, lipossomas ou outros modos de administração. Em uma modalidade, uma bomba é usada (ver Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989). Em outra modalidade, materiais poliméricos podem ser usados. Ainda em outra modalidade, um sistema de liberação controlada pode ser colocado na proximidade do alvo terapêutico, ou seja, o cérebro, exigindo apenas uma fração da dose sistêmica (ver, por exemplo, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984). Outros sistemas de liberação controlada são discutidos na revisão por Langer (Science 249:1527-1533 (1990).

[0285] Em outra modalidade, o ingrediente ativo é em forma de pó para constituição com um veículo apropriado, para, por exemplo, solução baseado em água estéril, apirógena, antes do uso. As composições são formuladas, em outra modalidade, para atomização administração de inalação. Em outra modalidade, composições estão contidas em um recipiente com meio de atomização anexado.

[0286] Em uma modalidade, a preparação da presente invenção é formulada em composições retais como supositórios ou enemas de retenção, utilizando, por exemplo, bases de supositório convencionais como manteiga de cacau ou outros glicerídeos.

[0287] Em uma modalidade, composições farmacêuticas apropriadas para o uso no contexto da presente invenção incluem composições em que os ingredientes ativos estão contidos em uma quantidade efetiva para atingir sua finalidade. Em outra modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz significa uma quantidade de ingredientes ativos eficazes para prevenir, aliviar ou amenizar os sintomas da doença ou prolongar a sobrevivência do sujeito sendo tratado.

[0288] Em uma modalidade, a determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz está dentro da capacidade dos especialistas na técnica.

[0289] Alguns exemplos de substâncias que podem servir como carreadores farmaceuticamente aceitáveis ou componentes dos mesmos são açúcares, como glicose, lactose e sacarose; amidos, como o amido de milho e amido de batata; celulose e seus derivados, como carboximetilcelulose de sódio, etilcelulose e metil celulose; tragacanto em pó; malte; gelatina; talco; lubrificantes sólidos, como o ácido esteárico e estearato de magnésio; sulfato de cálcio; óleos vegetais, como óleo de amendoim, óleo de girassol, óleo de gergelim, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de teobroma; polióis como propileno glicol, glicerina, sorbitol, manitol e polietileno glicol; ácido algínico; emulsionantes, como os

emulsificantes de marca Tween™; agentes umectantes, como lauril sulfato de sódio; agentes de coloração; agentes aromatizantes; agentes de compressão, estabilizadores; antioxidantes; conservantes; água livre de pirogênio; solução salina isotônica; e soluções de tampão de fosfato. A escolha de um carreador farmaceuticamente aceitável para ser usado em conjunto com o composto é basicamente determinada pela maneira que o composto é administrado. Se o composto deve ser injetado, em uma modalidade, o carreador farmaceuticamente aceitável é solução salina fisiológica estéril, com um agente de suspensão compatível com o sangue, o pH é ajustado para cerca de 7,4.

[0290] Além disso, as composições ainda compreendem aglutinantes (por exemplo, acácia, amido de milho, gelatina, carbômer, etilcelulose, goma guar, hidroxipropil celulose, hidroxipropil metil celulose, povidona), agentes desintegrantes (por exemplo, amido de milho, amido de batata, ácido algínico, dióxido de silício, sódio de croscarmelose, crospovidona, goma de guar, amido glicolato de sódio), tampões (por exemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato) de diferentes pH e força iônica, aditivos como albumina ou gelatina para evitar a absorção para superfícies, detergentes (por exemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sais de ácidos biliares), inibidores da protease, surfactantes (por exemplo, lauril sulfato de sódio) e potencializadores de permeação, agentes solubilizantes (por exemplo, glicerol, glicerol de polietileno), antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico, metabissulfito de sódio, butil-hidroxianisol), estabilizadores (por exemplo, hidroxipropil celulose,

hidroxipropilmetil celulose), agentes de aumento de viscosidade (por exemplo, carbômer, dióxido de silício coloidal, etilcelulose, goma de guar), adoçantes (aspartame, ácido cítrico), conservantes (por exemplo, timerosal, álcool benzílico parabenos), lubrificantes (por exemplo, ácido esteárico, estearato de magnésio, polietilenoglicol, lauril sulfato de sódio), auxiliares de fluxo (por exemplo, dióxido de silício coloidal), plastificantes (por exemplo, dietilftalato, trietil citrato), emulsificantes (por exemplo, carbômer, hidroxipropil celulose, lauril sulfato de sódio), revestimentos de polímero (por exemplo, poloxâmero ou poloxaminas), agentes de formação de filme e revestimento (por exemplo, etilcelulose, acrilatos, polimetacrilatos) e/ou adjuvantes.

[0291] Componentes típicos de carreadores para xaropes, elixires, emulsões e suspensões incluem etanol, glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol, sacarose líquida, sorbitol e água. Para uma suspensão, agentes de suspensão típicos incluem metil celulose, carboximetilcelulose de sódio, celulose (por exemplo, Avicel™, RC-591), tragacante e alginato de sódio; agentes umectantes típicos incluem lecitina e sorbitano de óxido de polietileno (por exemplo, polissorbato 80). Conservantes típicos incluem metil parabeno e benzoato de sódio. Em outra modalidade, composições líquidas para via oral também contêm um ou mais componentes como adoçantes, agentes aromatizantes e corantes divulgados acima.

[0292] As composições também incluem incorporação do material ativo no interior ou em preparações de

partículas de compostos poliméricos como o ácido polilático, ácido poliglicólico, hidrogel, etc ou em lipossomas, microemulsões, micelas, vesículas unilamelar ou multilamelar, fantasmas de eritrócitos ou esferoplastos.) Essas composições irão influenciar o estado físico, solubilidade, estabilidade, taxa de liberação *in vivo* e a taxa de liberação *in vivo*.

[0293] Também são compreendidas pela invenção composições de partículas revestidas com polímeros (por exemplo, poloxâmeros ou poloxaminas) e o composto acoplado com anticorpos direcionados contra os receptores específicos de tecido, ligantes ou antígenos ou acoplado aos ligantes de receptores específicos de tecido.

[0294] Em uma modalidade, compostos modificados pela ligação covalente de polímeros solúveis em água como o polietileno glicol, copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol, carboximetil celulose, dextrano, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona ou poliprolina. Em outra modalidade, os compostos modificados apresentam meias-vidas consideravelmente maiores no sangue após a injeção intravenosa do que os compostos correspondentes não modificados. Em uma modalidade, modificações também aumentam a solubilidade do composto em solução aquosa, eliminam a agregação, potencializam a estabilidade física e química do composto, e reduzem grandemente a imunogenicidade e a reatividade do composto. Em outra modalidade, a atividade biológica *in vivo* desejada é alcançada pela administração desses compostos polímeros que abduzem com menos frequência ou em doses mais baixas do que com o composto não modificado.

[0295] A preparação da quantidade ou dose efetiva pode ser estimada inicialmente de ensaios *in vitro*. Em uma modalidade, uma dose pode ser formulada em modelos animais e essas informações podem ser usadas para determinar com mais precisão doses úteis em humanos.

[0296] Em uma modalidade, toxicidade e eficácia terapêutica dos ingredientes ativos descritos aqui podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão *in vitro*, em culturas de células ou animais experimentais. Em uma modalidade, os dados obtidos desses ensaios *in vitro* e de cultura de células e estudos em animais podem ser usados na formulação de uma faixa de dosagem para uso em seres humanos. Em uma modalidade, as dosagens podem variar dependendo da forma farmacêutica empregada e a via de administração utilizada. Em uma modalidade, a composição exata, via de administração e dosagem pode ser escolhida pelo médico individual tendo em conta as condições do paciente. [Ver, por exemplo, Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1].

[0297] Em uma modalidade, dependendo da gravidade e da capacidade de resposta da condição a ser tratada, a dosagem pode ser de uma única ou uma pluralidade de administrações, com curso de tratamento durando vários dias a várias semanas ou até a cura ser realizada ou diminuição do estado de doença ser alcançada.

[0298] Em uma modalidade, a quantidade de uma composição para ser administrada, claro, será dependente do sujeito a ser tratado, a gravidade da aflição, a forma de administração, o julgamento do médico que prescreve, etc.

[0299] Em uma modalidade, composições, incluindo a

preparação da presente invenção formulada em um carreador farmacêutica compatível são também preparadas, colocadas em um recipiente apropriado, e rotuladas para tratamento de uma condição indicada.

[0300] Em outra modalidade, um polipeptídeo ou fragmento do mesmo ou uma forma variante (modificada com CTP) do mesmo, conforme descrito aqui, é preparação liofilizada em combinação com excipientes orgânicos complexos e estabilizadores como agentes ativos de superfície não iônicos (ou seja, surfactantes), diversos açúcares, polióis orgânicos e/ou albumina de soro humano. Em outra modalidade, uma composição farmacêutica compreende um polipeptídeo liofilizado ou fragmento do mesmo aqui fornecido, preparado em água estéril para injeção. Em outra modalidade, uma composição farmacêutica compreende um polipeptídeo liofilizado ou fragmento do mesmo aqui fornecido, preparado em PBS estéril para injeção. Em outra modalidade, uma composição farmacêutica compreende um polipeptídeo liofilizado ou fragmento do mesmo aqui fornecido, preparado em 0,9% NaCl estéril para injeção.

