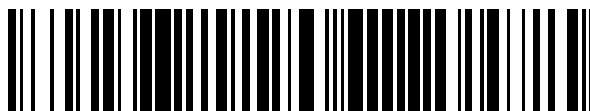


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 627**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2010 E 10715162 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 2417155**

54 Título: **Entrega dirigida de proteínas de Factor VIII a plaquetas**

30 Prioridad:

06.04.2009 US 212004 P

11.06.2009 US 186075 P

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

31.10.2013

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

ØSTERGAARD, HENRIK;

PUSATERI, TONY;

BARNETT, THOMAS R.;

BUCHARDT, JENS;

PESCHKE, BERND;

KOFOD-HANSEN, MIKAEL;

ZUNDEL, MAGALI A.;

BEHRENS, CARSTEN;

OLSEN, EVA H. NORLING y

STENNICKE, HENNING

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 427 627 T3

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

DESCRIPCIÓN

Entrega dirigida de proteínas de Factor VIII a plaquetas

5 Campo de la invención

[0001] La invención descrita en este documento se refiere a polipéptidos que comprenden al menos una secuencia de aminoácidos que tienen una identidad significativa con (homología con) el Factor VIII humano o una parte o partes biológicamente activas del mismo, moléculas relacionadas (tales como los ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos), composiciones (tales como formulaciones farmacéuticas) que comprenden tales polipéptidos y métodos de fabricación y uso de tales polipéptidos y moléculas biológicas relacionadas.

Antecedentes de la invención

15 [0002] El Factor VIII de coagulación ("Factor VIII" o "FVIII") es un factor de coagulación esencial. La falta de FVIII normal provoca hemofilia A, un trastorno de la sangre hereditario. El Factor VIII participa en la ruta intrínseca de la coagulación sanguínea. Específicamente, el Factor VIII es un cofactor para el Factor IXa, que convierte el Factor X en el Factor Xa activado (en presencia de Ca^{+2} y fosfolípidos).

20 [0003] El gen del Factor VIII produce dos transcritos empalmados alternativamente. La variante del transcrito 1 codifica una glicoproteína grande, isoforma A, que circula en el plasma y se asocia con el factor de von Willebrand ("vWF") en un complejo no covalente. Esta proteína sufre múltiples eventos de escisión. La variante del transcrito 2 codifica una proteína pequeña putativa, isoforma B, que consiste principalmente en el dominio de unión a fosfolípidos del factor VIIIc. Este dominio de unión es esencial para la actividad coagulante. La estructura del FVIII es bien conocida (véase, por ejemplo, Thompson, Semin Thromb Hemost. 2003 Feb;29(1):11- 22).

30 [0004] Tras la activación por trombina, (Factor IIa), el Factor VIIIa (FVIIIa) se disocia del complejo FVIII:vWF para interactuar con el Factor IXa causando una cadena bien caracterizada de eventos que llevan a la producción de más trombina. La trombina escinde el fibrinógeno en fibrina que se polimeriza y reticula (usando el Factor XIII) en un coágulo sanguíneo. El FVIIIa es proteolíticamente inactivado en este proceso por la Proteína C activada ("aPC") y el Factor IXa y se elimina rápidamente del flujo sanguíneo.

35 [0005] El FVIII concentrado a partir de plasma sanguíneo donado o alternativamente FVIII recombinante se puede dar a los hemofílicos para restaurar la hemostasis. Así, el FVIII también se conoce como factor antihemofílico.

40 [0006] El FVIII tiene una vida media circulatoria de aproximadamente 10-12 horas *in vivo* y por lo tanto es altamente deseable proporcionar análogos de FVIII con una vida media prolongada para reducir la frecuencia de las infusiones de FVIII IV terapéuticas/profilácticas. Neymal *et al.* (Neyman M *et al.*, "Analysis of the spatial and temporal characteristics of platelet-delivered factor VIII-based clots", Blood, vol. 112, no. 4, páginas 1101-1108) revelan un método donde el Factor VIII se dirige a las plaquetas vía su expresión ectópica.

45 [0007] La W02009140598 divulga un concepto que incluye moléculas híbridas que comprenden anticuerpos específicos de FVIII y GPIIb/IIIa. Este concepto puede, no obstante, suponer inhibición de la capacidad de los receptores GPIIb/IIIa para enlazar fibrinógeno y la capacidad para formar un coágulo primario disminuirá así al administrar tales moléculas de FVIII híbridas. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de moléculas de Factor VIII biológicamente activas con una capacidad para enlazar a plaquetas con alta afinidad. Además, existe una necesidad en la técnica de moléculas de Factor VIII biológicamente activas con una capacidad para enlazar a plaquetas mientras se mantiene esencialmente la capacidad de las plaquetas para agregar y formar así un coágulo primario.

50 Resumen de la invención

55 [0008] La presente invención, en su forma más amplia, proporciona una molécula de FVIII que incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a la parte madura de una secuencia de aminoácidos seleccionada de la lista que consiste en SEC ID n°: 1 y SEC ID n°: 3, esta molécula se fija de manera covalente a una molécula específica de las plaquetas, donde dicha molécula específica de las plaquetas es un anticuerpo GPIIb/IIIa que no inhibe la agregación de plaquetas (como se hace referencia en la reivindicación independiente 1). La presente solicitud también proporciona un ácido nucleico que codifica para este tipo de molécula, una célula huésped que comprende dicha molécula de ácido nucleico al igual que un método para producir tal molécula de FVIII, una composición farmacéutica que comprende tal molécula de FVIII y el uso de tal molécula de FVIII como medicamento para el tratamiento de la hemofilia A (como se define en las reivindicaciones independientes). Las formas de realización preferibles se definen en las reivindicaciones dependientes.

60 [0009] Estos y otros aspectos, características y ventajas de la invención se describirán más detalladamente en la presente.

65

Descripción de los dibujos

[0010]

5 La figura 1 ilustra métodos potenciales por los que una scFv se puede unir químicamente a cis o expresar en cis como parte del polipéptido con una secuencia de aminoácidos análoga de FVIII o de FVIII para obtener una molécula de FVIII modificada. Se muestran específicamente la glicoconjugación, la conjugación química y los métodos de proteína de fusión para la producción de tal molécula. Estos métodos se pueden usar de forma similar, donde sea adecuado, para generar otras moléculas de FVIII de la invención.

10 La figura 2 ilustra la agregación plaquetaria. Las barras muestran la agregación en las plaquetas activadas SFLLRN (10 µM) pretratadas con F8-500 AP3-LC-HC scFV-Δa3 (AP3-N8) o ReoPro®. Se muestran datos como error estándar de la media de determinaciones duplicadas en las que SFLLRN (10 µM) solo se estableció como 100 %.

15 La figura 3 ilustra el vector dirigido final.

20 La figura 4 ilustra la unión de AP3-N8 2097 (A) y AP3-N8 MZ1 (C) a plaquetas humanas de manera dosisdependiente. La unión de ambos compuestos se puede completar casi completamente con AP3-LC-HC scFV-FLAG (SEC ID nº 21) en exceso.

Descripción de la invención

25 [0011] En el contexto de esta invención, una proteína de Factor VIII (o proteína de FVIII) es una proteína que incluye una secuencia de aminoácidos que muestra al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada de Factor VIII humano (SEC ID nº: 1) o la parte madura de la misma (es decir, los residuos 20-2351 de la misma), o la parte activada de trombina de la misma, o una versión con el dominio B eliminado/truncado de la misma, como se muestra más adelante.

Factor VIII (SEC ID nº: 1)

30

[0012]

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRPVPS-
 FPFNTSVVYKKTFLVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASH-
 PVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHYVWQVLKENGPMASDPLCLTY-
 SYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVF-
 DEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVY-
 WHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ-
 TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLT-
 DSEMDVVRFDNNSPFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRYSYKSQYLN-
 NGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYGEVGDLLIIFKNQASRPYNI-
 YPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSS-
 FVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYL TENI-
 QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTD-
 FLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFM SMENPGLWILGCHNSDFRNRG-
 MTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPEN-
 DIEKTDPWFAHRTMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDP-
 SPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHS GDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLD-
 FKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLD TT LFGKKSSPLTESGG-
 PLSLSEENNSKLLSGLMNSQESS-
 WGKNVSSSTESGRLFKKGKRAHGPALLTKDNALFKVSI SLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPS
 VWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEG-
 PIPDAQNPDM SFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGP-
 SPKQLVSLGPEKSV EGQNFLSEKNKVVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLF LTNLD-

NLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVWLPQIHVTVTGKNFMKNLFLSTRQNVESYDGA-
 YAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISP-
 NTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQI-
 DYNĒKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRK-
 KDSGVQESSHFLQGAKKNLNSLAILTLEMTGDQREVGSGLTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSG
 KVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTĒGAIK-
 WNEANRPGKVPFRLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFFKKD-
 TILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRT-
 TLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFI-
 AAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKWFQEFDTGDSFTQPLYRGELNEH-
 LGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETK-
 TYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQE-
 FALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIM-
 DTLPLGLVMAQDQRIRWYLLSMGSENENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM-
 LPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAP-
 KLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLD-
 GKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIARYIRLHPHYSIRSTLR-
 MELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNP-
 KEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISS-
 QDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRI-
 HPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

Factor VIII con el dominio B eliminado (SEC ID nº: 2)

5 [0013]

MQIELSTCFFLCLLRFCSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKS-
 PPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASH-
 PVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTY-
 SYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVF-
 DEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVY-
 WHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ-
 TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLT-
 DSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLN-
 NGPQRIGRKYKKVRFMAYTDEFKTRAIQHESGILGPLYGEVGDLLIIFKNQASRPYNI-
 YPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSS-
 FVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYL TENI-
 QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLQSLVCLHEVAYWYILSIGAQTD-
 FLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLPFSGETVFM SMENPGLWILGCHNSDFRNRG-

Factor VIII con el dominio B truncado ("N8") (SEC ID nº: 3)

[0014]

MQIELSTCFFLCLLRFCSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPS-
 PPFNTSVVYKKTFLVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASH-
 PVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTY-
 SYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVF-
 DEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVY-
 WHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ-
 TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLT-
 DSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEDWDYAPLVLAPDDRYSYKSQYLN-
 NGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYGEVGDLLIIFKNQASRPYNI-
 YPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSS-
 FVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTEI-
 QRFPLNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQT-
 FLSVFFSGYTFKHKMVEYEDTLTLPFFSGETVFM MENPGLWILGCHNSDFRNRG-
 MTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSONPPVLKRHQREI-
 TRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFI-
 AAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKWFQFTDGSFTQPLYRGELNEH-
 LGLLGPYIRAEVEDNIMVTRFNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKKNFVKPNETK-
 TYFWKVQHMHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLCHTNTLNPAHGRQVTVQE-
 FALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIM-
 DTLPLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM-
 LPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFOITASGQYQWAP-
 KLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIMYSLD-
 GKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIIFNPIIARYIRLHPHYSIRSTLR-
 MELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNP-
 KEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYKFLISS-
 QDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRI-
 5 HPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

[0015] En un aspecto más particular, la invención se refiere a derivados de FVIII dirigidos que muestran al menos
 aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos
 10 aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95% de identidad con la SEC ID n°: 1 o la parte madura o la parte
 activada de trombina de la misma, o una versión con el dominio B eliminado/truncado de la misma.

[0016] En otro aspecto más particular, la invención se refiere a derivados de FVIII dirigidos que muestran al menos
 aproximadamente 90% de identidad (tal como al menos aproximadamente 93% de identidad) con SEC ID n°: 1, SEC ID
 15 n°: 2, o la parte madura o la parte activada de trombina de la misma, o una versión con el dominio B eliminado/truncado
 de la misma.

[0017] En otro aspecto, la invención proporciona derivados de FVIII dirigidos que muestran al menos aproximadamente
 95% de identidad con SEC ID n°: 1 o la parte madura o la parte activada de trombina de la misma. En aspectos más
 20 particulares, la invención proporciona derivados de FVIII dirigidos que muestran al menos aproximadamente 96%, al
 menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 98,5%, al menos
 aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 99,5%, o al menos aproximadamente 99,7%, al menos

aproximadamente 99,8%, o incluso al menos aproximadamente 99,9% de identidad con SEC ID n°: 1 o la parte madura de la misma, o la parte activada de trombina de la misma, o una versión con el dominio B eliminado/truncado de la misma. Dicho de otra manera, en un aspecto, la invención proporciona derivados de FVIII dirigidos caracterizados por el hecho de que incluyen una secuencia de aminoácidos en la que al menos 1, típicamente al menos 2-3, frecuentemente al menos 1-5 y comúnmente al menos 1-20 (tal como 1-15, 1-12, 1-10, 1-7, 1-3, 2-20, 2-15, 2-12, 2-10, 2-7, 2-5, 3-20, 3-15, 3-12, 3-10, 3-7, 3-5, 4-20, 4-15, 4-12, 4-10, 4-7, 5-20, 5-15, 5-12, 5-10 o 5-7) residuos de aminoácidos están eliminados, insertados y/o sustituidos con respecto a la SEC ID n°: 1, o la parte madura o la parte activada de trombina de la misma o una parte con el dominio B eliminado/truncado de la misma.