[0301] Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreende um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmento do mesmo, conforme descrito aqui e carreadores complexos como albumina, polióis, açúcares, e agentes estabilizantes de superfície aniônicos. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreende um polipeptídeo com CTP ou fragmento do mesmo e ácido lactobiônico e um tampão de acetato/glicina. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreende um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmento do mesmo

conforme descrito aqui e aminoácidos, como arginina ou glutamato que aumentam a solubilidade de composições de interferon em água. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreende um polipeptídeo liofilizado modificado com CTP ou fragmentos do mesmo conforme descrito aqui e glicina ou albumina de soro humano (HSA), um tampão (por exemplo, acetato) e um agente isotônico (NaCl, por exemplo). Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreende um polipeptídeo liofilizado modificado com CTP ou fragmentos do mesmo, conforme descrito aqui e tampão de fosfato, glicina e HSA.

[0302] Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo, como descrito aqui é estabilizado quando colocado em soluções de tampão tendo pH entre cerca de 4 e 7,2. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo está em uma solução tamponada tendo um pH entre cerca de 4 e 8,5. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo está em uma solução tamponada tendo um pH entre cerca de 6 e 7. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo está em uma solução tamponada tendo um pH de cerca de 6,5. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmos como descrito aqui é estabilizada com um aminoácido como agente estabilizante e em alguns casos um sal (se o aminoácido não contém uma cadeia lateral

carregada).

[0303] Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo como descrito aqui é uma composição líquida compreendendo um agente estabilizante em entre cerca de 0,3% e 5% em peso de aminoácido.

[0304] Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo como descrito aqui fornece precisão de doseamento e segurança de produto. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo como descrito aqui fornece uma formulação líquida biologicamente ativa para uso em aplicações injetáveis. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreende um polipeptídeo não liofilizado modificado com CTP ou fragmentos do mesmo conforme descrito aqui.

[0305] Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo como descrito aqui fornece uma formulação líquida permitindo armazenamento por um longo período de tempo em um estado líquido facilitando armazenamento e transporte antes da administração.

[0306] Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo, fornecida aqui compreende lipídios sólidos como material de matriz. Em outra modalidade, a composição farmacêutica injetável compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo, como descrita aqui compreende lipídios

sólidos como material de matriz. Em outra modalidade, a produção de micropartículas de lipídio por congelamento de spray foi descrito por Speiser (Speiser and al., Pharm Res. 8 (1991) 47-54) seguido por nanopéletes para administração por via oral (Speiser EP 0167825 (1990)). Em outra modalidade, lipídeos, que são usados, são bem tolerados pelo organismo (por exemplo, glicerídeos compostos de ácidos graxos que estão presentes nas emulsões para nutrição parenteral).

[0307] Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo, como descrita aqui compreende micropartículas poliméricas. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo, como descrita aqui compreende nanopartículas. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo, como descrita aqui compreende lipossomas. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo, como descrita aqui compreende emulsão lipídica. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo, como descrita aqui compreende microesferas. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo, como descrita aqui compreende nanopartículas lipídicas. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo,

como descrita aqui compreende nanopartículas lipídicas compreendendo lipídios anfifílicos. Em outra modalidade, a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo modificado com CTP ou fragmentos do mesmo, como descrita aqui compreende nanopartículas lipídicas compreendendo uma droga, uma matriz lipídica e um surfactante. Em outra modalidade, a matriz lipídica tem um conteúdo de monoglicerídeo que é pelo menos 50% p/p.

[0308] Em uma modalidade, composições da presente invenção são apresentadas em uma embalagem ou dispositivo distribuidor, como um kit aprovado pelo FDA, que contém uma ou mais formas farmacêuticas de unidade contendo o ingrediente ativo. Em uma modalidade, a embalagem, por exemplo, compreende folha de metal ou plástico, como uma embalagem de blister. Em uma modalidade, a embalagem ou dispositivo de distribuidor é acompanhado de instruções para a administração. Em uma modalidade, a embalagem ou o distribuidor é acomodado por um aviso associado com o recipiente em uma forma prescrita por uma agência governamental que regula a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos, cujo aviso é reflexivo de aprovação pela agência da forma das composições ou administração humana ou veterinária. Esse aviso, em uma modalidade, é rotulado aprovado pelo U.S. Food and Drug Administration para prescrição de drogas ou de uma inserção de produto aprovado.

[0309] Em uma modalidade, será apreciado que os polipeptídeos ou fragmentos do mesmo aqui fornecidos podem ser fornecidos para o indivíduo com agentes ativos adicionais para alcançar um efeito terapêutico melhorado em

comparação com o tratamento com cada agente por si só. Em outra modalidade, medidas (por exemplo, dosagem e seleção do agente complementar) são tomadas para evitar efeitos colaterais adversos que são associados com terapias de combinação.

[0310] Em uma modalidade, o termo "cerca de", significa em termos quantitativos mais ou menos 5%, ou em outra modalidade mais ou menos 10%, ou em outra modalidade mais ou menos 15% ou em outra modalidade mais ou menos 20%.

[0311] O termo "sujeito" refere-se em uma modalidade para um mamífero incluindo um ser humano em necessidade da terapia, ou suscetível a uma condição ou suas sequelas. O sujeito pode incluir cães, gatos, porcos, vacas, ovelhas, cabras, cavalos, ratos e camundongos e humanos. O termo "sujeito" não exclui um indivíduo que é normal em todos os aspectos.

[0312] Objetos adicionais, vantagens e características inovadoras da presente invenção se tornarão aparentes para um especialista na técnica após exame dos exemplos a seguir, que não se destinam a ser limitantes. Além disso, cada uma das várias modalidades e aspectos da presente invenção como acima delineada e como reivindicado na seção de reivindicações abaixo encontra suporte experimental nos exemplos a seguir.

EXEMPLOS

Materiais e Métodos:

Produção de proteínas modificadas com CTP diferentes

[0313] A região codificadora de DNA do hormônio do crescimento humano (hGH), eritropoietina (EPO), APO-A1, Fator IX e Fator VII foram ligados à sequência de DNA do

peptídeo CTP. O peptídeo CTP foi fundido para o N-terminal e/ ou C-terminal em cópia única ou em tandem, conforme detalhado na Tabela 2. Os plasmídios projetados foram transfectados e expressos em linhagem de células CHO que permitem a estruturação apropriada dos O-glicanos, que desempenham um papel fundamental no aumento do volume hidrodinâmico das proteínas (ver Tabela 5). As proteínas diferentes foram purificadas de acordo com processos personalizados que foram desenvolvidos com exclusividade para cada proteína, conforme detalhado abaixo:

CTP-EPO-CTP-CTP: A colheita clarificada foi carregada em uma coluna Azul Sepharose. O produto eluído foi diluído e carregado em uma coluna Q Sepharose. A fração eluída de uma coluna Q Sepharose foi processada por ultracentrifugação usando um dispositivo de centrifugação Amicon (corte de 30 kDa) e foi dializada. A fração concentrada e dializada foi carregada em uma coluna de Fenil Sepharose. A fração eluída de Fenil Sepharose foi processada por ultrafiltração com um dispositivo de centrifugação Amicon (corte de 30 kDa) e dializada contra PBS pH 7.

[0314] *CTP-CTP-EPO* e *CTP-CTP-EPO-CTP-CTP:* A colheita clarificada foi carregada em uma coluna DEAE Sepharose e eluída. A fração eluída foi condicionada com Sulfato de Amônio e foi carregada em uma coluna de Fenil Sepharose HS. Fenil de eluição foi concentrado e dializado. As duas colunas seguintes são em um modo de escoamento: Hidroxiapatita tipo I 40 µ e SP Sepharose. O produto final foi concentrado, dializado e armazenado a -20°C.

[0315] *APO-CTP* e *APO-CTP-CTP:* Estas duas versões

das proteínas APO foram purificados com uma coluna de afinidade (Capture Select Apo, Bac). A colheita clarificada foi diluída 1:1 com PBS e eluída da coluna. A eluição foi concentrada e diálise contra PBS e armazenada a -80°C.

[0316] *CTP-hGH-CTP-CTP:* A colheita clarificada é filtrada usando UFDF1. A inativação viral é realizada. A primeira cromatografia é uma cromatografia de troca de ânion, DEAE Sepharose FF. A resina da segunda cromatografia é Fenil Sepharose. O combinado de eluato da segunda cromatografia é diafiltrado e concentrado em UFDF-2. A etapa UFDF-2 é seguida por mais duas cromatografias, Hidroxiapatita Cerâmica Tipo I 40 µM e SP Sepharose FF, em um modo de escoamento. Nanofiltração foi realizada. A solução do produto é concentrada para 41 ± 1 mg/mL e dializada.

[0317] *FIX-CTP-CTP-CTP:* Tris-HCl, pH 9 foi adicionado para a colheita clarificada. A primeira coluna de cromatografia foi realizada usando uma troca de ânion, coluna Q. A próxima coluna foi Heparina Hiper D. A fração eluída foi ajustada para a concentração final de 10mM Fosfato de Sódio com pH final de 6,8. A última etapa cromatográfica foi na resina CHT. A fração eluída foi concentrada e dializada contra TBS pH 7,5.

[0318] *FIX-CTP-CTP-CTP-CTP:* A colheita clarificada é concentrada e dializada. A única etapa cromatográfica é uma cromatografia de afinidade, Jacalin imobilizado. O produto eluído foi concentrada e dializado contra TBS pH 7,5.

[0319] *FIX-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP:* A colheita clarificada é concentrada e dializada. A única etapa

cromatográfica é uma cromatografia de afinidade, Jacalin imobilizado. O produto eluído foi concentrada e dializado contra TBS pH 7,5.