[0018] Comúnmente, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, tal como aproximadamente 75% o más, aproximadamente 80% o más, aproximadamente 85% o más, aproximadamente 90% o más, o incluso aproximadamente 95% o más (tal como al menos aproximadamente 97%, 98%, 99%, 99,3%, 99,5%, 99,7%, 99,8%) de las sustituciones en la secuencia "análoga" de FVII se pueden caracterizar como "sustituciones conservadoras". Las sustituciones conservadoras pueden estar definidas por sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en una o más de las siguientes tres tablas de clasificación de aminoácidos:

Tabla 1 - clases de residuo de aminoácido para sustituciones conservadoras

Clase de aminoácidos	Residuos de aminoácidos
Residuos ácidos	ASP y GLU
Residuos básicos	LYS, ARG y HIS
Residuos sin carga hidrofílica	SER, THR, ASN y GLN
Residuos sin carga alifática	GLY, ALA, VAL, LEU y ILE
Residuos sin carga no polar	CYS, MET y PRO
Residuos aromáticos	PHE, TYR y TRP

Tabla 2 - grupos de sustitución de residuos de aminoácidos conservadores alternativos

1	Alanina (A)	Serina (S)	Teonina (T)
2	Ácido aspártico (D)	Ácido glutámico (E)	
3	Asparagina (N)	Glutamina (Q)	
4	Arginina (R)	Lisina (K)	
5	Isoleucina (I)	Leucina (L)	Metionina (M)
6	Fenilalanina (F)	Tirosina (Y)	Triptófano (W)

Tabla 3 - otras clasificaciones físicas y funcionales alternativas de residuos de aminoácidos

Residuos que contienen grupo alcohol	S y T
Residuos alifáticos	I, L, V y M
Residuos asociados al cicloalqueno	F, H, W e Y
Residuos hidrofóbicos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Residuos cargados negativamente	D y E
Residuos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Residuos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T y V
Residuos muy pequeños	A, G y S

Residuos implicados en la formación a su vez	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Residuos flexibles	E, Q, T, K, S, G, P, D, E y R

- [0019] Los reagrupamientos de sustitución de residuos de aminoácidos incluso más conservadores incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Los grupos adicionales de aminoácidos se pueden formular también utilizando los principios descritos en, por ejemplo, Creighton (1984) 5 PROTEINS: STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES (2d Ed. 1993), W.H. Freeman and Company. En algunos casos puede ser útil caracterizar además sustituciones basadas en dos o más de tales características (p. ej., la sustitución con un residuo "polar pequeño", tal como un residuo Thr, pueden representar una sustitución altamente conservadora en un contexto apropiado).
- [0020] Los términos, "dirigido", "dirección" y similares se utilizan para indicar que la molécula de FVIII se enlaza a una o 10 más moléculas biológicas (típicamente otras proteínas y frecuentemente receptores celulares) y/o células con mayor afinidad y/o aidez que el FVIII de tipo salvaje (o que no están típicamente enlazadas por FVIII de tipo salvaje). Como ya se ha mencionado, las moléculas dirigidas proporcionadas por la invención pueden mostrar estabilidad aumentada en comparación con una proteína no modificada correspondiente (una proteína que carece de un "factor dirigido" que 15 normalmente es una secuencia de aminoácidos (un dominio dirigido) o molécula (una fracción dirigida), pero por lo demás es idéntica a la proteína de FVIII dirigida). En un aspecto particular, las moléculas dirigidas que muestran estas u otras propiedades deseables/modificadas están provistas donde una o más actividades biológicas de FVIII no están significativamente disminuidas (p. ej., unión a Factor IX). Típicamente, la cantidad de inhibición de tal actividad es de aproximadamente 40% o menos, aproximadamente 30% o menos, aproximadamente 25% o menos, aproximadamente 20% o menos, aproximadamente 15% o menos, aproximadamente 10% o menos, aproximadamente 7% o menos, 20 aproximadamente 5% o menos, o aproximadamente 3% o menos). Los ensayos para actividad biológica de FVIII se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Mikaelsson *et al.*, Semin Hematol. 2001 Apr;38(2 Suppl 4):13-23).
- [0021] El término "capacidad reducida para enlazar a vWF" abarca en este caso las variantes de Factor VIII, donde la 25 capacidad para enlazar a vWF está disminuida en al menos 50%, preferiblemente en al menos 60%, más preferiblemente en al menos 70%, más preferiblemente en al menos 80%, más preferiblemente en al menos 90% y de la forma más preferible en aproximadamente 100%. La unión de FVIII a vWF se puede medir bien por un ensayo tipo ELISA o como unión directa a vWF inmovilizado usando la resonancia de plasmón de superficie. La región de Factor VIII responsable de la unión a vWF es la región que abarca los residuos 1670-1684, como se describe en la EP0319315. 30 Está previsto que los mutantes puntuales y/o por delección de Factor VIII que implican esta área modificarán la capacidad para enlazar con vWF. Ejemplos de mutaciones puntuales particularmente preferidas según la presente invención incluyen variantes que comprenden las siguientes mutaciones puntuales: Y1680F, Y1680R, Y1680N, Y1680C y E1682T.
- [0022] Grupo lateral: las moléculas de Factor VIII según la presente invención se pueden conjugar con un grupo lateral 35 que no sea un anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor (es decir, un anticuerpo que no inhiba la agregación de plaquetas). En este sentido, un "grupo lateral" debe entenderse como una fijación covalente de cualquier fracción que no sea naturalmente parte de la molécula de Factor VIII. Preferiblemente, dicho grupo lateral proporciona a la molécula de Factor VIII una vida media circulatoria prolongada. La conjugación de una cadena lateral puede ser en forma de proteína de fusión y/o conjugación química y/o procesos de conjugación enzimática. La cadena lateral según la presente 40 invención se selecciona típicamente a partir de uno o más de la lista que consiste en: polímeros hidrofílicos, ácidos grasos y derivados de los mismos (a veces denominados "ligantes de albúmina"), albúmina, transferrina, péptidos tipo elastina, dominios Fc aislados, fragmentos de vWF, anticuerpos, al igual que fragmentos de los mismos que comprendan secuencias de unión al antígeno. Ejemplos de anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos, o fragmentos de los mismos, con capacidad para enlazar a componentes sanguíneos con una vida media circulatoria relativamente 45 larga, tal como por ejemplo eritrocitos, plaquetas, fibrinógeno, etc., o enlazar a la pared del vaso, por ejemplo, colágeno.
- [0023] Sin pretender imponer ninguna teoría, se prevé que la razón por la que funciona más eficazmente para unir 50 grupos laterales a moléculas de Factor VIII con capacidad de enlace a vWF reducida mejor que unir grupos laterales a moléculas de Factor VIII con capacidad de enlace a vWF normal es que el tamaño relativo del grupo lateral es relativamente pequeño en el complejo grande Factor VIII/vWF. Se ha planteado la hipótesis de que un grupo lateral relativamente grande funcione más eficazmente en la protección del Factor VIII libre de la eliminación. También se ha planteado la hipótesis de que la vida media del FVIII esté relacionada con la del vWF. Las moléculas de FVIII con capacidad reducida para enlazar a vWF lo más probable es que hayan expuesto epítomos de aclaramiento que 55 normalmente hayan sido protegidos por vWF. Al unir grupos laterales se tiene la hipótesis de esta "protección de alargamiento" se puede recuperar. En otros casos, la unión de grupos laterales tales como por ejemplo fragmentos de anticuerpos puede funcionar mediante la unión, por ejemplo, de la molécula a proteínas, células o plaquetas con una vida media circulatoria relativamente larga. En relación con las moléculas de FVIII según la presente invención, tales moléculas pueden además estar dirigidas a las plaquetas de forma más eficaz si la parte de FVIII de la molécula tiene 60 una capacidad reducida para enlazar a vWF.

5 [0024] Polímero hidrofílico: el grupo de modificación/polímero hidrofílico según la presente invención preferiblemente se produce de forma no natural. En un ejemplo, el "grupo de modificación que se produce de forma no natural" es un grupo de modificación polimérico en el que al menos una fracción polimérica se produce de forma no natural. En otro ejemplo, el grupo de modificación que se produce de forma no natural es un carbohidrato modificado. El locus de funcionalización con el grupo de modificación se selecciona de manera que éste no evite que el "azúcar modificado" se adicione enzimáticamente a un polipeptídico. "Azúcar modificado" también se refiere a cualquier fracción mimética de glicosil que se funcionalice con un grupo modificador y que sea un sustrato para una enzima modificada o natural, tal como una glicosiltransferasa.

10 [0025] El grupo modificador polimérico añadido a un polipéptido puede alterar una propiedad de tal polipéptido, por ejemplo, su biodisponibilidad, actividad biológica o su vida media en el cuerpo. Los polímeros de ejemplo según la invención incluyen polímeros solubles en agua que pueden ser lineales o ramificados y pueden incluir una o más fracciones poliméricas independientemente seleccionadas, tales como poli(alquileno glicol) y derivados del mismo. El grupo modificador polimérico según la invención puede incluir un polímero hidrosoluble, por ejemplo poli(etileno glicol) y derivados del mismo (PEG, m-PEG), poli(propileno glicol) y derivados del mismo (PPG, m-PPG) y similares.

20 [0026] El término "hidrosoluble" se refiere a fracciones que tienen algún grado detectable de solubilidad en agua. Los métodos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua se conocen en la técnica. Los polímeros hidrosolubles de ejemplo según la invención incluyen péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos) y similares. Los péptidos pueden tener secuencias mezcladas y estar compuestos por un único aminoácido, por ejemplo, poli(lisina). Un polisacárido de ejemplo es poli(ácido siálico). Un poli(éter) de ejemplo es poli(etileno glicol), por ejemplo, m-PEG. La poli(etileno imina) es una poliamina de ejemplo y el ácido poli(acrílico) es un poli(ácido carboxílico) representativo.

25 [0027] La estructura polimérica del polímero hidrosoluble según la invención puede ser poli(etileno glicol) (es decir, PEG). El término PEG en relación con la presente invención incluye poli(etileno glicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo alcoxi PEG, PEG difuncional, PEG multibrazo, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante (es decir, PEG o polímeros relacionados con uno o más grupos funcionales colgantes de la estructura del polímero), o PEG con enlaces degradables del mismo.

30 [0028] La estructura del polímero puede ser lineal o ramificada. Las estructuras del polímero ramificado generalmente se conocen en la técnica. Típicamente, un polímero ramificado tiene una fracción de núcleo de derivación central y una pluralidad de cadenas de polímero lineal enlazadas al núcleo de la derivación central. PEG se usa comúnmente en formas ramificadas que se pueden preparar por adición de óxido de etileno a varios polioles, tales como glicerol, pentaeritritol y sorbitol. La fracción de derivación central se puede derivar también de diferentes aminoácidos, tales como lisina o cisteína. En un ejemplo, el poli(etileno glicol) ramificado se puede representar de forma general como R(-PEG-OH)_m, donde R representa la fracción de núcleo, tal como glicerol o pentaeritritol, y m representa el número de brazos. Las moléculas de PEG multibrazo, tales como las descritas en la patente estadounidense n°: 5 932 462, que se incorpora en este caso por referencia en su totalidad, también se pueden usar como la estructura del polímero.

40 [0029] Muchos otros polímeros son también adecuados para la invención. Las estructuras poliméricas que son no peptídicas e hidrosolubles son particularmente útiles en la invención. Ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, otros poli(alquileno glicoles), tales como poli(propileno glicol) ("PPG"), copolímeros de etilenoglicol y propilenglicol y similares, poli(oxetilado poliol), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxipropilmetacrilamida), poli([alfa] hidroxí ácido), poli(alcohol de vinilo), polifosfazona, polioxazolona, poli(N-acriolmorfolina), tal como se describe en la patente estadounidense n°: 5 629 384, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad, al igual que los copolímeros, terpolímeros y sus mezclas derivadas.

50 [0030] Aunque el peso molecular de cada cadena de la estructura del polímero puede variar, típicamente se encuentra en el rango de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 160 000 Da, tal como por ejemplo de aproximadamente 5 000 Da a aproximadamente 100 000 Da. Más específicamente, el tamaño de cada polímero hidrofílico conjugado según la presente invención puede variar de aproximadamente 500 Da a aproximadamente 80 000 Da, tal como por ejemplo de aproximadamente 1000 Da a aproximadamente 80 000 Da; de aproximadamente 2000 Da a aproximadamente 70 000 Da; de aproximadamente 5000 a aproximadamente 70 000 Da; de aproximadamente 5000 a aproximadamente 60 000 Da; de aproximadamente 10 000 a aproximadamente 70 000 Da; de aproximadamente 20 000 a aproximadamente 60 000 Da; de aproximadamente 30 000 a aproximadamente 60 000 Da; de aproximadamente 30 000 a aproximadamente 50 000 Da; o de aproximadamente 30 000 a aproximadamente 40 000 Da. Debe entenderse que estos tamaños representan estimaciones más que medidas exactas. Según una forma de realización preferida, las moléculas según la invención se conjugan con una población heterogénea de polímeros hidrofílicos, tal como por ejemplo PEG de un tamaño de por ejemplo 10 000, 40 000 u 80 000 Da +/- aproximadamente 5000, aproximadamente 4000, aproximadamente 3000, aproximadamente 2000 o aproximadamente 1000 Da.

Conjugados ligantes de albúmina/grupos laterales

65 [0031] Se sabe que las propiedades *in vivo* de tales proteínas se pueden mejorar mediante el uso de cadenas laterales de unión de albúmina. Tales cadenas laterales, o ligantes de albúmina, se puede fijar a la proteína antes de la

administración y pueden, por ejemplo, estabilizar la proteína *in vivo* o mejorar o extender la vida media *in vivo* de la proteína.

5 [0032] El ligante de albúmina puede así promover la circulación del derivado con el flujo sanguíneo. El ligante de albúmina puede tener el efecto de extender o postergar el tiempo de acción de la proteína que está ligada a éste, debido al hecho de que los complejos del derivado peptídico y la albúmina sólo se desintegran lentamente para liberar el ingrediente farmacéutico activo. Así, un sustituyente preferido, o cadena lateral, como conjunto se puede denominar como una fracción de unión de albúmina.

10 [0033] El ligante de albúmina (fracción de unión de albúmina) puede comprender una parte que es particularmente importante para la unión de albúmina y así la dilación de la circulación en el flujo sanguíneo, esta parte se puede denominar, por consiguiente, fracción de dilación. La fracción de dilación está preferiblemente en el extremo opuesto de la fracción de unión de albúmina, o cerca de éste, en comparación con su punto de fijación al péptido.

15 [0034] En una forma de realización preferida, el ligante de albúmina es, o comprende, una cadena lateral que es capaz de formar complejos no covalentes con la albúmina. El ligante de albúmina puede enlazar albúmina de manera no covalente y/o reversiblemente. El ligante de albúmina puede enlazar albúmina específicamente. Como se desprende de los métodos descritos más adelante, el ligante de albúmina puede ligar ciclodextrina. El ligante de albúmina puede ligar ciclodextrina de manera no covalente y/o reversiblemente. El ligante de albúmina puede ligar ciclodextrina específicamente.