[0320] *APOA1-CTP-CTP:* A colheita clarificada foi concentrada e dializada. A primeira cromatografia foi realizada usando uma cromatografia de troca de ânion, coluna DEAE Sepharose FF. A segunda etapa cromatográfica foi realizada em uma resina Jacalin imobilizado. O eluato foi diafiltrado e concentrado em UFDF-2 contra TBS pH 7,4.

[0321] *APOA1-CTP:* A primeira cromatografia foi realizada usando uma cromatografia de afinidade, coluna Capture-Select APO-AI. A segunda etapa cromatográfica foi realizada em uma resina Jacalin imobilizado. O eluato foi diafiltrado e concentrado em UFDF-2 contra TBS pH 7,4.

[0322] *APOA1:* A colheita diluída foi carregada em cromatografia de afinidade, Capture-Select APO-AI. O eluato foi diafiltrado e concentrado em UFDF-2 contra TBS pH 7,4.

[0323] *FVIIa-CTP-CTP-CTP:* A colheita clarificada foi concentrada e dializada. A inativação viral foi realizada. A primeira cromatografia foi realizada usando uma coluna de afinidade, VII Select. A fração eluída foi diluída antes do carregamento sobre a próxima coluna - Hidroxiapatita Cerâmica (CHT). O eluato CHT foi carregado na coluna Fenil Sepharose. O eluato foi diafiltrado e foi ativado em uma coluna de cromatografia de troca de ânion. A coluna é então lavada e o produto foi eluído. Nanofiltração foi realizada.

[0324] *FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP:* A colheita clarificada foi concentrada e dializada. A primeira cromatografia foi realizada usando uma coluna de afinidade,

VII Select. A fração eluída foi carregada sobre a próxima coluna - Hidroxiapatita Cerâmica (CHT). A coluna foi lavada e o produto foi eluído. O eluato CHT foi carregado na coluna Fenil Sepharose. O eluato é diafiltrado e concentrado. Fator VII foi ativado em uma cromatografia de troca de ânion. A coluna foi então lavada e o produto foi eluído.

Tabela 2: Descrição esquemática da proteína modificada com CTP

Descrição esquemática de plasmídeo
CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023)
CTP-CTP-EPO
CTP-EPO-CTP-CTP
CTP-CTP-EPO-CTP-CTP
APO -CTP
APO -CTP- CTP
FIX-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP
FVIIa-CTP-CTP-CTP
FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP

Desglicosilação de proteínas modificadas com CTP

[0325] A desglicosilação de proteínas modificadas com CTP foi realizada usando Glyko Sialidase A (cat. no. PZ PZGK80040, Prozyme), O-glicanase (cat. no. PZ PZGK80090, Prozyme) e N-glicanase (cat. no. PZGKE-5006A, Prozyme). As proteínas foram digeridas por 2h (a 37°C) com sialidasa A, seguida de digestão com O-glicanase e se necessário com N-glicanase durante a noite.

Determinação do peso molecular por MALDI-TOF

[0326] Pesos moleculares (Mw) das proteínas modificadas com CTP foram medidos pela tecnologia MALDI-TOF usando o modelo REFLEX-IV (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Espectrometria de massa de tempo de voo-dessorção/ionização de laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) é uma técnica em que um coprecipitado de uma matriz de absorção de luz UV e uma biomolécula como proteínas ou peptídeos é irradiado por um pulso de laser. As biomoléculas ionizadas são aceleradas em um campo elétrico e entram no tubo de voo. Durante o voo neste tubo, moléculas diferentes são separadas de acordo com sua massa para proporção de carga e alcançam o detector em tempos diferentes. Desta forma, cada molécula produz um sinal distinto que pode ser convertido em peso molecular. O método é usado para a caracterização de diferentes proteínas e peptídeos com massas moleculares entre 400 e 350.000 Da. É um método muito sensível, que permite a detecção de baixas (10-15 a 10-18 moles) quantidades de amostra com uma precisão de 0,1 - 0,01%. As medições foram realizadas pela Analytical Research Services Unit (Ben-Gurion University, Beer-Sheva, Israel).

Análise da tamanho hidrodinâmico por HPLC utilizando coluna SEC

[0327] O tamanho hidrodinâmico das proteínas foram medidos por HPLC (Dionex UltiMate 3000) usando a coluna TSKgel G2000SW SEC (cat. no. 08540, TosoHaas) para hGH, Epo e Apo nativos e proteínas modificadas com CTP relacionadas ou uma coluna de TSKgel G3000WXL SEC (cat. no. 08541, TosoHaas) para Fator IX e fator VII nativos e proteínas

modificadas com CTP relacionadas. O kit de calibração H Mw (Cat. No. 151-1901, BioRad) foi usado para medir o tamanho de proteínas. Os resultados foram ajustados para um ajuste logarítmico (y=a*ln X +b) e os tamanhos hidrodinâmicos das proteínas diferentes foram calculados.

RESULTADOS

Exemplo 1: Produção de proteínas modificadas com CTP diferentes

[0328] Onze diferentes proteínas modificadas com CTP foram transfectadas e expressas em uma linhagem de células CHO. As várias colheitas foram purificadas de acordo com os métodos descritos acima. As proteínas purificadas são mostradas nas Figuras 1 e 2.

Exemplo 2: Análise do peso molecular por método MALDI-TOF

[0329] O peso molecular das diferentes proteínas modificadas com CTP glicosiladas e não glicosiladas foi determinado utilizando a tecnologia MALDI-TOF e foi comparado com suas proteínas nativas correspondentes (proteínas intactas que não são fundidas para CTP, ou seja, Biotropin para hGH, EPREX® para Epo, ApoAI, Mononine® para Fator IX e Novoseven® para FVIIa) peso molecular Tabela 3). O Mw medido para todas as proteínas não glicosiladas nativas foi de acordo com o Mw teórico, que é baseado nas sequências de aminoácidos das proteínas. Os incrementos nos pesos moleculares por uma cópia de CTP não glicosilados e glicosilados foram calculados e são descritos em Figuras 3A e 3B, respectivamente. A contribuição de uma cópia de CTP para o peso molecular foi calculada da seguinte forma: Primeiro, o incremento no peso molecular foi calculado

subtraindo-se o peso molecular medido, ou o teórico - no caso de hGH nativo- das proteínas nativas do peso molecular medido de suas proteínas modificadas com CTP correspondentes. Então, o incremento calculado foi dividido pelo número de cópias CTP para cada proteína. Por exemplo, MOD-4023 (hGH que foi fundido para uma cópia do CTP no N-terminal e 2 cópias do CTP em tandem no C-terminal) tem peso molecular de 38,128, enquanto o hGH nativo tem um peso molecular teórico de 22.000. A diferença entre essas duas proteínas é 16,13 kDa que significa que a contribuição de cada CTP glicosilado é 5,4 kDa (16,13 dividido por 3 cópias do CTP). A contribuição média de uma cópia do CTP não glicosilado em todas as proteínas medidas é 2,76 kDa±0,103 (Figura 3A, Tabela 3). Este resultado é alinhado com o Mw teórico de um CTP único, que é 2,78 kDa. O CTP glicosilado contribui uma média de 4,76kDa±0,422 para o Mw (Figura 3B, Tabela 3), sem diferenças significativas entre as várias proteínas medidas.

Tabela 3: Resultados de MALDI-TOF de proteínas modificadas com CTP não glicosiladas e glicosiladas e suas proteínas nativas correspondentes. ND - Não determinado

Descrição das Proteínas	**Mw Teórico (baseado em estrutura de proteína excluindo a contribuição de glicano)**	**Proteínas não glicosiladas. Resultados de MALDI-TOF (Da)**	**Proteínas glicosiladas. Resultados de MALDI-TOF (Da)**	**Incremento de tamanho molecular por uma cópia de CTP não glicosilado**	**Incremento de tamanho molecular por uma cópia de CTP glicosilado**
Biotropin(rhGH)	22000	ND	ND	ND	ND

CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023)	30469,4	30525	38128	2,8	5,4
EPREX®(rEPO)	18396	18246	29160	0,0	0,0
CTP-CTP-EPO	23956	23690	37074	2,7	4,0
CTP-EPO-CTP-CTP	26736	27300	43547,8	3,0	4,8
APO AI	28078	28021,5	28024,5	0,0	0,0
APO -CTP	30858	30686,5	32505	2,7	4,5
APO CTP-CTP	33638	33569	36710	2,8	4,3
Mononina® (rFIX)	48695,6	47172	53270	0,0	0,0
FIX-CTP-CTP-CTP	57036	55626,5	68876	2,8	5,2
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP	59816,2	58346,5	73552,5	2,8	5,1
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	62596,2	61051,5	77797	2,8	4,9
Novoseven® (rFVIIa)	47222,6	45899	50310,4	0,0	
FVIIa-CTP-CTP-CTP	58343,1	53755,5	64302	2,6	4,7
FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	61123,2	59266	74431	2,7	4,8
			Méd.	**2,76**	**4,76**
			SD	**0,103**	**0,422**
			%CV	**3,72**	**8,87**

Exemplo 3: Análise do tamanho hidrodinâmico pelo método HPLC

[0330] O volume hidrodinâmico é o parâmetro principal que influencia o tempo de retenção (RT) de proteínas quando atravessa a coluna de exclusão de tamanho. Portanto, tamanhos de proteína foram calculados por coluna SEC usando o kit de calibração de filtração em Gel HMw (cat. no. 151-1901, BioRad). O tempo de retenção dos

padrões foram medidos nas colunas SEC TSK 2000 e TSK 3000 e o erro relativo % (% RE) para cada coluna foi calculado para determinar a precisão dos métodos analíticos. Os %RE do Mw observado das proteínas de calibração foram calculados e comparados com o Mw conhecido e esperado das proteínas de calibração. Os resultados do Mw calculado para a curva de calibração e o %RE são apresentados na Tabela 4a para coluna TSK 2000 SEC e na Tabela 4b para coluna TSK 3000 SEC. Os resultados mostram que o %RE foi inferior ou igual a 20% (≤20), indicando a elevada precisão para uma ampla gama de peso molecular determinado de uma proteína.

Tabela 4a: Resultados de curva de calibração Mw H e %RE calculado usando TSK 2000. O peso molecular esperado das proteínas de curva de calibração foram fornecidos pelo kit comercial (kit de calibração Mw H BioRad Cat. No. 151-1901) que foi usado.

Proteínas padrão	M.W. Esperado	R.T.	M.W. Observado	%RE
Gama-globulina	158.000	15,535	155279,16	-1,72
Ovalbumina	44.000	18,535	52924,39	20,28
Mioglobulina	17.000	22,315	13635,14	-19,79
Vitamin B12	1.350	28,61	1424,88	5,55

Tabela 4b: Resultados de curva de calibração Mw H e %RE calculado usando coluna TSK 3000. O Mw esperado das proteínas de curva de calibração foram fornecidos pelo kit comercial que foi usado (kit de calibração Mw H BioRad Cat. No. 151-1901).

Proteínas	M.W.	R.T.	M.W.	%RE

padrão	Esperado		Observado	
Tiroglobulina	670.000	11,925	753,500	12,46
Gama-globulina	158.000	16,250	126,808	-19,74
Ovalbumina	44.000	18,702	46,172	4,94
Mioglobulina	17.000	21,012	17,824	4,85

[0331] A fim de determinar a contribuição de CTP glicosilado para o volume hidrodinâmico de proteínas modificadas com CTP, várias proteínas modificadas com CTP foram analisadas pela coluna SEC e seus tamanhos hidrodinâmicos foram calculados. As proteínas recombinantes correspondentes: Biotropin (rhGH), EPREX® (rEPO), ApoAI, Mononine® (rFIX) e Novoseven® (rFVIIa) foram analisadas em paralelo às suas proteínas correspondentes modificadas com CTP a fim de calcular a contribuição de CTP glicosilado para a proteína (Tabela 5, Figura 4). A Figura 4A apresenta o incremento total do tamanho hidrodinâmico de proteínas modificadas com CTP para as proteínas nativas como foi medido pela coluna SEC.

Tabela 5: Resultados de SEC-HPLC e incremento calculado de uma cópia de CTP de proteínas modificadas com CTP e suas proteínas nativas correspondentes.

Proteínas glicosiladas	SEC-HPLC Mw (Da)	Aumento em kDa por CTP glicosilado
Biotropin (rhGH)	21116	NA
CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023)	107750	28,9
EPREX® (rEPO)	79014	NA
CTP-CTP-EPO	146616	33,8

CTP-EPO-CTP-CTP	168032	29,7
CTP-CTP-EPO-CTP-CTP	199970	30,2
APO	62086	NA
APO -CTP	100233	38,1
APO CTP-CTP	141094	39,5
Mononine® (rFIX)	117553	NA
FIX-CTP-CTP-CTP	261982	48,1
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP	329362	53,0
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	381095	52,7
Novoseven® (rFVIIa)	76706	NA
FVIIa -CTP-CTP-CTP	206645	43,3
FVIIa -CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	325602	49,8

[0332] O incremento no peso molecular de uma cópia do CTP glicosilado foi calculado subtraindo-se o tamanho hidrodinâmico medido das proteínas nativas do tamanho hidrodinâmico medido de suas proteínas modificadas com CTP correspondentes. Então, o incremento calculado foi dividido pelo número de cópias CTP para cada proteína. As contribuições calculadas de uma cópia dos CTPs glicosilados para o peso molecular de várias proteínas são apresentadas na Figura 4B. As várias proteínas apresentam incrementos que variam entre 29 kDa a 53 kDa por uma cópia do CTP glicosilado.

[0333] Curiosamente e inesperadamente, a

contribuição de uma cópia do CTP glicosilado do FIX e FVIIa foi significativamente maior com uma contribuição de 43-53 kDa (por uma cópia do CTP) em comparação com outras proteínas medidas (Tabela 5). O incremento no tamanho hidrodinâmico por uma cópia do CTP glicosilado é muito maior do que a contribuição calculada de 4,76 kDa por uma cópia do CTP glicosilado para o peso molecular, como medido por MALDI-TOF. As diferenças nos Mw calculados entre os métodos resulta do fato de que enquanto MALDI-TOF está medindo o Mw real da proteína, as medições de SEC-HPLC são afetadas pelo volume hidrodinâmico da proteína, sugerindo que CTP glicosilado está aumentando substancialmente o volume hidrodinâmico de proteínas ao qual está ligado. A magnitude do volume hidrodinâmico é cerca de 6-11 vezes maior em comparação com a contribuição calculada por CTP medido por MALDI-TOF. De nota, a contribuição da CTP para o tamanho hidrodinâmico da proteína sendo modificado foi menor para hGH e variantes de EPO modificadas com CTP (em torno de 30kDa), mas um pouco maior para variantes FIX e FVII modificadas com CTP, e surpreendentemente não foi afetada pelo número de CTPs sendo adicionado à proteína em particular.

[0334] Além disso, a contribuição do CTP não glicosilado para o Mw da proteína foi determinada por SEC-HPLC (Tabela 6, Figuras 5A e 5B). A de-glicosilação foi realizada incubando as proteínas com Sialidase A (remove o ácido siálico) por 2h em 37°C seguido por adição de O-glicanase (para remover os O-glicanos). No caso de EPREX® (rEPO), Mononine® (rFIX), NovoSeven® (rFVII) e suas proteínas modificadas com CTP correspondentes, que contêm

N-glicanos, N-glicanase foi adicionado para uma digestão durante a noite para remover os N-glicanos. A contribuição do CTP não glicosilado ao tamanho ou volume hidrodinâmico de várias proteínas foi calculada e comparada às suas proteínas nativas correspondentes, ou seja, a contribuição de polipeptídeos modificados com CTP não glicosilados ao volume hidrodinâmico foi calculada comparando o volume hidrodinâmico de polipeptídeos modificados com CTP não glicosilados à de proteína nativa correspondente não glicosilada. Por exemplo, para EPO, os N- e O-glicanos foram removidos de Eprex®, e o aumento do volume hidrodinâmico das variantes Epo modificadas com CTP foi calculado e comparado aos seus pesos moleculares).

[0335] A Figura 5A mostra o incremento no tamanho hidrodinâmico das proteínas intactas, enquanto a Figura 5B mostra a contribuição de uma cópia das proteínas modificadas com CTP não glicosiladas. Notavelmente, CTP não glicosilado aumenta o tamanho hidrodinâmico das proteínas modificadas com CTP em comparação com as proteínas nativas correspondentes. A contribuição calculada de uma cópia de CTP não glicosilado foi diferente entre as várias proteínas, variando entre 8 kDa a 21 kDa por uma cópia do CTP não glicosilado (Tabela 6). Considerando que o peso molecular teórico do CTP, que consiste em 28 aminoácidos, é 2,78 kDa e o peso molecular medido (por MALDI-TOF) também foi cerca de 2,76 kDa, estes resultados sugerem que a contribuição de CTP não glicosilado para o peso molecular é maior do que o esperado. Além disso, e como observado da mesma forma para CTP glicosilado, o volume hidrodinâmico também foi observado como sendo muito maior do que o

esperado para CTP não glicosilado. Em geral, ligando CTP para uma proteína resulta em um aumento no volume hidrodinâmico que é atribuível à estrutura CTP e os glicanos CTP.

[0336] Também foi observado que o número de CTPs adicionados para uma proteína particular não afetou a contribuição para o tamanho hidrodinâmico do mesmo. O incremento mais significativo de CTP não glicosilado foi observado para Apo, FIX e FVII que têm cópias do CTP no C-terminal da proteína. Esse achado que adicionando CTP no C-terminal leva a uma maior contribuição ao volume hidrodinâmico foi inesperado. Curiosamente e inesperadamente, a contribuição de uma cópia do CTP não glicosilado de proteínas modificadas com CTP Apo, FIX e FVIIa foi muito semelhante e medida ~20 kDa (Tabela 6) mas a contribuição de CTP glicosilado dos fatores de coagulação foi significativamente maior em comparação com Apo glicosilado CTP (Tabela 5).

Tabela 6: Resultados de SEC-HPLC e incremento calculado de uma cópia de CTP de proteínas modificadas com CTP não glicosiladas e suas proteínas nativas correspondentes.