20

[0035] La otra parte de la fracción de unión de albúmina, es decir, la parte entremedias de la fracción de dilación y el punto de fijación al péptido, se puede denominar fracción enlazadora, enlazador, separador o similar. No obstante, la presencia de tal enlazador es opcional y, por lo tanto, la fracción de unión de albúmina puede ser idéntica a la fracción de dilación. En formas de realización particulares, la fracción de unión de albúmina y/o la fracción de dilación es lipofílica y/o está cargada negativamente a pH fisiológico (7,4).

25

[0036] La fracción de unión de albúmina y/o la fracción de dilación pueden estar fijadas de manera covalente a un grupo amino del péptido por química de conjugación, tal como por alquilación, acilación o formación de amida; o a un grupo hidróxilo, tal como por esterificación, alquilación, oximación. En una forma de realización preferida, un éster activo de la fracción de unión de albúmina y/o la fracción de dilación está enlazado de manera covalente a un grupo amino de un residuo de ácido siálico o un derivado de ácido siálico, bajo formación de un enlace amida (este proceso se denomina acilación). A menos que se especifique de otra manera, cuando se hace referencia a una acilación de una proteína, se entiende que se hace a un grupo amino enlazado con un residuo de ácido siálico en una glicoproteína.

30

[0037] Para los fines presentes, los términos, "fracción de unión de albúmina", "fracción de dilación" y "enlazador" incluyen tanto las formas no reaccionadas como las formas reaccionadas de estas moléculas. Si se refiere o no a una u otra forma se entiende por el contexto en el que se usa el término. La fracción de unión de albúmina puede ser o puede comprender un ácido graso o diácido graso o un derivado o cualquiera de ellos. El término "ácido graso" se refiere a ácidos monocarboxílicos alifáticos que tienen de 4 a 28 átomos de carbono, tal como 16 átomos de carbono. Es preferiblemente no ramificado y/o incluso numerado y puede ser saturado o insaturado. El término "ácido digraso" se refiere a ácidos grasos, tal como se han definido anteriormente, pero con un grupo ácido carboxílico adicional en la posición omega. Así, diácidos grasos son ácidos dicarboxílicos. La nomenclatura es como es usual en la técnica, por ejemplo -COOH, al igual que HOOC-, se refiere a carboxi; -C₆H₄ - a fenileno; -CO-, al igual que -OC-, a carbonilo (O=C<) y C₆H₅-O- a fenoxi. En una forma de realización preferida, la fracción enlazadora, si está presente, tiene de 2 a 80 átomos C, preferiblemente de 5 a 70 átomos C. En formas de realización preferidas adicionales, la fracción enlazadora, si está presente, tiene de 4 a 20 heteroátomos, preferiblemente de 2 a 40 heteroátomos, más preferiblemente de 3 a 30 heteroátomos. Ejemplos particularmente preferidos de heteroátomos son átomos N y O. Los átomos H no son heteroátomos.

35

40

45

50

[0038] En otra forma de realización, el enlazador comprende al menos una molécula OEG y/o al menos un residuo de ácido glutámico, o más bien los radicales correspondientes (OEG designa ácido 8-amino-3,6- dioxaoctanoico, es decir, este radical: -NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-). En una forma de realización preferida, la fracción enlazadora comprende un residuo de di-carboxilo enlazado a un residuo de ácido siálico por un enlace amida. En ejemplos preferidos, el residuo de di-carboxilo tiene de 2-30 átomos C, preferiblemente 4-20 átomos C, más preferiblemente 4-10 átomos C. En ejemplos preferidos adicionales, el residuo de di-carboxilo tiene de 0-10 heteroátomos, preferiblemente 0-5 heteroátomos.

55

[0039] En otro ejemplo preferido, la fracción enlazadora comprende un grupo que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo distal enlazado a un residuo de ácido siálico por un enlace amida a través de sus grupos carboxilo distales. En una forma de realización preferida este grupo es un grupo OEG.

60

[0040] El ácido glutámico de aminoácidos (Glu) comprende dos grupos de ácido carboxílico. Su grupo gamma-carboxi se usa preferiblemente para formar un enlace amida con un grupo amino de un residuo de ácido siálico o un derivado de ácido siálico, o con un grupo amino de una molécula OEG, si está presente, o con el grupo amino de otro residuo Glu, si está presente. El grupo amino de Glu, a su vez, forma un enlace amida con el grupo carboxi de la fracción de dilación, o

65

con el grupo carboxi de una molécula OEG, si está presente, o con el grupo gamma-carboxi de otro Glu, si está presente. Esta manera de inclusión de Glu se denomina ocasionalmente de forma abreviada como "gamma-Glu".

[0041] Oligosacáridos N- y O-enlazados: tanto los N-glicanos como los O-glicanos están unidos a las proteínas por las células que producen la proteína. La maquinaria de N-glicosilación celular reconoce y glicosila las señales de N-glicosilación (motivos N-X-S/T) en la cadena de aminoácidos, cuando la proteína naciente se transloca del ribosoma al retículo endoplasmático. Asimismo, los O-glicanos están unidos a sitios de O-glicosilación específicos en la cadena de aminoácidos, pero los motivos que desencadenan la O-glicosilación son mucho más heterogéneos que las señales de N-glicosilación y nuestra capacidad para predecir los sitios de O-glicosilación en las secuencias de aminoácidos sigue siendo inadecuada. Métodos de conjugación de polipéptidos con varios grupos laterales poliméricos se describen, por ejemplo, en la WO0331464.

[0042] La "glicoproteína IIb/IIIa" o "GPIIb/IIIa" es una integrina que se encuentra en las plaquetas. Es un receptor para fibrinógeno y ayuda en la activación de plaquetas. El complejo se forma mediante la asociación calcio-dependiente de GPIIb y GPIIIa, un paso necesario en la agregación plaquetaria normal y la adherencia endotelial. La activación de plaquetas produce un cambio conformacional en los receptores GPIIb/IIIa de plaquetas que induce la unión al fibrinógeno. Un anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor que no inhibe la agregación plaquetaria según la invención no debería estar dirigido a la parte de reconocimiento de fibrinógeno que comprende el bolsillo de unión a ligandos en la cabeza globular de la integrina. Estas partes de la GPIIb/IIIa están directamente implicadas en el reconocimiento de RGD y por lo tanto la unión al fibrinógeno no se entiende completamente. No obstante, en la GPIIIa, se describe que los aminoácidos 109-171 están implicados en la interacción (D'Souza *et al.*, Science 242; 91-93, 1988) mientras que en la GPIIb los aminoácidos de importancia se cree que comprenden los aminoácidos 294-314 (D'Souza *et al.*, JBC 265:6;3440-46, 1990) o los aminoácidos 145-224 (Kamata *et al.*, JBC 271:18610-15, 1996, Tozer *et al.*, Blood 93:918-24 1999, Basani *et al.*, Blood 95:180- 88, 2000). El anticuerpo AP3 no inhibidor según la presente invención se cree que tiene la capacidad de enlazarse a un epítipo situado dentro de los aminoácidos 348-421 de GPIIIa y, consecuentemente, no interfiere con la unión al fibrinógeno (Kouns *et al.* Blood 15;78(12):3215-23, 1991).

[0043] El término "anticuerpo de GPIIb/IIIa", "factor objetivo", como se utiliza en este caso, pretende hacer referencia a las moléculas de inmunoglobulina y fragmentos de las mismas que tienen la capacidad de enlazarse específicamente a la integrina GPIIb/IIIa. Dichos anticuerpos GPIIb/IIIa además enlazan con el receptor de GPIIb/IIIa de una forma esencialmente no inhibidora, lo que significa que la capacidad de las plaquetas para enlazar con el fibrinógeno y para agregar para formar el coágulo primario no disminuye significativamente (tal como por ejemplo, disminuye menos de 20%, 15%, 10%, 5% o 1% en comparación con la adición de un anticuerpo de referencia) en la unión del anticuerpo de GPIIb/IIIa. La agregación plaquetaria se midió por control del cambio en la transmisión de luz a través de una suspensión de plaquetas aisladas. Este método lo describió por primera vez esencialmente Gustav von Born en los años 60 (Born, Nature 1962) y hoy es uno de los métodos más usados para la evaluación de la función de las plaquetas. En resumen, el método mide la capacidad de la luz para atravesar una suspensión de plaquetas. Esta suspensión de plaquetas puede ser tanto plasma rico en plaquetas como plaquetas aisladas. La muestra se ilumina y se mide la cantidad de luz que atraviesa la muestra. Tras la activación, la GPIIb/IIIa cambia su conformación a un estado de alto enlace al fibrinógeno y en presencia de fibrinógeno las plaquetas comenzarán a formar agregados. Esto se registra como un aumento en la transmisión de luz ya que más cantidad de luz atravesará una muestra con pocos agregados grandes que con muchas plaquetas individuales.

[0044] Los anticuerpos de longitud completa comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden estar subdivididas además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes complementarias (CDR), dispersas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el amino-termino hasta el carboxi-termino en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Así, en la definición de un anticuerpo también hay uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para enlazar específicamente con GPIIb/IIIa.

[0045] Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "anticuerpo" incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH I; (ii) los fragmentos F(ab)2 y F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546) que consiste en un dominio VH y (vi) una región determinante complementaria aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH están codificados por genes separados, se pueden unir usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les habilita para estar hechos como una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv) (véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426: and Huston *et al.* (1988) Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Tales anticuerpos monocatenarios están también destinados a estar abarcados dentro del término "anticuerpo".

5 [0046] Otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como los diacuerpos están también abarcados. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una cadena única polipeptídica, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejado entre los dos dominios en la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., *et al.* (1994) Structure 2:1121-1123). Se entiende que la proteína X puede tener uno o más
10 determinantes antigénicos que comprenden (1) determinantes antigénicos peptídicos que consisten en cadenas únicas peptídicas dentro de la proteína X, (2) determinantes antigénicos conformacionales que consisten en más de una cadena peptídica espacialmente contigua cuyas secuencias de aminoácidos respectivas están localizadas de forma inconexa a lo largo de la secuencia polipeptídica de la proteína X y (3) determinantes antigénicos postraduccionales que consisten en estructuras moleculares enteras o parte de éstas fijadas de manera covalente a la proteína X tras la
15 traducción, tal como grupos carbohidrato o similares.

[0047] En otra forma de realización preferida, el anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor es un AP3 o un anticuerpo SZ22 o fragmento del mismo.

20 [0048] Los términos, "anticuerpo humano", "anticuerpos humanos", como se utilizan en este caso, se refieren a anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDRs y en particular la CDR3.

25 [0049] El término "epítipo", como se utiliza en este caso, se refiere a cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se enlaza el anticuerpo. Los determinantes epitópicos usualmente consisten en reagrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, al igual que características de carga específicas.

30 [0050] En general, el anticuerpo GPIIb/IIIa se puede ligar a la secuencia de aminoácidos de FVIII o FVIII análogo de cualquier manera adecuada. Así, por ejemplo, el anticuerpo se puede expresar como parte de una "proteína de fusión" con la secuencia de aminoácidos de FVIII o de FVIII análogo o separadamente unido mediante métodos químicos y/o enzimáticos. En este último respecto, el anticuerpo se puede ligar a la secuencia de FVIII o de FVIII análogo por una transacilación mediada por sortasa o carboxipeptidasa (véase, por ejemplo, Stennicke, International Patent Publication W02006/013202 A2; Hoess *et al.*, International Patent Application WO 2006/015879 A1; Zhang *et al.*, Protein Exp. Purif. (2004) 36, 292-299) para descripción de métodos y principios pertinentes.

35 [0051] En un aspecto, el anticuerpo GPIIb/IIIa se liga a la secuencia de aminoácidos de FVIII o de FVIII análogo (es decir, se "crea genéticamente") de manera que se pueda escindir de la secuencia de FVIII o de FVIII análogo bajo, por ejemplo, por inserción en el dominio B.

40 [0052] En un aspecto, la invención proporciona moléculas de FVIII que comprenden dos o más anticuerpos GPIIb/IIIa o que comprenden un único anticuerpo que específicamente se enlaza a dos o más objetivos. Por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona moléculas de FVIII que comprenden un anticuerpo biespecífico o multiespecífico o un fragmento de anticuerpos. En un aspecto, el anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífico (anticuerpo en toda su longitud o fragmento de anticuerpo) en la que un objetivo del anticuerpo (tal como un "brazo" de un anticuerpo biespecífico) se enlaza específicamente a una parte del dominio B que está incluida en la molécula de FVIII y otra parte se enlaza a un objetivo asociado con las plaquetas y/o los megacariocitos. Ejemplos de anticuerpos específicos del dominio B se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Lavigne-Lissalde *et al.*, THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, Volume: 98, Issue: 1, Pages: 138-147, 2007). Del aspecto del párrafo precedente debe quedar claro que un anticuerpo GPIIb/IIIa puede estar asociado a una secuencia de aminoácidos de FVIII o de FVIII análogo que contiene parte de la molécula de FVIII por otros medios adecuados diferentes de la unión covalente, incluyendo por interacciones no covalentes proteína-proteína, proteína-fracción o fracción-fracción. En otros aspectos, como se describe en otro punto
45 de la presente, un/el anticuerpo GPIIb/IIIa se liga a la secuencia de aminoácidos de FVIII o de FVIII análogo por al menos un enlace covalente. En un aspecto, el anticuerpo GPIIb/IIIa se liga a la secuencia de aminoácidos de FVIII o de FVIII análogo vía un enlace amida (p. ej., en el caso de una "proteína de fusión" de una secuencia de aminoácidos de FVIII y el anticuerpo de GPIIb/IIIa). También debería quedar claro que el enlace a la secuencia de aminoácidos puede ser directo o indirecto. Por ejemplo, el enlace puede comprender un enlazador adecuado, que puede ser una fracción química (ejemplos de ello se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense con el n° de publicación: 20030236190) o una secuencia de aminoácidos, tal como un enlazador Gli(X)Ser(i) flexible. En otro aspecto, el enlace es a través de un glicano que está asociado a un aminoácido de la secuencia de aminoácidos. Incluso tales enlaces de glicano pueden comprender elementos de enlace adicionales, por ejemplo, donde el glicano en sí se derivatiza con un
50 elemento que enlaza a la molécula objetivo.