Proteínas não glicosiladas	SEC-HPLC Mw (Da)	Aumento em kDa por CTP não glicosilado
Biotropin(rhGH)	21116	NA
CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023)	45480	8,1
EPREX® (rEPO)	18083	NA

CTP-CTP-EPO	49472	15,7
CTP-EPO-CTP-CTP	65991	16,0
CTP-CTP-EPO-CTP-CTP	85228	16,8
APO	61267	NA
APO -CTP	82846	21,6
APO CTP-CTP	104007	21,4
Mononine® (rFIX)	79539	NA
FIX-CTP-CTP-CTP	138132	19,5
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP	160115	20,1
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	186677	21,4
Novoseven® (rFVIIa)	52570	NA
FVIIa-CTP-CTP-CTP	107321	18,3
FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	158706	21,2

[0337] Este estudo mostrou que uma cópia do CTP glicosilado contribui pelo menos 28 (kDa) ao volume hidrodinâmico enquanto o incremento do Mw é 4,76 (kDa) 0,422, como determinado usando SEC-HPLC e MALDI-TOF, respectivamente. Esta magnitude inesperada no volume hidrodinâmico de proteínas modificadas com CTP é provavelmente a razão para a meia-vida estendida no soro observada e potencialização da atividade biológica das proteínas modificadas com CTP. O CTP não glicosilado contribui pelo menos 8 (kDa) para o volume hidrodinâmico, enquanto o incremento do peso molecular foi 2,76 (kDa)

0,103. Curiosamente, o Mw do peptídeo CTP não glicosilado e glicosilado como foi medido por MALDI-TOF foi semelhante entre todas as proteínas. Além disso, o volume hidrodinâmico de proteínas modificadas com peptídeo CTP glicosiladas e não glicosiladas como medido pelo SEC-HPLC foi diferente. Estes achados sugerem que embora o Mw do peptídeo CTP seja semelhante quando fundido para diferentes proteínas em posição diferente, o mesmo provoca um aumento inesperado do volume hidrodinâmico de proteínas diferentes, ao qual está ligado, como evidenciado pelas medições da coluna SEC.

[0338] Após descrever modalidades preferenciais da invenção tendo como referência os desenhos anexos, deve ser entendido que a invenção não é limitada às modalidades precisas, e que várias alterações e modificações podem ser realizadas por especialistas na técnica sem se afastar do escopo ou do espírito da invenção conforme definido nas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para aumentar incrementalmente o tamanho hidrodinâmico de um polipeptídeo recombinante de interesse, em que o dito polipeptídeo recombinante de interesse é um fator de coagulação ativado VIIa (FVIIa), o método sendo caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) uma etapa de fundir recombinantemente três unidades de peptídeo carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica (CTP) ao carboxi terminal do dito fator de coagulação VIIa (FVIIa), em que nenhum dos CTPs estão ligados ao N-terminal;

(b) seguida por uma etapa de expressar o polipeptídeo modificado com CTP recombinante em uma célula hospedeira, em que a expressão compreende glicosilar ditas unidades de CTP;

em que as ditas unidades de CTP glicosiladas aumentam incrementalmente o tamanho hidrodinâmico do FVIIa por um incremento em cerca de 43-50 kDa por cada das ditas unidades de CTP glicosiladas.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita glicosilação é uma ligação GalNAc à serina (Ser) ou treonina (Thr) na cadeia de proteína por uma ligação α-glicosídica.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a dita glicosilação é O-glicosilação, preferencialmente glicosilação de núcleo 1, O-fucosilação, O-manosilação ou O-glicosilação.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que dita O-glicosilação é seguida pela adição de uma a sessenta

moléculas de galactose, ou em que dita O-glicosilação é seguida pela adição de uma a 120 moléculas de ácido siálico, ou uma combinação das mesmas.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos de uma a três das ditas unidades de CTP é selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que uma a três das ditas unidades de CTP é truncada.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que uma a três das ditas unidades de CTP é truncada, em que dito CTP truncado compreende os primeiros 10 aminoácidos da SEQ ID NO 3 (SSSSKAPPPS).

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que uma das ditas unidades de CTP é ligada ao dito polipeptídeo através de um ligante.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o dito ligante é uma ligação peptídica.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácidos nucleicos que codifica o polipeptídeo FVIIa compreende a SEQ ID NO: 47.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos do dito polipeptídeo fator de

coagulação VIIa compreende a SEQ ID NO: 45.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos do dito polipeptídeo modificado com CTP, o qual compreende três unidades de peptídeo carbóxi terminal de gonadotrofina coriônica (CTP) ligadas ao carboxi terminal do dito fator de coagulação VIIa (FVIIa) e nenhum CTP adicionado ao N-terminal, compreende a SEQ ID NO: 52.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula de ovário de Hamster chinês (CHO).