65

5 [0053] Se apreciará de forma más general que los diferentes aspectos de la invención se pueden combinar de cualquier manera adecuada. Así, por ejemplo, en una faceta, la invención proporciona una molécula de FVIII que comprende una parte de molécula de anticuerpo GPIIb/IIIa biespecífico que se enlaza al dominio B de la molécula de FVIII y un sitio de escisión (que puede ser el sitio de escisión de trombina natural) que permite que se elimine el dominio B de la molécula de FVIII, liberando la parte de molécula de anticuerpo objetivo de la molécula de FVIII activa.

10 [0054] La actividad biológica de una molécula de FVIII de la invención se puede evaluar también fácilmente utilizando métodos rutinarios y conocidos. Por ejemplo, la molécula de FVIII se puede incubar con plaquetas en reposo, las plaquetas ligadas por purificado, por ejemplo, por filtración de gel o centrifugado diferencial, y la molécula de FVIII activada con trombina; tras lo cual se puede visualizar la eficiencia catalítica y la demostración de actividad por ensayos cromogénicos estándar (p. ej., COATEST) o un ensayo de coágulo. La prolongación de la vida media *in vivo* se puede evaluar de forma similar utilizando métodos estándar. Por ejemplo, ratones con hemofilia A (FVIII^{nulo/nulo}) se pueden monitorizar para actividad de FVIII específica por diferentes métodos, incluyendo ensayos de coágulo (ratones FVIII^{nulo/nulo}) o ensayos de actividad de FX. Debe observarse que el método de esta invención, aunque se describe con referencia al Factor VIII humano, se puede aplicar a proteínas de Factor VIII de otros mamíferos, tales como perros, ratones, etc. Tales proteínas se conocen en la técnica y la aplicación de los métodos de la invención a tales homólogos de FVIII y otras especies sólo requiere experimentación rutinaria.

20 [0055] Las moléculas de FVIII de la invención se pueden proporcionar en una dosificación que es similar o algo menor que la cantidad de FVIII típicamente administrada a un sujeto o paciente para el efecto fisiológico deseado pertinente. En general, las formulaciones de FVIII conocidas en la técnica también se pueden usar en la preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de FVIII de la presente invención.

25 [0056] La invención también proporciona un ácido nucleico que codifica una molécula de FVIII de proteína de fusión según la presente invención. El ácido nucleico puede ser cualquier tipo adecuado de ácido nucleico que codifique tal molécula (p. ej., un ssADN, dsADN, o un ARN, que puede comprender varias modificaciones adecuadas conocidas por los expertos en la técnica, tal como una estructura de fosfotioato). Un ácido nucleico puede incluir además elementos de expresión, tales como promotores, potenciadores, secuencias poliA y similares. Tal ácido nucleico se puede incorporar también en un vector adecuado que comprenda incluso otros elementos, tales como genes de resistencia y similares, que pueden ser cualquier tipo adecuado de vector (p. ej., un vector vírico, tal como un vector adenovírico, de poxvirus o vector viral adenoasociado o un vector plásmido). Tales ácidos nucleicos y vectores se pueden incorporar también en células huésped adecuadas para expresión o mantenimiento, que típicamente serán células mamíferas, tales como células COS o HEK. En este y otros aspectos, la invención proporciona un método para producir moléculas de FVIII de la invención y moléculas de FVIII potenciales de la invención.

35 [0057] En una forma de realización preferida, la molécula de FVIII según la invención además ha modulado, preferiblemente reducido, la capacidad enlazante de vWF, preferiblemente porque incluye una sustitución de aminoácidos en la posición 1680, tal como por ejemplo una de las siguientes sustituciones: Y1680F, Y1680R, Y1680N o Y1680C. En otras formas de realización preferidas, la molécula de FVIII según la invención comprende mutaciones de aminoácidos que pueden dar como resultado, por ejemplo, unión modulada a, por ejemplo, LPR, diferentes receptores, otros factores de coagulación, superficies celulares, etc.

45 [0058] En otra forma de realización, la molécula de Factor VIII según la invención está unida de manera covalente al anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor vía un enlazador. Preferiblemente, el enlazador comprende un glicano N-enlazado u O-enlazado en la molécula de FVIII. Según una forma de realización particularmente preferida, el glicano está ubicado en el dominio B de la molécula de Factor VIII según la invención. El dominio B es preferiblemente un dominio B truncado. En una forma de realización preferida particular, el anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor y el FVIII están enlazados a través de un enlazador que conecta el glicano O-enlazado del dominio B de FVIII y un glicano N-enlazado del anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor es un anticuerpo de longitud total. En una forma de realización preferida este anticuerpo de longitud total es un anticuerpo AP3, SEC 1 y 2 o SEC 1 y 3.

55 [0059] En otra forma de realización preferida, el glicano N-enlazado del anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor es parte de la región constante del anticuerpo. En otra forma de realización preferida, el glicano N-enlazado del anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor es parte de la cadena ligera del anticuerpo. El enlazador puede comprender un polímero de polietilenglicol.

[0060] En otra forma de realización preferida, el anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor y el FVIII se enlazan a través de un enlazador que conecta un glicano O-enlazado intacto del dominio B de FVIII y un glicano N-enlazado intacto del anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor.

60 [0061] En una forma de realización preferida diferente, el anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor y el FVIII se enlazan a través de un enlazador que conecta un glicano O-enlazado del dominio B de FVIII y el N-término del anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor. En una forma de realización preferida, el anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor es un fragmento Fab de AP3.

[0062] En otra forma de realización preferida, el anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor y el FVIII se enlazan a través de un enlazador que conecta un glicano O-enlazado del dominio B de FVIII y un residuo Cys del anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor. En una forma de realización preferida, el anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor es un ScFv de AP3.

5 [0063] En otra forma de realización preferida, el anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor y FVIII se enlazan a través de un enlazador que conecta un glicano O-enlazado del dominio B de FVIII y uno o más residuos Lys del anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor. En una forma de realización preferida, el anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor es un anticuerpo de longitud total AP3 (SEC 1 y 2 o SEC 1 y 3).

10 [0064] En otra forma de realización preferida, el anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor se fusiona al dominio B de una molécula de Factor VIII con dominio B truncado según la invención. La presente invención, por lo tanto, también comprende ácidos nucleicos y vectores que codifican tales moléculas, al igual que células huésped que comprenden tales ácidos nucleicos y/o vectores.

15 [0065] En otra forma de realización preferida, el dominio A3 de la molécula de FVIII según la invención se sustituye por el anticuerpo GPIIb/IIIa no inhibidor.

[0066] Según una forma de realización particularmente preferida, la molécula de FVIII según la invención comprende la secuencia como aparece en SEC ID n° 3 y el enlazador comprende un glicano O-enlazado colocado en el dominio B.

20 [0067] Otro aspecto de la invención se refiere a un método para producir una molécula de FVIII según la invención, dicho método comprende la expresión de un ácido nucleico según la invención. Alternativamente, el método según la invención comprende la conjugación de la molécula de FVIII con el anticuerpo GPIIb/IIIa.

25 [0068] Otro aspecto se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula de FVIII según la invención.

[0069] En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una molécula de FVIII según la invención para producir un medicamento para el tratamiento de la hemofilia A.

30 [0070] En un aspecto final, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de la hemofilia A en un huésped mamífero que comprende la administración al huésped de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula según la invención.

35 Construcción

[0071] Todas las referencias, incluyendo las publicaciones, solicitudes de patente y patentes citadas en la presente se incorporan por referencia en su integridad y en la misma medida que si cada referencia se indicara individual y específicamente para ser incorporada por referencia y fuera expuesta en su totalidad en la presente (en la máxima medida permitida por ley), independientemente de cualquier incorporación proporcionada separadamente de documentos particulares hecha en otra parte del documento.

45 [0072] El uso de los términos "un", "uno" y "una" y "el", "la" y referentes similar en el contexto de la descripción de la invención se debe interpretar que abarcan el singular y el plural, a menos que se indique lo contrario o que quede claramente contradicho por el contexto. A menos que se especifique de otro modo, todos los valores exactos proporcionados aquí representan valores aproximados correspondientes (p. ej., todos los valores de ejemplo exactos proporcionados con respecto a un factor o medida particular se puede considerar que también proporcionan una medida correspondiente aproximada, modificada por "aproximadamente", cuando proceda).

50 [0073] La descripción en la presente de cualquier aspecto o forma de realización de la invención que utilice términos tales como "comprende", "tiene", "incluye" o "contiene" con referencia a un elemento o elementos pretende dar apoyo a un aspecto similar o forma de realización de la invención que "consiste en", "consisten esencialmente en" o "comprende sustancialmente" ese elemento particular o elementos, a menos que se especifique de otro modo o se contradiga claramente por el contexto (p. ej., una composición descrita aquí como que comprende un elemento particular debería entenderse como que también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se especifique lo contrario o que se contradiga claramente por el contexto).

60 [0074] Todos los encabezados y subencabezados se usan aquí sólo por conveniencia y no deberían interpretarse como limitativos de la invención de manera alguna. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o el lenguaje ejemplar (p. ej., "tal como") proporcionado aquí se destina meramente a iluminar mejor la invención y no plantea una limitación del ámbito de la invención, a menos que se reivindique de otra manera. Ningún lenguaje en la especificación debería ser interpretado como indicador de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

65 [0075] La mención e incorporación de documentos de patente se hace aquí sólo por conveniencia y no refleja ningún punto de vista de la validez, patentabilidad y/o ejecutabilidad de tales documentos de patente. Esta invención incluye

todas las modificaciones y equivalentes del tema objeto nombrado en las reivindicaciones y/o aspectos incluidos aquí como permite la ley aplicable.

Ejemplos

5

Ejemplo 1

Estructuras de FVIII y socios de fusión

10 [0076] Las proteínas de fusión de la presente invención consisten en una proteína de FVIII (parte de FVIII) unida a un polipéptido (socio de fusión) de otra proteína.

15 [0077] La parte de FVIII de la proteína de fusión puede ser cualquier proteína con actividad de FVIII. La parte de FVIII puede ser una proteína de FVIII con el dominio B eliminado/truncado (BDD), en la que las partes del dominio B de FVIII se han eliminado de la proteína. F8-500 Es una proteína de FVIII BDD humano. Empezando en el N-término, F8-500 consiste en el péptido señal de FVIII (aminoácido 19 a 1) seguido de HC de FVIII sin el dominio B (aminoácido 1-740), un enlazador de 21 aminoácidos (SFSQNSRHPSQNPPVLKRHR) (SEC ID n° 4) y LC de FVIII (aminoácidos 1649-2332 de FVIII humano de tipo salvaje). La secuencia del enlazador de 21 aminoácidos se deriva del dominio B de FVIII y consiste en los aminoácidos 741-750 y 1638-1648 del FVIII humano de tipo salvaje en toda su longitud.

20 [0078] F8-500-Δa3 consiste en F8-500 sin la región A3. En F8-500-Δa3, los aminoácidos 1647-1687 del FVIII humano de tipo salvaje se eliminan de F8-500. Así, el sitio de furina en los aminoácidos 1645-1648 se destruye. Un sitio de furina y trombina combinado se crea, no obstante, por la extensión de los aminoácidos R1645-H1646-P1688-R1689 en F8-500-Δa3. La región a3 es importante para la unión de FVIII a vWF y, por lo tanto, la afinidad de F8-500-Δa3 para vWF se reduce en comparación con el FVIII de tipo salvaje.

25 [0079] F8-500-His consiste en F8-500 con una etiqueta His insertada en el enlazador de F8-500. Así, la secuencia enlazadora de F8-500-His es SFSQNSRHPSHHHHHSQNPPVLKRHR (SEC ID n° 5).

30 [0080] F8-500-Δa3-His consiste en F8-500 sin la región a3 pero con una etiqueta His insertada en el enlazador de F8-500. Así, en F8-500-Δa3-His, los aminoácidos 1647-1687 de FVIII humano de tipo salvaje se han eliminado de F8-500 y la secuencia enlazadora es SFSQNSRHPSHHHHHSQNPPVLKRHR (SEC ID n° 6).

35 [0081] F8-500-Y1680F y F8-500-Y1680C consisten en F8-500 en el que el aminoácido 1680 de FVIII humano de tipo salvaje en toda su longitud se ha cambiado de tirosina a fenilalanina y cisteína, respectivamente. Estos dos reemplazos de aminoácidos reducen la afinidad de FVIII para factor vWF. Además, la sustitución de aminoácidos Y1680C introduce una cisteína libre que se puede usar como un identificador para conjugar fracciones de dilución a la proteína de fusión.

40 [0082] El socio de fusión se puede unir a diferentes posiciones en la parte de FVIII de la proteína de fusión. Ejemplos no limitativos de posiciones en el FVIII para unirse al socio de fusión están en el dominio B o el enlazador derivado del dominio B entre la HC y la LC de FVIII, en la posición de a3, y en el C-término de la LC de FVIII.

Ejemplo 2

45 Construcción de vectores de expresión que codifican estructuras de FVIII y proteínas de fusión

[0083] Las fusiones entre FVIII y los socios de fusión implican todas PCR para amplificar el socio de fusión. Los sitios de restricción se agregan a las extremidades de los cebadores de PCR usados. Las enzimas de restricción se usan para clonar ADNc de socio de fusión o sintetizar ADN en el ADNc de FVIII.

50

[0084] Las fusiones en el dominio B de F8-500 ocurren entre los aa 750 y aa 1638. Los sitios de restricción AvrII, NruI, AgeI y MluI dentro del dominio B o que lo flanquean se usan para insertar el socio de fusión que codifica el ADN.

55 [0085] Para fusiones en el carboxi terminal de cadena ligera de FVIII, el constructo codificante F8-500 se modifica. El sitio BamHI interno (aa 604-606) se elimina por mutagénesis dirigida al sitio y el ADN que codifica el enlazador (GGGS)₆ flexible se inserta en 3' en la región de codificación. Un sitio BamHI nuevo se introduce en el 3' final del enlazador que codifica ADN para facilitar la clonación de los socios de fusión C-terminales entre los sitios BamHI y NotI. Posteriormente, se inserta el ADN del socio de fusión.

60 [0086] Para insertar el socio de fusión que codifica ADN en las posiciones a3 reemplazando así a3 con el socio de fusión en la proteína codificada, el sitio de restricción SacII se introduce en 3' en la región de codificación de a3. Así, el socio de fusión que codifica ADN se puede introducir por inserción entre los sitios AgeI y SacII o entre los sitios AvrII y SacII.

65

Ejemplo 3

AP3 mIgG1 ab de longitud total

[0087] Las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo anti-GPIIa-IIIb, AP3, se amplificaron a partir del ARN aislado de las células de hibridoma que expresan el anticuerpo AP3, usando el equipo de amplificación de ADNc SMART™ RACE (Clontech, Ca, USA). Los cebadores usados para la amplificación de las regiones variables de las dos cadenas de AP3 fueron:

Cadena pesada:

[0088]

Mezcla A de cebador universal (Clontech, CA):

Largo (0,4 µM):

5'-ctaatacgactcactatagggcAAGCAGTGGTATCACGCAGAGT-3' (SEC ID nº 7)

Corto (2 µM):

5'-ctaatacgactcactatagggc-3' (SEC ID nº 8)

Cebador 69 (10 µM)

5'-gctctagactaacactcattcctgttgaagctcttg-3' (SEC ID nº 9)

Cadena ligera

[0089]

Mezcla A de cebador universal (Clontech):

Largo (0,4 µM):

5'-ctaatacgactcactatagggcAAGCAGTGGTATCACGCAGAGT-3' (SEC ID nº 10)

Corto (2 µM):

5'-ctaatacgactcactatagggc-3' (SEC ID nº 11)

Cebador 312 (10 µM)

5'-gtctaccacaacacacgtgac-3' (SEC ID nº 12)

[0090] Las regiones variables se clonaron en el vector pCR4 utilizando el equipo de clonación por PCR para secuenciación Zero Blunt® TOPO® (número de catálogo: K287520, Invitrogen, CA, USA). La región variable de cadena pesada se subclonó posteriormente en los sitios Eco-RI-BamHI de un vector de expresión basado en pTT5 que contenía una estructura IgG1 murina para generar una cadena pesada de AP3 mIgG1. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de AP3 mIgG1 se muestra más adelante. La cadena ligera de AP3 IgK se amplificó del vector pCR4 utilizando el cebador AP-3 LC kl1 sentido (5'-GACTTTTTG- TATGAATTCCTCACCATGAGGTGC-3'; SEC ID nº 13) y un cebador antisentido M13. El fragmento de PCR se subclonó en el sitio EcoRI de un vector de expresión basado en pTT5 vacío. La secuencia de aminoácidos de la proteína de cadena ligera de AP3 mIgK se muestra más adelante. Los dos vectores que codifican el AP3 ab de longitud total se expresaron transitoriamente en células Hek293 6E. Las transfecciones se efectuaron usando 293fectin como agente de transfección (número de catálogo: 12347-019, Invitrogen, CA, USA) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las transfecciones se dejaron durante 5 días antes de cosecharlas.

[0091] Una cisteína problemática potencial en la posición 39 (posición 34 según el sistema de numeración Kabat) se identificó en la cadena ligera del anticuerpo AP3. El residuo de cisteína se mutó con éxito a una serina a través de mutagénesis dirigida al sitio utilizando el equipo de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (número de catálogo: 200518, Stratagene, CA, USA) y los siguientes dos cebadores:

AP3 LC C39S S

5'-caacacttactgtcctgttctgacg-3' (SEC ID nº 14)

AP3 LC C39S AS

5'-ctgcaggaaccaggacaagtaagtgttg-3' (SEC ID nº 15)

5 [0092] La secuencia de la proteína resultante se muestra más adelante. Un AP3 mlgG1 ab de longitud total que contenía la mutación C39S se pudo expresar por combinación de los dos constructos de vector que expresan la SEC ID nº 16 y SEC ID nº 18.

Ejemplo 4

10 Purificación de AP3 FL mlgG1 wt y AP3 FL mlgG1 wt HC LC C39S.

15 [0093] La purificación de las proteínas AP3 FL mlgG1 wt y AP3 FL mlgG1 wt HC LC C39S (ejemplo 3) se llevó a cabo por un proceso de 1 paso compuesto por cromatografía de afinidad utilizando una resina MabSelect SuRe de proteína A (GE Healthcare, nº de catálogo: 17-5438-01). La purificación se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía ÄktaExplorer (GE Healthcare, nº de catálogo: 18-1112-41). Los sistemas de tampón usados para el paso de purificación fueron un tampón de equilibrado compuesto por Tris, 3 M de NaCl, pH 8,5 y un tampón de elución compuesto por 10 mM de ácido fórmico, pH 3,5. El sobrenadante se ajustó a 3 M de NaCl y pH 8,5 antes de aplicarlo a la columna MabSelect SuRe. La columna se lavó con 15 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y la proteína se eluyó isocráticamente en aprox. 1 volumen de columna de tampón de elución. AP3 FL mlgG1 1 wt HC LC C39S se analizó usando SDS-PAGE/Coomassie y SEC-HPLC, mostrando que una proteína pura y homogénea de aprox. 150 kDa (aprox. 50 kDa de componente de cadena pesada y aprox. 25 kDa de componente de cadena ligera) se obtuvo de la purificación con una pureza de >98%, según se midió por SEC-HPLC. Para medir la concentración de proteína final, se usó un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) junto con un coeficiente de extinción de 1,56.

25 [0094] La caracterización del anticuerpo se realizó por análisis LC-MS del mAb intacto reducido. La cadena pesada mostró que contenía glicanos G0F y G1F. La cadena ligera mostró que estaba glicosilada con glicanos biantenarios con un ácido siálico (G2FS) como estructura principal. El tratamiento con sialidasa dio el cambio previsto en los valores de masa de 291 amu, confirmando la presencia de un ácido siálico.

30 [0095] La unión del anticuerpo AP3 FL mlgG1 wt de longitud total a plaquetas en reposo se confirmó por análisis FACS.

SEC ID nº 16: AP3 mlgG1 HC

**QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYN-
KYNENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYG-
NYDYAMDSDWGQGTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQ-
TNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSST-
WPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLT-
PKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIM-
HQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPP-
KEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIM-
DTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK**

35 SEC ID nº 17: AP3 mlgK LC

**DIVMTQAAPSVPVTPGESVSI SCRSSRLLHSNGNTYLCWFLQRPQGQSPQLLI-
YRMSNLAGVPPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIK-
RADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKDI NVKWKIDGS-
ERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTCKDEYERHNNYTCEATHKTSTSPIVKSFN-
RNEC**

40 SEC ID nº 18: AP3 IgK LC C39S

**DIVMTQAAPSVPVTPGESVVSISCRSSRSLLSHNGNTYLSWFLQRPQGSPQLLI-
 YRMSNLAGVPPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIK-
 RADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGS-
 ERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKEYERHNNYTCETHKTSTSPIVKSFN-
 RNEC**

Ejemplo 5

5

Constructos AP3 scFV

10 [0096] Basado en las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo AP3, dos formatos de anticuerpo monocatenarios de AP3 ab (AP3 LC-HC scFV y AP3 HC-LC scFV) se pidieron a MWG biotech, Alemania. La secuencia de aminoácidos de la dos proteínas scFV se indica en SEC ID nº 21 y SEC ID nº 22. La construcción incluyó una región enlazadora (G₄S)₃ de 15 aa introducida entre las dos regiones variables para permitir el correcto emparejado de los fragmentos de V_H y V_L. Una etiqueta Flag se incluyó en el C-término de ambas proteínas para fines de purificación.

15 [0097] Los genes que codifican los dos formatos monocatenarios del AP3 ab se subclonaron posteriormente en el sitio HindIII de un vector de expresión basado en pTT5. Los dos constructos que codifican los dos anticuerpos AP3 monocatenarios se expresaron transitoriamente en células Hek293 6E, usando 293fectin como agente de transfección (número de catálogo 12347-019, Invitrogen, Ca, USA) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Las transfecciones se dejaron durante 5 días antes de la cosecha.

20

[0098] La unión de los dos anticuerpos AP3 monocatenarios AP3-LC-HC scFV-FLAG, AP3-HC-LC scFV-FLAG a GPIIa/IIIB de plaquetas en reposo se confirmó por análisis FACS.

25 [0099] La cisteína problemática potencial en la posición 39 (posición 34 según el sistema de numeración Kabat) identificada en la cadena ligera del anticuerpo AP3 mutó a una serina en el constructo AP3 LC-HC scFV. Esto se realizó utilizando el equipo de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (número de catálogo: 200518, Stratagene, Ca, USA) y siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante y utilizando los siguientes dos cebadores:

30

AP3 LC C39S S

5'-caacactactgtcctcgtggtcctgcag-3' (SEC ID nº 19)

AP3 LC C39S AS

35

5'-ctgcaggaaccaggacaagtaagtgtg-3' (SEC ID nº 20)

[0100] La secuencia de la proteína AP3 LC-HC scFV-FLAG C39S resultante se muestra en SEC ID nº 23.

40

SEC ID nº 21: AP3-LC-HC scFV-FLAG

**DIVMTQAAPSVPVTPGESVVSISCRSSRSLLSHNGNTYLCWFLQRPQGSPQLLI-
 YRMSNLAGVPPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQH-
 LEYPFTFGSGTKLEIKRGGGGSGGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELVLRPGTSVKISCK-
 ASGYFTFTNYWLGWVKQRPGLGLEWIGDIYPGGGYNKYNENFKGKATLTADTSSSTAY-
 MQLSSLTSEDSAVYFCAREYGNVDYAMD SWGQGTSVTVSSDYKDDDDK***

SEC ID nº 22: AP3-HC-LC scFV-FLAG

QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYFTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYN-
 KYNENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYG-
 NYDYAMDSWGQGTSTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQAAPSVPTPGESVSIS-
 CRSSRSLLSHNGNTYLCWFLQRPQGQSPQLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTAFT-
 LRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIKRDYKDDDDK*

SEC ID nº 23: AP3-LC-HC scFV-FLAG C39S

DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSRSLLSHNGNTYLSWFLQRPQGQSPQLLI-
 YRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQH-
 LEYPFTFGSGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLQQSGAELVRPGTSVKISCK-
 ASGYFTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYNKYNENFKGKATLTADTSSSTAY-
 5 MQLSSLTSEDSAVYFCAREYGNIDYAMDSWGQGTSTVSSDYKDDDDK*

[0101] La unión del anticuerpo monocatenario AP3 LC-HC scFV-FLAG C39S a plaquetas en reposo se confirmó por análisis FACS.

10 **Ejemplo 6**

Constructos AP3 scFV-Cys

15 [0102] Para facilitar la conjugación de AP3 LC-HC scFV C39S a FVIII, un residuo Cys libre se introdujo en el scFV por mutagénesis dirigida al sitio. Se fabricaron dos constructos. En un constructo, se introdujo un residuo de cisteína desaparejada en el C-término de la proteína AP3 LC-HC scFV por mutagénesis dirigida al sitio mediante el uso del equipo de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (número de catálogo: 200518, Stratagene, Ca, USA), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante y utilizando los siguientes dos cebadores:

20 AP3 scFV Cys S

5'-cgacgacgacaagtgctgaaagcttctgtacg-3' (SEC ID nº 24)

25 AP3 scFV Cys AS

5'-cgtacgaagcttcagcactgtctgtctg-3' (SEC ID nº 25)

30 [0103] En otro constructo, se introdujo una cisteína desaparejada mediante mutación de una serina en la posición 248 en AP3 LC-HC scFV a cisteína. La cisteína problemática potencial en la posición 39 (posición 34 según el sistema de numeración Kabat) identificada en la cadena ligera del anticuerpo AP3 se mutó posteriormente a una serina utilizando el equipo de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (número de catálogo: 200518, Stratagene, Ca, USA), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante y utilizando los siguientes dos cebadores:

35 Conjunto de cebadores A

[0104]

AP3 scFV LC-HC S248C S

40 5'-gtgaccgtgagctgactacaaggac-3' (SEC ID nº 26)

AP3 scFV LC-HC S248C AS

45 5'-gtcctttagctgcagctcacggtcac-3' (SEC ID nº 27)

Conjunto de cebadores B

[0105]

AP3 LC C39S S

5'-caacactactgtcctggttctgcag-3' (SEC ID nº 28)

5 AP3 LC C39S AS

5'-ctgcaggaaccaggacaagtaagtgttg-3' (SEC ID nº 29)

10 [0106] Todos los constructos AP3 scFV se expresaron transitoriamente en células Hek293 6E. Las transfecciones se efectuaron usando 293fectin como agente de transfección (número de catálogo: 12347-019, Invitrogen, Ca, USA) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Las transfecciones se dejaron durante 5 días antes de la cosecha.

15 [0107] Todos los fragmentos de scFV se purificaron según el siguiente procedimiento:

Ejemplo 7

Purificación y caracterización de proteínas AP3 LC-HC scFV.