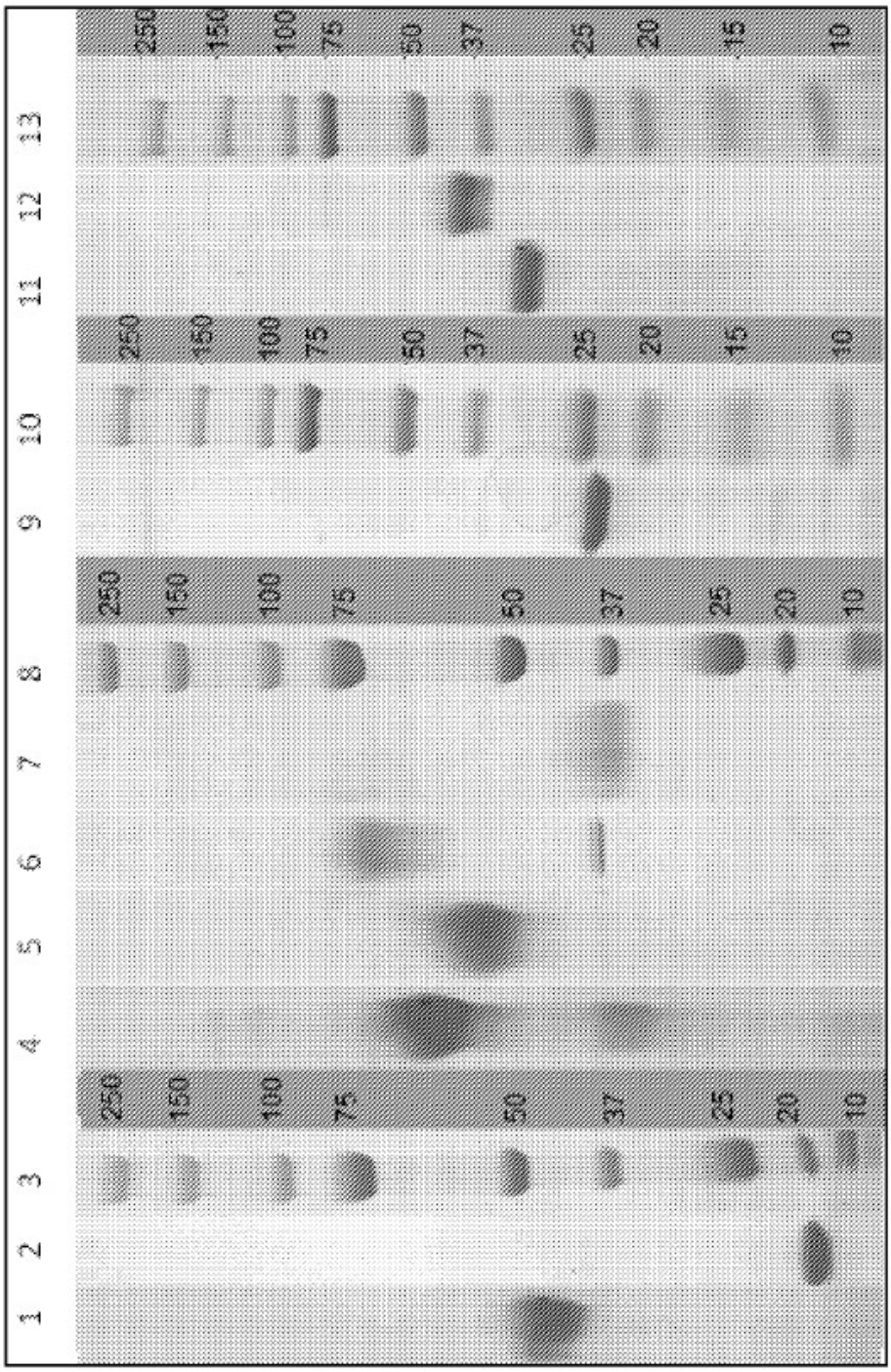


FIGURA 1

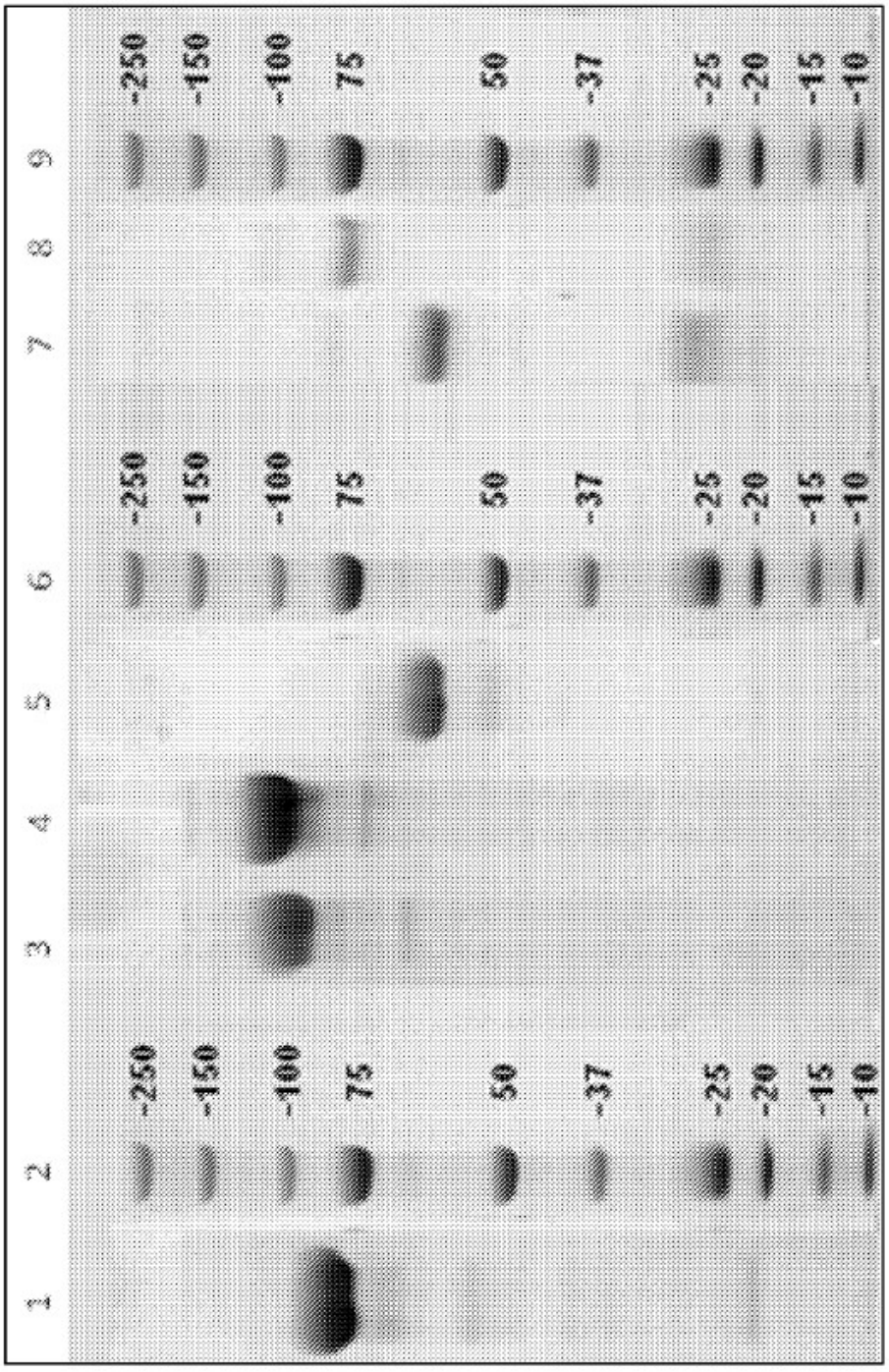


FIGURA 2

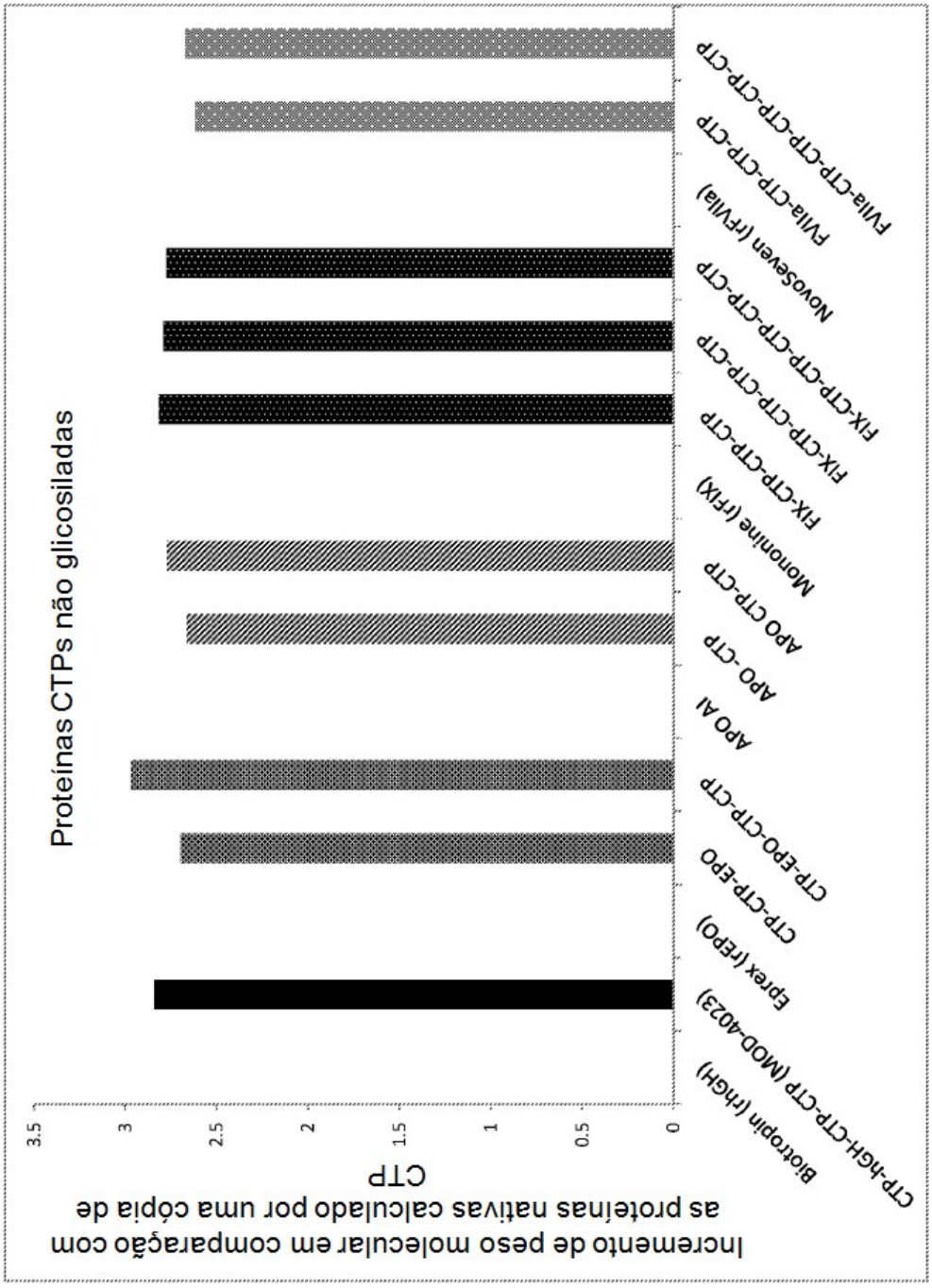

Proteínas CTPs não glicosiladas
Incremento de peso molecular em comparação com as proteínas nativas calculado por uma cópia de CTP
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Biotropin (rhGH)
CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023)
Eprex (rEPO)
CTP-CTP-EPO
CTP-EPO-CTP-CTP
APO AI
APO -CTP
APO CTP-CTP
Monoonine (rFIX)
FIX-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP
NovoSeven (rFVIIa)
FVIIa-CTP-CTP-CTP
FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP

FIGURA 3A

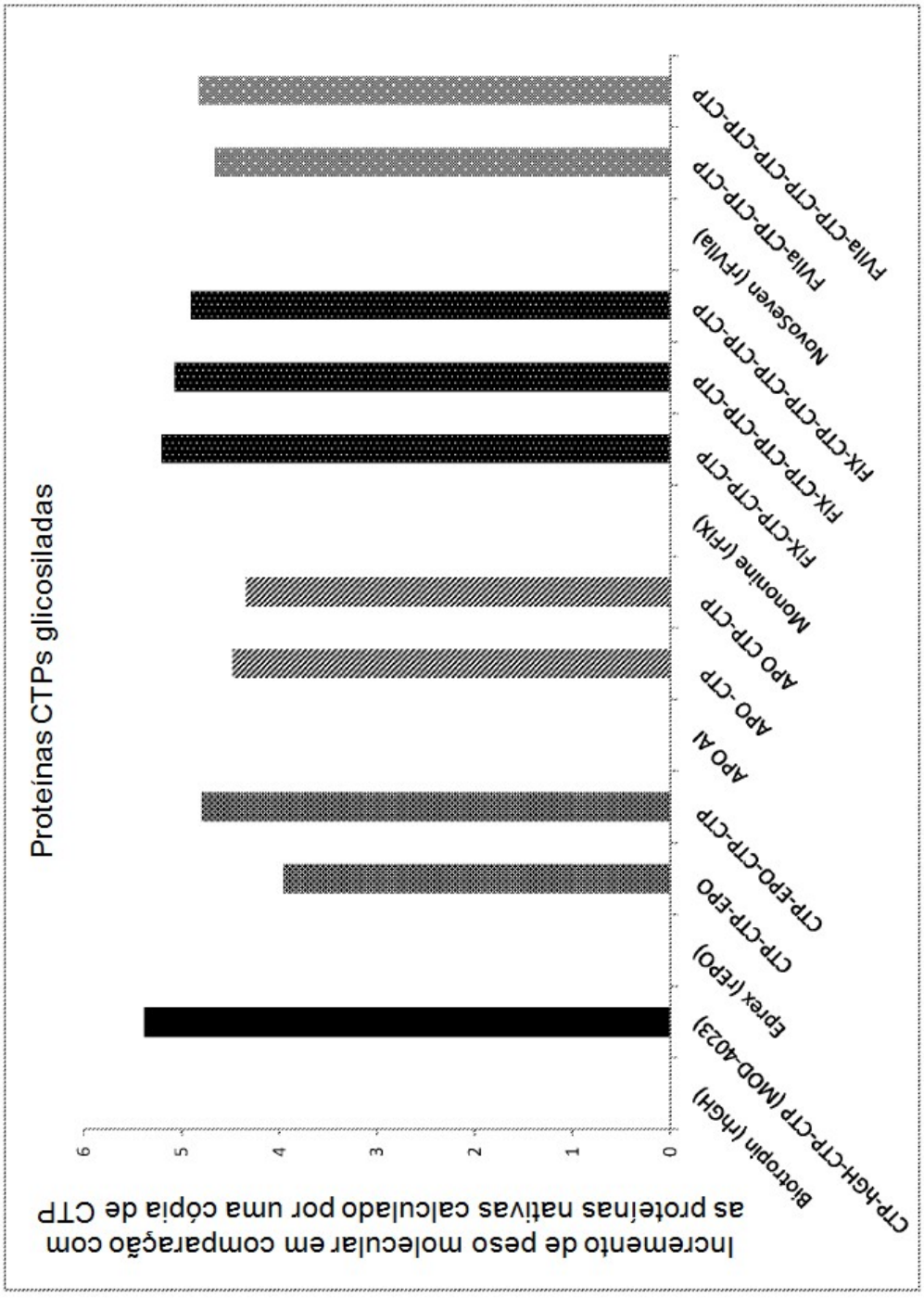

Proteínas CTPs glicosiladas
Incremento de peso molecular em comparação com as proteínas nativas calculado por uma cópia de CTP
0
1
2
3
4
5
6
Biotropin (rhGH)
CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023)
Eprex (rEPO)
CTP-CTP-EPO
CTP-EPO-CTP-CTP
APO AI
APO -CTP
APO CTP-CTP
Monomine (rFIX)
FIX-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP
Novoseven (rFVIIa)
FVIIa-CTP-CTP-CTP
FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP

FIGURA 3B

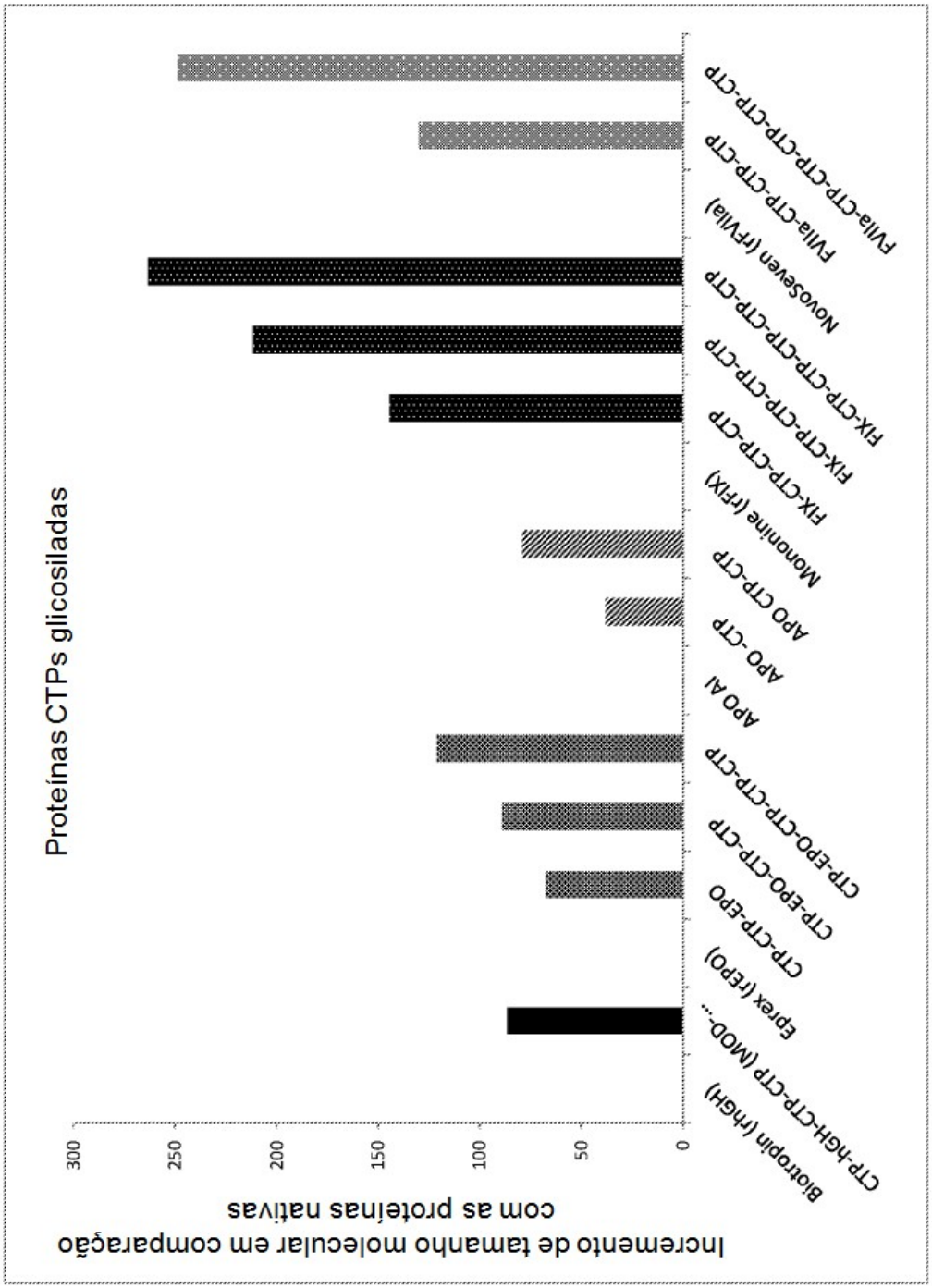

Proteínas CTPs glicosiladas
Incremento de tamanho molecular em comparação com as proteínas nativas
0
50
100
150
200
250
300
Bioctopin (rhGH)
CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-...
Eprex (rEPO)
CTP-CTP-EPO
CTP-EPO-CTP
CTP-EPO-CTP-CTP
APO AI
APO -CTP
APO CTP-CTP
Mononine (rFIX)
FIX-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP
NovoSeven (rFVIIa)
FVIIa-CTP-CTP-CTP
FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP

FIGURA 4A

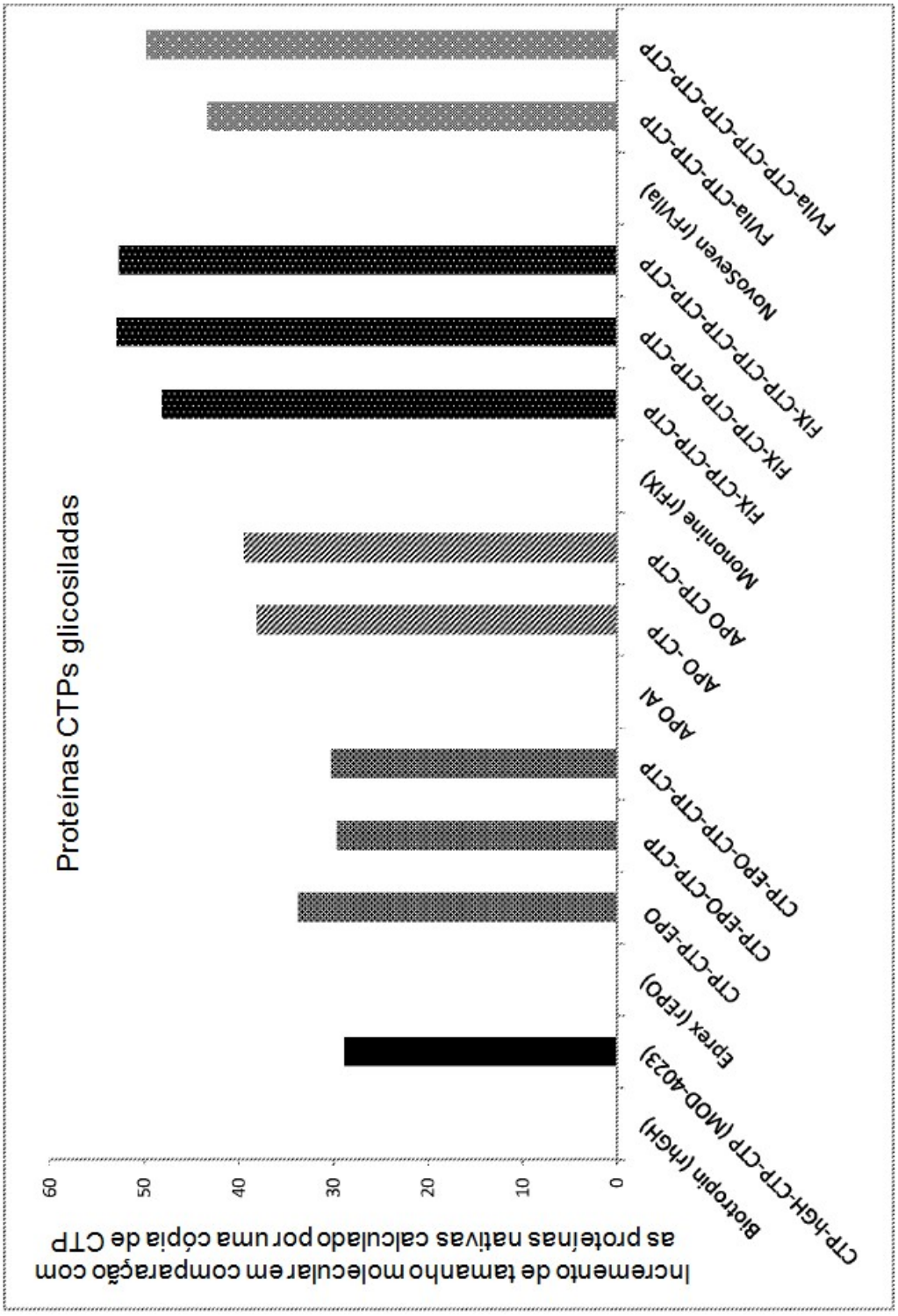

Incremento de tamanho molecular em comparação com as proteínas nativas calculado por uma cópia de CTP
0
10
20
30
40
50
60
Proteínas CTPs glicosiladas
Biotropin (rhGH)
Eprex (rEPO)
CTP-CTP-EPO
CTP-EPO-CTP-CTP
CTP-EPO-CTP-CTP
APO AI
APO -CTP
APO CTP-CTP
Monontine (rFIX)
FIX-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP
NovoSeven (rFVIIa)
FVIIa-CTP-CTP-CTP
FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP
CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023)