20 [0108] La purificación de las proteínas AP3 LC-HC scFV (ejemplos 5 y 6) se llevó a cabo utilizando un proceso de 2 pasos compuesto por cromatografía de afinidad utilizando un gel de afinidad M2 anti-FLAG (Sigma, número de catálogo: A2220) seguido de una columna de gelfiltración Superdex 75pg para eliminar los agregados y otros contaminantes de alto PM si se observaron (GE Healthcare, nº de catálogo: 17-1068-01). La purificación se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía ÄktaExplorer (GE Healthcare, nº de catálogo: 18-1112-41). Los sistemas de tampón usados para el primer paso de purificación fueron un tampón de equilibrado compuesto por 20 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, 0,01% de Tween-80 (v/v), pH 7,5 y un tampón de elución compuesto por 100 mM de glicina, pH 3,5/NaOH. El sobrenadante se ajustó primero a pH 6,7 con 0,5 M de Hepes pH 10,5 o se aplicó directamente sobre una columna de afinidad M2 anti-FLAG preequilibrada. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y la proteína se eluyó isocráticamente en aprox. 2 volúmenes de columna de tampón de elución. La proteína eluida se diluyó 1:1 en 100 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, pH 7,5 y se analizó usando SDS-PAGE/Coomassie y SEC-HPLC. Si se obtuvo una proteína pura (>75%) y homogénea de aprox. 28 kDa del primer paso de purificación, no se llevó a cabo más purificación. Si no, entonces se llevó a cabo el segundo paso de gelfiltración utilizando 20mM de Tris, 1M de NaCl, pH 7,5. Se aplicó entre 2-3,5% de carga y las fracciones que contenían la proteína eluida se analizaron usando SDS-PAGE/Coomassie y SEC-HPLC. Sobre la base de los análisis, se preparó una agrupación con una proteína pura (>80%) y homogénea. Para medir la concentración de proteína final, se usó un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) junto con un coeficiente de extinción de 1,79.

SEC ID nº 30: AP3 LC-HC scFV INS257C FLAG

**DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISSRSRLLHSNGNTYLCWFLQRPQGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIKRGGGGSGGG
GSGGGGSQVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYFTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIY
PGGGYNKYENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYGNYDYAMDSWG
40 QGTSVTVSSDYKDDDDKC**

SEC ID nº 31: AP3 LC-HC scFV C39S S248C FLAG

**DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISSRSRLLHSNGNTYLSWFLQRPQGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIKRGGGGSGGG
GSGGGGSQVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYFTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIY
PGGGYNKYENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYGNYDYAMDSWG
45 QGTSVTVSCDYKDDDDK**

Ejemplo 8

Constructo AP3 Fab

[0109] Una versión truncada de la cadena pesada de AP3 se generó por introducción de un codón de terminación en el constructo que codifica la SEC ID nº 16 usando el equipo de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (nº de catálogo: 200518, Stratagene, Ca, USA) y los siguiente dos cebadores:

5 JP433 AP3 HC Fab S
Cagggattgtggttgaaagccttgcata_g (SEC ID nº 32)

10 JP434 AP3 HC Fab S
Catatgcaaggcttcaaccacaatccctg (SEC ID nº 33)

[0110] La secuencia de la proteína resultante se muestra en SEC 21.

15 [0111] Un fragmento Fab funcional del anticuerpo AP3 se expresó por combinación de los dos constructos que expresan SEC ID nº 18 y SEC ID nº 34. Las dos cadenas se expresaron transitoriamente en células Hek293 6E. Las transfecciones se efectuaron usando 293fectin como agente de transfección (número de catálogo: 12347-019, Invitrogen, Ca, USA) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Las transfecciones se dejaron durante 5 días antes de la cosecha.

20 Purificación y caracterización de la proteína AP3 Fab LC C39S.

[0112] La purificación de la proteína AP3 Fab LC C39S se llevó a cabo utilizando un proceso de 2 pasos compuesto por un intercambio de cationes utilizando Source 30S (GE Healthcare, número de catálogo: 17-1273-01) seguido de una columna de gelfiltración Superdex 75pg (GE Healthcare, número de catálogo: 17-1068-01). La purificación se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía ÄktaExplorer (GE Healthcare, número de catálogo: 17-1068-01). Los sistemas de tampón usados para el primer paso de purificación fueron un tampón de equilibrado compuesto por 10 mM de Na-acetato, pH 5,0 y un tampón de elución compuesto por 10 mM de Na-acetato, 1 M de NaCl, pH 5,0. La cosecha se ajustó a < 3 mS/cm con la adición de milliQ antes del ajuste del pH en pH 5,0 con 0,5 M de HCl y se aplicó a la columna de Source 30S preequilibrada. La columna se lavó con 15 volúmenes de columna de tampón de equilibrado. La proteína se eluyó por un gradiente lineal de tampón de equilibrio y tampón de elución sobre 20 volúmenes de columna. La proteína se eluyó en aproximadamente 8 volúmenes de columna. El segundo paso de purificación de gelfiltración se realizó utilizando 20 mM de Na-fosfato, 150 mM de NaCl, pH 7,2. Se aplicó entre 2-3,5% de carga y la proteína se recogió en 5-7% de un volumen de columna. La proteína AP3 Fab LC C39S se analizó usando SDS-PAGE/Coomassie y SEC-HPLC, lo que mostró que se obtuvo una proteína pura y homogénea de aprox. 50 kDa de la purificación con una pureza aproximada de 91,9%, según se midió por SEC-HPLC. Para medir la concentración de la proteína final, se usó un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) junto con un coeficiente de extinción de 1,67.

40 SEC ID nº 34: AP3 Fab HC

**QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYFTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYN-
KYNENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYG-
NYDYAMD₅SWGQGT₅SVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQ-
TNSMVT₅LGCLVKG₅YFPEPVT₅VTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSST-
WPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCG**

Ejemplo 9

45 Fusiones FVIII-AP3 scFV

[0113] AP3 LC-HC scFV o AP3 HC-LC scFV se fusionó a una variante de FVIII con el dominio B eliminado y el dominio a3 eliminado utilizando las enzimas de restricción Agel y SacII. El FVIII con el dominio B eliminado y el dominio a3 eliminado carece de los aa 751-1637 y aa 1649-1685. Se insertó AP3 LC-HC scFV o AP3 HC-LC scFV entre los aa R1648 y Q1686. La secuencia codificante de AP3 se amplificó por PCR usando cebadores que contenían sitios reconocibles para las enzimas de restricción respectivas, Agel y SacII. La digestión de restricción parcial de los productos PCR se realizó cuando el ADN tiene un sitio Agel endógeno.

55 [0114] Cuando el sitio de furina (RHQR) está situado N-terminal de AP3 scFV, el AP3 scFV constituirá, después del procesamiento, el N-terminal de la cadena ligera de FVIII. El sitio de trombina R1688-R1689 también se conserva y tras la activación de trombina de estas variantes de FVIII el AP3 scFVs es deliberado del FVIII.

Cebadores:

[0115]

AP3-HC-LC-Da3-Agel

5

Aaccaccgggtcttgaacgccatcaacggcaggtccagctgcagcagagc (SEC ID nº 35)

AP3-HC-LC-Da3-SacII

10

Gaaagctccgctctgcccgttgattccagctgg (SEC ID nº 36)

AP3-LC-HC-Da3-Agel

15

Aaccaccgggtcttgaacgccatcaacgggacatcgtgatgaccaggct (SEC ID nº 37)

AP3-LC-HC-Da3-SacII

Gaaagctccgctctgctgctcaggtcacggagg (SEC ID nº 38)

Ejemplo 10

Expresión transitoria de estructuras de FVIII y proteínas de fusión

[0116] Las células HKB11 en una densidad de $0,9-1,1 \times 10^6$ se transfectan con un complejo de plásmido 0,7 mg/l y el agente de transfección, 293Fectin (Invitrogen) 1,4 ml/l. El complejo de transfección se prepara por dilución del plásmido y la transfección separadamente en OPTIMEM (Invitrogen), se mezclan las dos soluciones y se incuba la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos. La mezcla compleja se añade a la suspensión celular y la suspensión se incuba en incubadora de agitación durante 5 días, a $36,5^\circ\text{C}$ y 5 % de CO_2 . La cosecha del cultivo celular se filtra en un filtro de membrana de $0,22 \mu\text{m}$.

30

Ejemplo 11

Procedimiento general para purificación de estructuras de FVIII y proteínas de fusión

[0117] Se rellenó una columna con la resina VIIISelect (GE Healthcare), con las dimensiones 1,6 cm de diámetro y 4 cm de altura del lecho dando 8mL y se equilibró con 20mM de Imidazol + 10mM de CaCl_2 + 0,01% de Tween80 + 250mM de NaCl, pH 7,3 a 500 cm/h. El filtrado de cultivo preparado como se describe en el ejemplo 3 se aplicó a la columna y la columna se lavó posteriormente primero con tampón de equilibrado y luego con 20mM de Imidazol + 10mM de CaCl_2 + 0,01% de Tween80 + 1,5M de NaCl, pH 7,3. El FVIII ligado se eluyó isocrático a 90 cm/h con 20 mM de Imidazol + 10 mM de CaCl_2 + 0,01% de Tween80 + 2,5 M de NaCl + 6,5 M de propilenglicol, pH 7,3. Las fracciones que contenían FVIII se agruparon y diluyeron 1:10 con 20 mM de Imidazol + 10 mM de CaCl_2 + 0,01% de Tween80, pH 7,3 y se aplicaron a una columna rellena con F25-Sepharose (Thim *et al.*, Haemophilia, 2009). La dimensión de la columna fue de 1,6 cm de diámetro y 2 cm de altura de lecho dando 4mL en volumen de columna. La columna se equilibró a 180 cm/h con 20 mM de Imidazol + 10 mM de CaCl_2 + 0,01% de Tween80 + 150 mM de NaCl + 1 M de glicerol, pH 7,3 antes de la aplicación. Después de la aplicación, la columna se lavó primero con tampón de equilibrado y luego con 20 mM de Imidazol + 10 mM de CaCl_2 + 0,01% de Tween80 + 650 mM de NaCl, pH 7,3. El FVIII ligado se eluyó isocrático con 20 mM de Imidazol + 10 mM de CaCl_2 + 0,01% de Tween80 + 2,5 M de NaCl + 50% (v/v) de etilenglicol, pH 7,3 a 30 cm/h. Las fracciones que contenían FVIII se agruparon y diluyeron 1: 15 con 20 mM de Imidazol + 10 mM de CaCl_2 + 0,01% de Tween80, pH 7,3, excepto las variantes de FVIII con delecciones del dominio a3 que se diluyeron 1:45 en el mismo tampón. La agrupación diluida se aplicó a una columna rellena con Poros 50HQ (PerSeptive Biosystem), con las dimensiones de columna 0,5cm de diámetro y 5cm de altura de lecho dando 1mL en volumen de columna. La columna se equilibró a 300 cm/h con 20 mM de Imidazol + 10 mM de CaCl_2 + 0,01% de Tween80 + 50 mM de NaCl + 1 M de glicerol, pH 7,3 antes de la aplicación. La columna se lavó con tampón de equilibrado antes la elución utilizando un gradiente lineal sobre 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado para 20 mM de Imidazol + 10 mM de CaCl_2 + 0,01% de Tween80 + 1 M de NaCl + 1 M de glicerol, pH 7,3. Las fracciones que contenían FVIII se agruparon y la agrupación se almacenó a -80° hasta su uso.

[0118] Las variantes de FVIII con la etiqueta HIS se purificaron esencialmente como se ha descrito anteriormente, no obstante el segundo paso de purificación (F25-Sepharose) se cambió a Chelating Sepharose FF (GE Healthcare) cargada con 2 volúmenes de columna de 1M de NiSO_4 . La dimensión de columna fue de 0,5 cm de diámetro y 5 cm de altura de lecho dando 1 mL de volumen de columna. La columna se equilibró con 30 mM de Imidazol + 10 mM de CaCl_2 + 0,01% de Tween80 + 1,5 M de NaCl, pH 7,3 a 180 cm/h antes de la aplicación. Después de la aplicación, la columna se lavó con 30 volúmenes de columna de tampón de equilibrado antes de la elución usando un gradiente lineal sobre 5 volúmenes de columna para 250 mM de Imidazol + 10 mM de CaCl_2 + 0,01% de Tween80 + 1,5 M de NaCl, pH 7,3. Las fracciones que contenían FVIII se agruparon y diluyeron 1:30 con 20 mM de Imidazol + 10 mM de CaCl_2 + 0,01% de Tween80, pH 7,3. El paso de purificación final (Poros 50HQ) se realizó como se ha descrito anteriormente.

60

65

Ejemplo 12

Purificación y caracterización de fusiones de FVIII- AP3 scFV

5 [0119] La purificación de dicha proteína de fusión AP3 F8 (ejemplo 9) se llevó a cabo utilizando un proceso de 3 pasos compuesto por un paso de cromatografía de inmunoafinidad basado en la resina VIIISelect (GE Healthcare, nº de catálogo: 17-5455-02) seguido de un segundo paso de cromatografía de inmunoafinidad basado en el anticuerpo F25 acoplado a CNBr-Sepharose FF (Thim L, Vandahl B, Karlsson J, Klausen NK, Pedersen J, Krogh TN, Kjalke M, Petersen JM, Johnsen LB, Bolt G, Nørby PL, Steenstrup TD (2009) Purification and characterization of a new recombinant factor VIII (N8) Haemophilia 16: 349-59) y finalmente un paso de cromatografía de intercambio de aniones basado en la resina Poros 50HQ (Applied Biosystems, nº de catálogo: 1- 2559-07). La purificación se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía ÄktaExplorer (GE Healthcare, nº de catálogo: 17- 1068-01). Los sistemas de tampón usados para el primer paso de purificación fueron un tampón de equilibrado compuesto por 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween80, 250 mM de NaCl, pH 7,3, un tampón de lavado compuesto por 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween80, 1,5 M de NaCl, pH 7,3 y un tampón de elución compuesto por 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween80, 1 M de acetato de amonio, 6,5 M de 1,2-propanediol, pH 7,3. La cosecha se diluyó 2 veces con un tampón de dilución compuesto por 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween80, pH 7,3 y se aplicó a la columna VIIISelect preequilibrada. La columna se lavó con 6 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y 6 volúmenes de columna de tampón de lavado. La proteína se eluyó isocráticamente en aprox. 3 volúmenes de columna. Antes del segundo paso de purificación de inmunoafinidad, la agrupación de elución del primer paso de purificación se diluyó 10 veces utilizando el tampón de dilución anteriormente mencionado. Los sistemas de tampón usados para el segundo paso de purificación fueron un tampón de equilibrado compuesto por 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 150 mM de NaCl, pH 7,3, un tampón de lavado compuesto por 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween80, 1,5 M de NaCl, pH 7,3 y un tampón de elución compuesto por 0,5 M de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 150 mM de NaCl, pH 7,3. Tras la aplicación de la muestra a la columna F25-Sepharose FF preequilibrada, la columna se lavó con 6 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y con 6 volúmenes de columna de tampón de lavado. La proteína se eluyó isocráticamente en aprox. 1,5 volúmenes de columna. Antes del tercer paso de purificación de intercambio de aniones, la agrupación de elución del segundo paso de purificación se diluyó 15 veces utilizando el tampón de dilución anteriormente mencionado. Los sistemas de tampón usados para el tercer paso de purificación fueron un tampón de equilibrado compuesto por 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween80, 50 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,2 y un tampón de elución compuesto por 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween80, 1 M de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3. Tras la aplicación de la muestra a la columna Poros HQ50 preequilibrada, la columna se lavó con 8 volúmenes de columna de tampón de equilibrado. La proteína se eluyó de la columna utilizando un gradiente lineal de 0-100% sobre 5 volúmenes de columna seguido de 10 volúmenes de columna de 100% de tampón de elución. La proteína se eluyó de forma temprana en el gradiente, típicamente entre 10-30% de tampón de elución. Los rendimientos se siguieron utilizando un ensayo de FVIII cromogénico COATEST® Factor VIII (Chromogenix, COATEST SP FVIII, nº de catálogo: 82 4086 63) y un espectrofotómetro SpectraMax (Molecular Devices, nº de catálogo: M3). La calidad de la proteína se analizó usando SDS-PAGE/SilverStain y RP-HPLC, que mostró una preparación de proteína pura y homogénea compuesta por cadena ligera, cadena pesada y cadena única. La concentración de proteína final se determinó según los análisis RP-HPLC.

SEC ID nº 39: F8-500 AP3-LC-HC scFV -Δa3

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFNFNTSVVYKKTLFVEFTDHLF-
 NIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYW-
 KASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSH-
 VDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVF-
 DEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVY-
 WHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ-
 TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLT-
 DSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP-
 DDSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDLLI-
 IFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKS-
 DPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVF-
 DENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAY-
 WYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFM MEN PGL-
 WILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRS-
 FSQNSRHPSQNPVVKRHQRDIVMTQAAPSVVTPGESVSI-
 CRSSRLLHSNGNTYLCWFLQRPQGQSPQLLIYRMSNLAGVPDRFSGSGSGTAFT-
 LRISRVEAEDVGVYYCMQH-
 LEYPFTFGSGTKLEIKRGGGGSGGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELVRPGTSVKISCK-
 ASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYNKY NENFKGKATLTADTSSSTAY-
 MQLSSLTSEDSAVYFCAREYGN DYAMDSWGQGT SVTVSSQSPRSFQKKTRHYFI-
 AAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEH-
 LGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKKNFVKPNETK-
 TYFWKVQHMHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG-
 PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDET KSWYFTENMERN-
 CRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNE-
 NIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM-
 LPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRD-
 FQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGK-
 TQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPI-
 IARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFAT-
 WSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKE-
 FLISSSQDGHQWTLFFQNGKV KVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRI-
 HPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFNFNTSVVYKKTFLVEFTDHLF-
 NIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYW-
 KASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSH-
 VDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVF-
 DEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVY-
 WHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ-
 TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLT-
 DSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP-
 DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDLLI-
 IFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKS-
 DPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVF-
 DENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLQSLVCLHEVAY-
 WYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFM SMENPGL-
 WILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRS-
 FSQNSRHPSQNPVVKRHQRQVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWL-
 GWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYNKY NENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSED-
 SAVYFCAREYG-
 NYDYAMDSWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQAAPSVPVTPGESVSIS-
 CRSSRSLLSNGNTYLCWFLQRPQSPQLLIYRMSNLAGVPPDRFSGSGSGTAFT-
 LRISRVEAEDVGVYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIKRQSPRSFQKKTRHYFI-
 AAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVPQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEH-
 LGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNETK-
 TYFWKVQHMHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG-
 PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTFIDETKSWYFTENMERN-
 CRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNE-
 NIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM-
 LPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRD-
 FQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGK-
 TQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPP-
 IARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFAT-
 WSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKE-
 FLISSSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRI-
 HPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

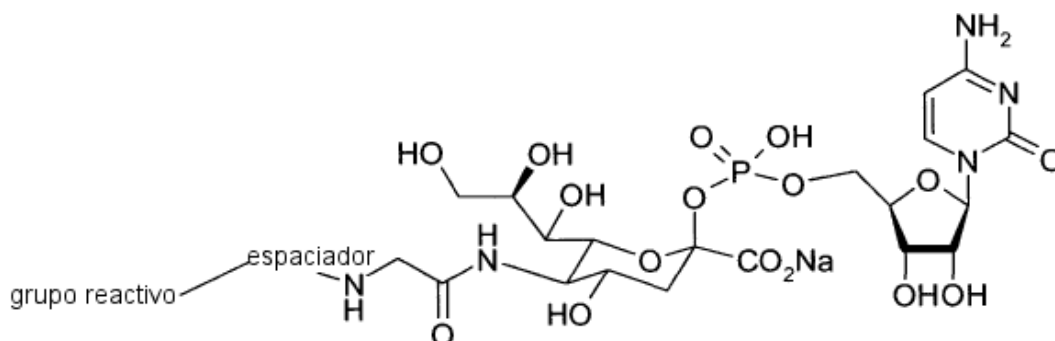
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPPNTSVVYKKTFLVEFTDHLF-
 NIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYW-
 KASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSH-
 VDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVF-
 DEGKSWHSETKNLSMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVY-
 WHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ-
 TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCEPEPQLRMKNNEEAEDYDDDLT-
 DSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP-
 DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDLLI-
 IFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKS-
 DPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVF-
 DENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAY-
 WYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFM SMENPGL-
 WILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRS-
 FSQNSRHPSQVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIG-
 DIYPGGGYNKY NENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYG-
 NYDYAMD SWGQGT SVTVSSGGGGSGGGGGSDIVMTQAAPSVPTPGESVSIS-
 CRSSRLLHSNGNTYLCWFLQRPQGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFT-
 LRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIKRSQNPPVLKRHQREITRT-
 TLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFI-
 AAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEH-
 LGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETK-
 TYFWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG-
 PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERN-
 CRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNE-
 NIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM-
 LPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRD-
 FQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGK-
 TQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPI-
 IARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FAT-
 WSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKE-
 FLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRI-
 HPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPPNTSVVYKKTFLVEFTDHLF-
 NIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYW-
 KASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSH-
 VDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVF-
 DEGKSWHSETKNLSMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVY-
 WHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ-
 TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLT-
 DSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWYOAPLVLAP-
 DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLI-
 IFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKS-
 DPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVF-
 DENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLQLSVCLHEVAY-
 WYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLPFSGETVFM SMENPGL-
 WILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRS-
 FSQNSRHPSDIVMTQAAPSVPVTPGESVSI SCRSSRSLLSNGNTYLCW-
 FLQRPQGQSPQLLIYRMSNLASGV PDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQH-
 LEYPFTFGSGTKLEIKRGGGGSGGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELVRPGTSVKISCK-
 ASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYNKY NENFKGKATLTADTSSSTAY-
 MQLSSLTSEDSAVYFCAREYGN DYAMDSWGQGTSVTVSSSQNPPVLKRHQREITRT-
 TLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFI-
 AAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVPQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEH-
 LGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETK-
 TYFWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG-
 PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDET KSWYFTENMERN-
 CRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNE-
 NIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM-
 LPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRD-
 FQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIK-
 TQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FN PPI-
 IARYIRLHPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FAT-
 WSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKE-
 FLISSSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRI-
 HPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

Ejemplo 13

Paso 1:

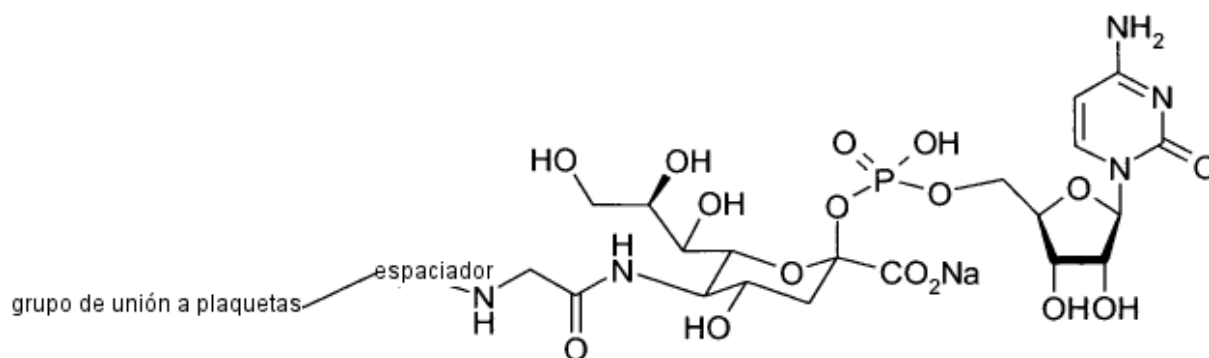
[0120] Un reactivo de la fórmula general



5

donde ejemplos no exclusivos para el grupo reactivo son los grupos que comprenden maleimida, azida, alquinas, aldehídos y un ejemplo no exclusivo para el separador es una fracción de PEG con un peso molecular medio de, por ejemplo, 3 kDa, 5 kDa, 10 kDa o 20 kDa se puede reaccionar con una proteína de unión a las plaquetas, tal como por ejemplo Abciximab o AP3 o proteínas derivadas de Abciximab o AP3, tal como, pero no exclusivamente, por ejemplo, variantes monocatenarias o fragmentos FAB, llevando a un compuesto con la fórmula general del producto intermedio B1.

10



15

PRODUCTO INTERMEDIO B1

[0121] El punto de unión del separador en la proteína de unión a las plaquetas puede depender del tipo de grupo reactivo que se hubo usado para ensamblar un compuesto de la fórmula general del producto intermedio B1. Si, por ejemplo, el grupo reactivo hubiera sido un aldehído, una posibilidad podría ser que el separador se haya fijado a uno de los N-terminales de la proteína de unión a las plaquetas por alquilación reductiva en presencia de NaCNBH_3 . Si, por ejemplo, el grupo reactivo hubiera sido una maleimida, una posibilidad podría ser que el separador se haya unido a una cisteína libre en la proteína de unión a las plaquetas. La cisteína se puede liberar antes de la reacción por tratamiento con un reactivo adecuado, tal como, pero no exclusivamente, por ejemplo, una enzima o hidrócloruro de tris(carboxietil)fosfina.

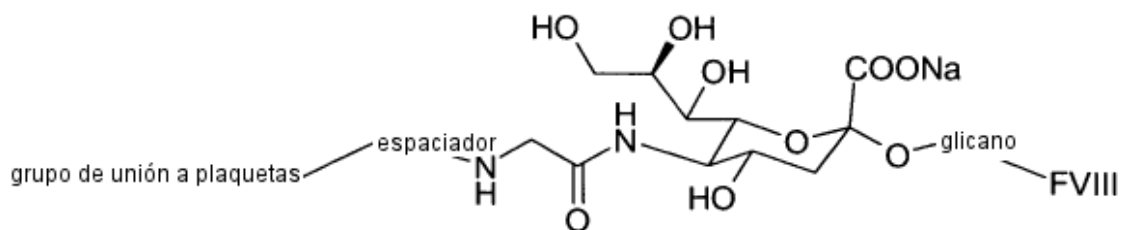
20

25

Paso 2:

[0122] Los ácidos siálicos se pueden eliminar de los glicanos de FVIII por reacción con una sialidasa. El compuesto con la fórmula general del producto intermedio B1 se puede reaccionar en presencia de una enzima adecuada, tal como por ejemplo ST3-Gal-I, cuando se reacciona con un O-glicano de FVIII, o ST3-GalIII, cuando se reacciona con un N-glicano de FVIII, para dar un compuesto de la estructura general de producto:

30



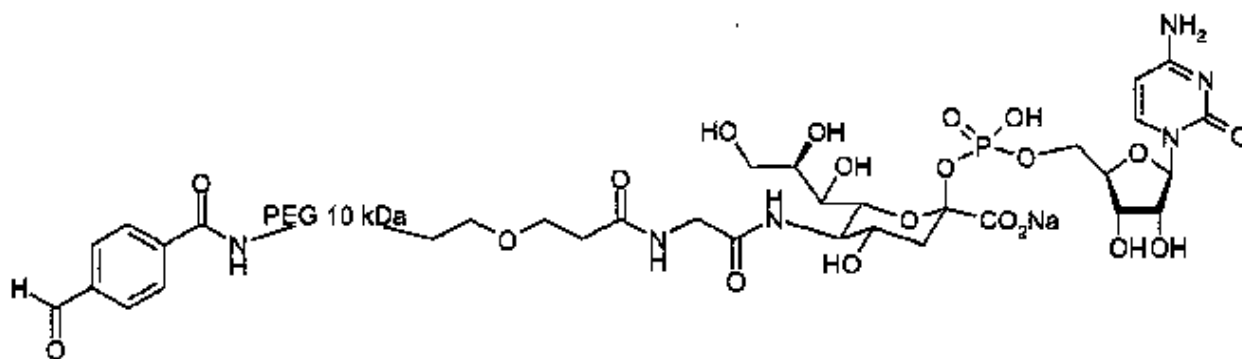
Productos intermedios

Producto intermedio ejemplo 1

5

Ácido *N*-((3-(ω -(4-formilbenzoilamino)10 kDa PEGil)propioniamino)acetil)- O^2 -[5']citidilil- ξ -neuramínico:

[0123]