FIGURA 4B

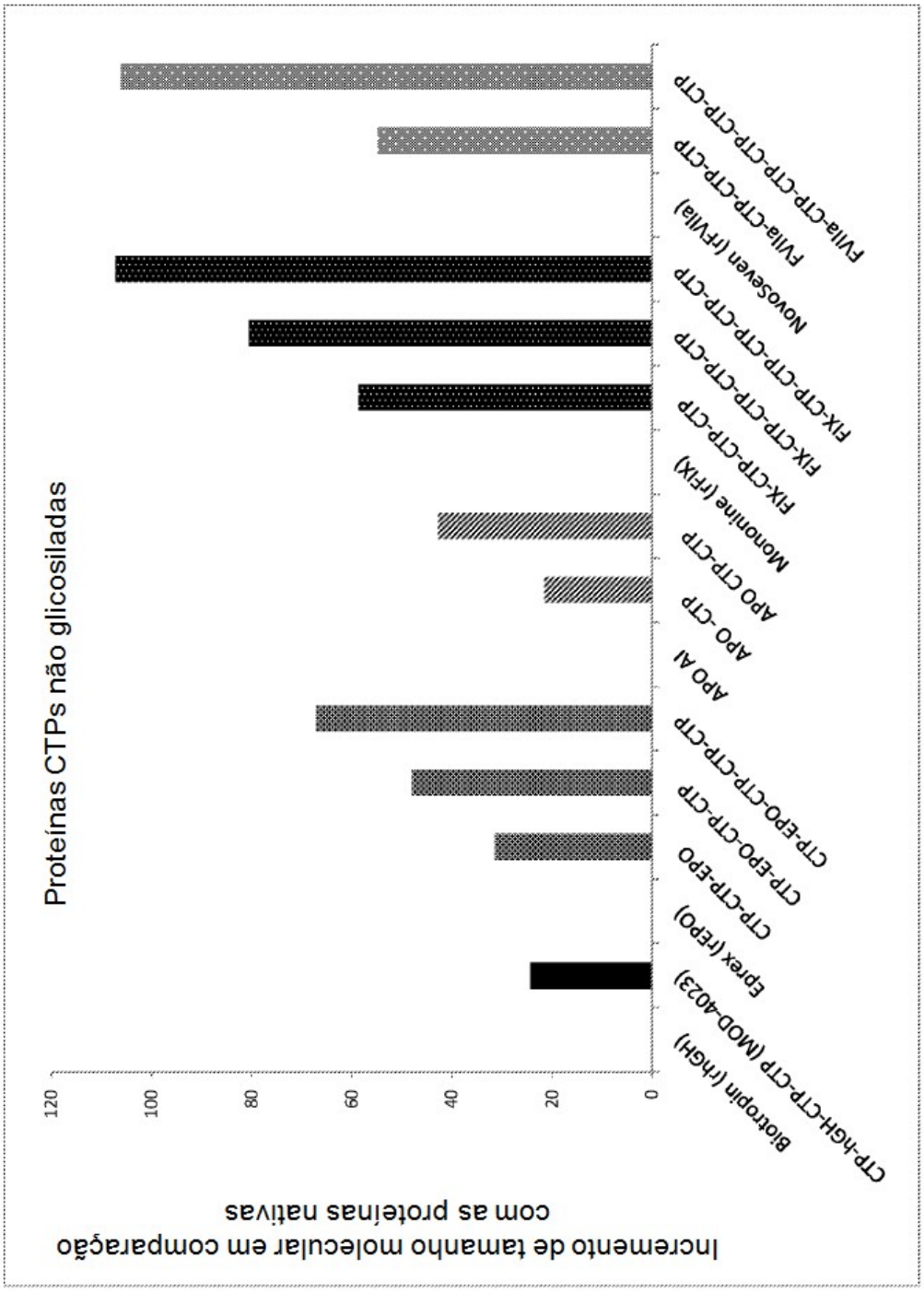

Proteínas CTPs não glicosiladas
Incremento de tamanho molecular em comparação com as proteínas nativas
120
100
80
60
40
20
0
Biotropin (rhGH)
Eprex (rEPO)
CTP-CTP-EPO
CTP-EPO-CTP-CTP
CTP-EPO-CTP-CTP-CTP
APO AI
APO -CTP
APO CTP-CTP
Monontine (rFIX)
FIX-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP
NovoSeven (rFVIIa)
FVIIa-CTP-CTP-CTP
FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP
CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023)

FIGURA 5A

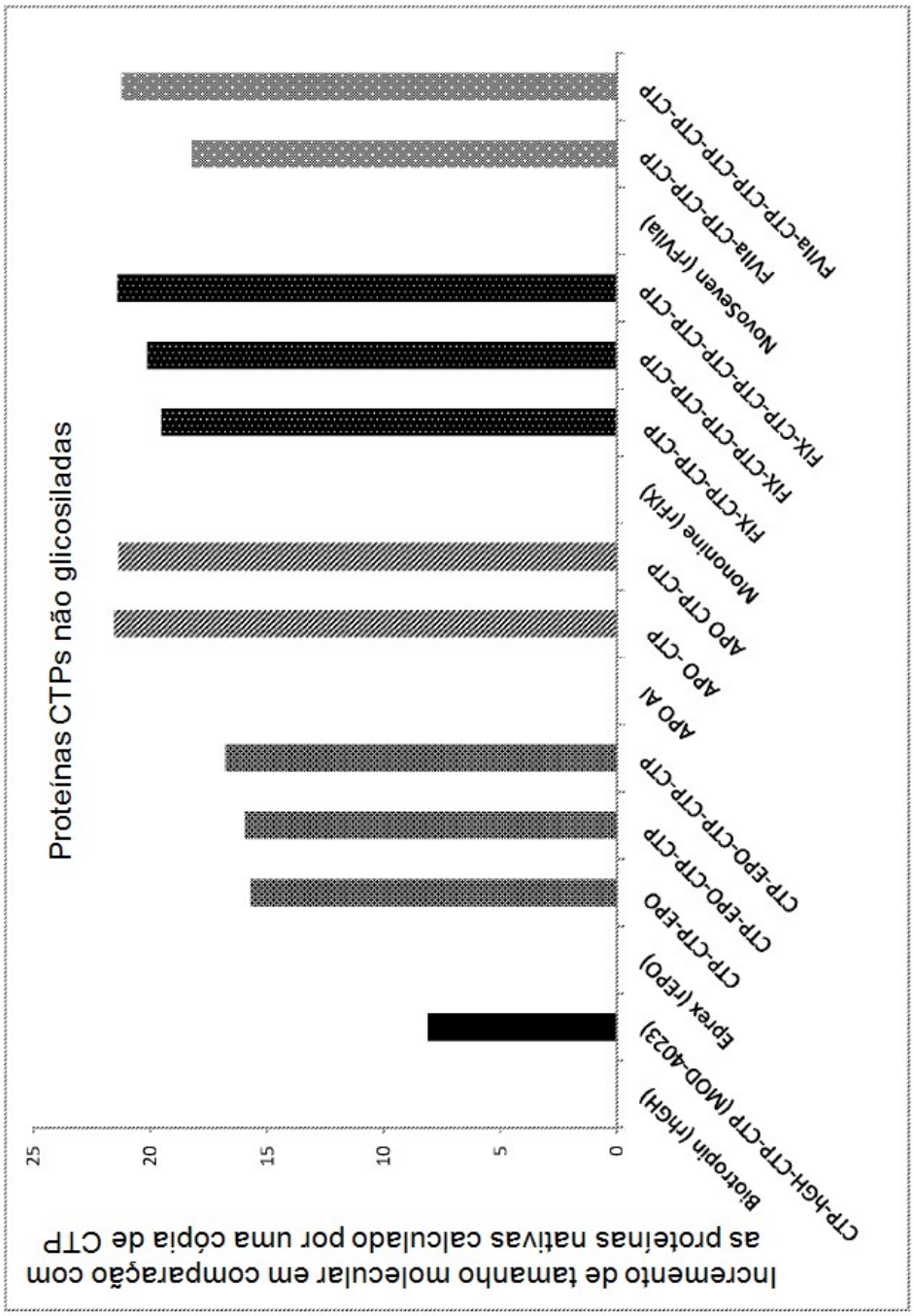

Incremento de tamanho molecular em comparação com as proteínas nativas calculado por uma cópia de CTP
Proteínas CTPs não glicosiladas
0
5
10
15
20
25
Biotropin (rhGH)
Eprex (rEPO)
CTP-CTP-EPO
CTP-EPO-CTP-CTP
CTP-EPO-CTP-CTP-CTP
APO AI
APO -CTP
APO CTP-CTP
Mononine (rFIX)
FIX-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP
NovoSeven (rFVIIa)
FVIIa-CTP-CTP-CTP
FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP
CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023)

FIGURA 5B