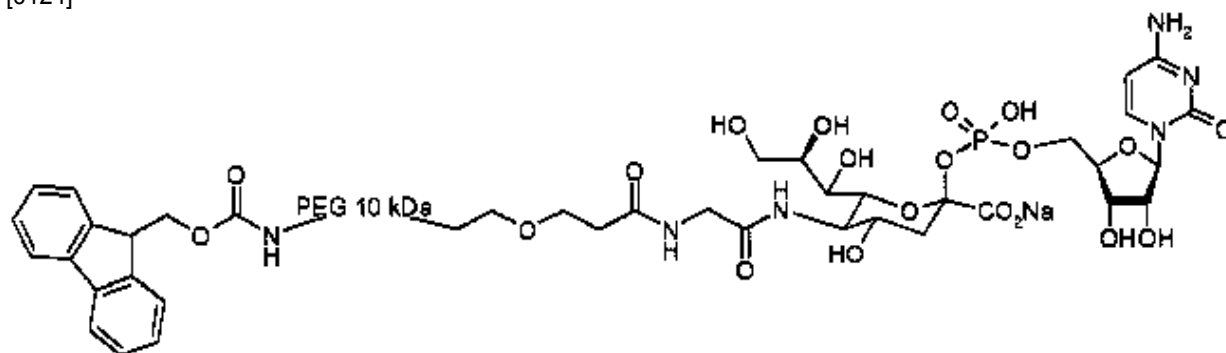
10

Paso 1:

Ácido *N*-((3-(ω -(9H-Fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)10 kDa PEGil)propionilamino)acetil)- O^2 -[5']citidilil- ξ -neuramínico:

15

[0124]



20

[0125] Ácido *N*-(aminoacetil)- O^2 -[5']citidilil- ξ -neuramínico (18 mg, 0,029 mmol) se disolvió en un tampón que consistía en 50 mM de TRIS que se había ajustado a pH 8,9 (4 ml). El pH actual se controló y se ajustó a pH 8,9 por adición de 0,1 N de ácido clorhídrico. Se añadió THF (16 ml). Aproximadamente la mitad de la cantidad final de éster *N*-hidroxisuccinimidílico de ácido 3-(ω -(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)10 kDa PEGil)propiónico (disponible comercialmente en, por ejemplo, Rapp Polymere GmbH, 200 mg en total, 0,019 mmol) se añadió. La mezcla reactiva se agitó a temperatura ambiente. Después de 1 h, la segunda mitad de éster *N*-hidroxisuccinimidílico de ácido 3-(ω -(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)10 kDa PEGil)propiónico se añadió. La mezcla reactiva se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. El THF se eliminó *in vacuo* con una temperatura de baño de 25 °C. La mezcla restante se filtró y se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño, usando un gel G25 con un tamaño de lecho de 26 mm de diámetro y 10 cm de la longitud a un flujo de 7 ml/min, utilizando un tampón de 25 mM de hidrogenocarbonato de amonio. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se agruparon y liofilizaron para dar 453 mg de material

25

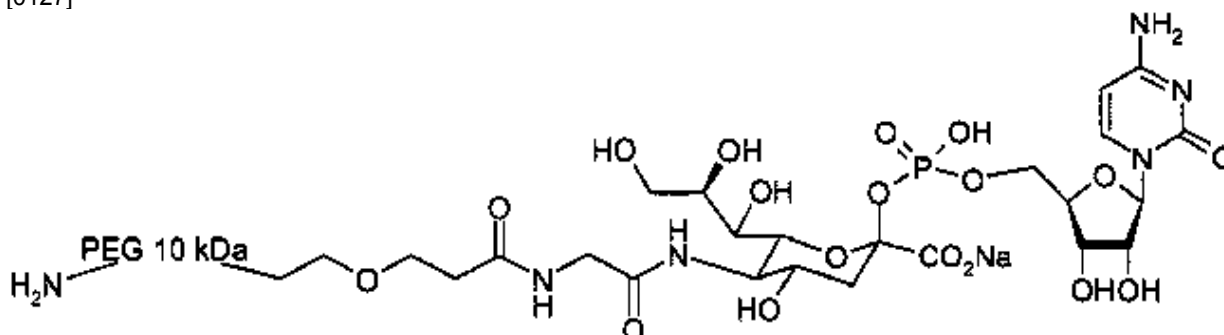
que contenía ácido *N*-((3-(ω-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)10 kDa PEGil) propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico. El espectro ¹H-RMN realizado en DMSO-d₆ mostró la presencia de la fracción de citidilil al igual que la fracción de fluorenil-9-ilmetoxicarbonil. El material se almacenó en el congelador.

5 [0126] Esta reacción se repitió con 1 g de éster *N*-hidroxisuccinimidílico de ácido 3-(ω-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)10 kDa PEGil)propiónico y 90 mg de ácido O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico. La purificación se realizó en una columna C4 HPLC con un diámetro de 2 cm, usando un gradiente de 30-50% de una mezcla que consistía en una solución acuosa de 5 mM de hidrogenocarbonato de amonio en acetonitrilo en una solución de 50 mM de hidrogenocarbonato de amonio en agua. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se recogieron y se liofilizaron para dar 288 mg del compuesto deseado. El espectro ¹H-NMR correspondía al espectro ¹H-NMR encontrado en el experimento anteriormente descrito.

Paso 2:

15 Ácido *N*-((3-(ω-Amino10 kDa PEGil)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico

[0127]

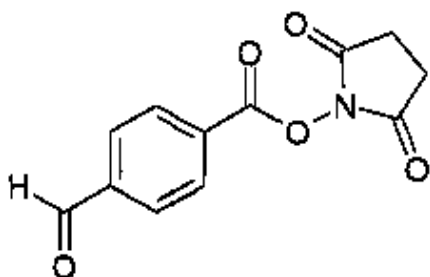


20 [0128] Ácido *N*-((3-(ω-9H-Fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)10 kDa PEGil)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico (453 mg) se disolvió en *N,N*-dimetilformamida (12 ml). Se añadió piperidina (1,25 ml). La solución clara se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. Se añadió éter (200 ml). La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 1,5 h, para dejar que la precipitación formada añejase. La precipitación se aisló por filtración. Se disolvió en diclorometano (4 ml). Se añadió etilidipropilamina (1 ml). Se añadió éter (250 ml). La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 16 h para dejar que la precipitación formada añejara. La precipitación se aisló por filtración y se secó al vacío. El espectro ¹H-NMR en DMSO-d₆ no mostró ninguna señal de un grupo 9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil, mientras que las señales asignadas a una fracción de citidilil se pudieron encontrar. El material se almacenó en el congelador.

Paso 3:

30

Éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico de ácido 4-formilbenzoico



[0129]

35

[0130] Se añadieron sucesivamente trietilamina (2,04 ml, 14,65 mmol) y 2-succinimido-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TSTU, 4,44 g, 14,65 mmol) a una solución de ácido 4-formilbenzoico (2,0 g, 13,3 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (30 ml). La mezcla reactiva se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se diluyó con acetato de etilo (150 ml) y se lavó con una solución acuosa de 10% de hidrógeno sulfato de sodio (100 ml). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una mezcla de solución salina (50 ml) y agua (50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato magnésico. El solvente se eliminó *in vacuo*. El producto bruto se recristalizó a partir de acetato de etilo para dar 1,89 g de éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico de ácido 4-formilbenzoico.

40

¹H-NMR (CDCl₃).δ 2,95 (s, 4 H); 8,04 (d, 2 H), 8,32 (d, 2 H); 10,15 (s, 1 H).

45

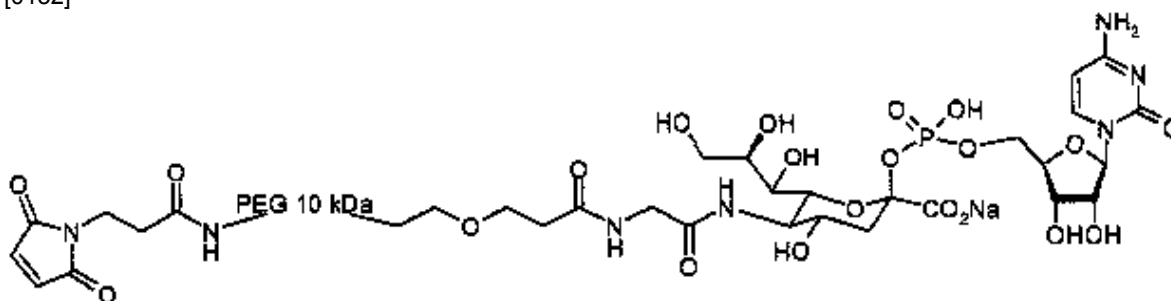
Paso 4:

[0131] Se disolvió Ácido *N*-((3-(ω -Amino10 kDa PEGil)propionilamino)acetil)-*O*²-[5']citidilil- ξ -neuramínico (42 mg, 0,004 mmol) en diclorometano (2 ml). Se añadió etildiisopropilamina (0,002 ml, 0,012 mmol) a la solución. Una solución de éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico de ácido 4-formilbenzoico (19,32 mg, 0,078 mmol) se añadió en diclorometano (0,5 ml). La mezcla reactiva se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. El solvente se eliminó *in vacuo* con una temperatura de baño de 25 °C. El residuo se suspendió en una solución acuosa de 25 mM de hidrogenocarbonato de amonio (15 ml). El material no soluble se eliminó por filtración. Se dividió en 5 partes. Cada una de ellas se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño utilizando un G25 en una columna con diámetro de 26 mm y una longitud de 10 cm, con un flujo de 7 ml/min, utilizando un tampón de 25 mM de hidrogenocarbonato de amonio. Todas las fracciones que contenían el material deseado se combinaron y liofilizaron. El espectro ¹H-NMR en DMSO-d₆ mostró la presencia de la fracción de aldehído y la fracción de citidilil. El material obtenido se mantuvo en el congelador.

Producto intermedio ejemplo 2:

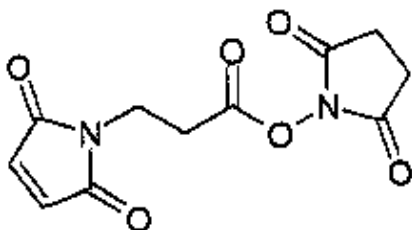
Ácido *N*-((3-(ω -(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)10 kDa PEGil)propionilamino)acetil)-*O*²-[5']citidilil- ξ -neuramínico

[0132]



Paso 1:

[0133] Éster 2,5-dioxopirrolidini-1-ílico de ácido 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propiónico



[0133]

[0134] Ácido 3-maleimidopropiónico (1,0 g, 5,9 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (20 ml). 2-Succinimido 1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TSTU, 2,14 g, 7,1 mmol) y etildiisopropilamina (1,24 ml, 7,1 mmol) se adicionaron posteriormente. Se añadió *N,N*-dimetilformamida (5 ml). La mezcla reactiva se agitó a temperatura ambiente, mientras se volvía inactiva. La mezcla se agitó durante 2 min. Se añadió *N,N*-dimetilformamida (5 ml). La mezcla se agitó durante 2,5 h a temperatura ambiente. Se diluyó con diclorometano (150 ml) y se lavó posteriormente con una solución acuosa de 10% de hidrogenosulfato de sodio (150 ml), una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (150 ml) y agua (150 ml). Se secó sobre sulfato magnésico. El solvente se eliminó *in vacuo*. El producto bruto se recristalizó a partir de acetato de etilo para dar 1,20 g de éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico de ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propiónico.

MS: $m/z = 289$, requerido para $[M+Na]^+$: 289

¹H-NMR (CDCl₃) δ 2,82 (m, 4 H); 3,02 (t, 2 H); 3,94 (t, 2 H), 6,73 (s, 2 H).

Paso 2:

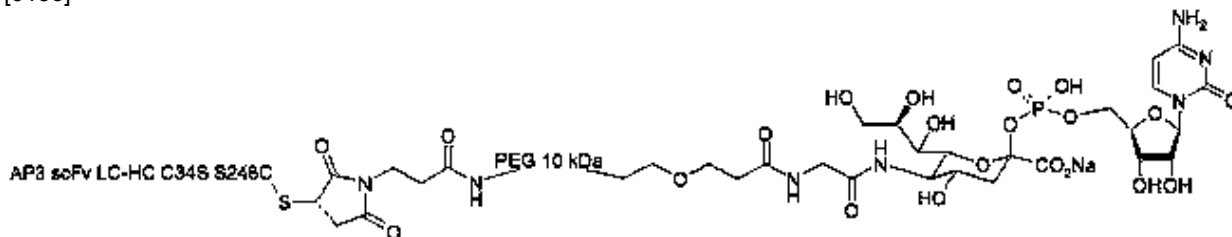
[0135] Ácido *N*-((3-(ω -Amino10 kDa PEGil)propionilamino)acetil)-*O*²-[5']citidilil- ξ -neuramínico (100 mg, 0,009 mmol) se disolvió en una mezcla de tetrahidrofurano (2 ml) y diclorometano (10 ml). Una solución de éster 2,5-dioxopirrolidini-1-ílico de ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propiónico (50 mg, 0,18 mmol) se añadió en diclorometano (3 ml). Se añadió etildiisopropilamina (0,005 ml, 0,028 mmol). La mezcla reactiva se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Diclorometano (2 ml) y etildiisopropilamina (0,5 ml) fueron adicionados. Se añadió resina de poliestireno aminometilado (disponible comercialmente de, por ejemplo, Novabiochem, carga 0,85 mmol/g, 438 mg, 0,372 mmol). La mezcla se

agitó lentamente a temperatura ambiente durante 1 h. La resina se eliminó por filtración. El solvente se eliminó *in vacuo* con una temperatura de baño de 25 °C. El residuo se disolvió en diclorometano (4 ml). Se añadió éter (200 ml). La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 2 h para dejar que la precipitación formada añejase. La precipitación se aisló por filtración y se secó al vacío para dar 38 mg del compuesto del título. El espectro ¹H-NMR en DMSO-d₆ mostró la presencia de un grupo maleimida.

Producto intermedio ejemplo 3

Fijación de ácido *N*-((3-(ω-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)10 kDa PEGil)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico a Cys 248 de AP3 scFv C34S S248C

[0136]



[0137] Una solución de hidrócloruro de Tris(2-carboxietil)fosfina (0,40 mg) en un tampón (0,40 ml) que consistía en 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween80, 1 M de glicerol que se había ajustado a pH 7,35, se añadió a una solución con una concentración de 0,53 mg/ml de AP3 scFv LC-HC C39S S248C con una etiqueta Flag en su C-termino y un Cys extra fijado a la cisteína en la posición 248 vía un puente S-S en una solución de 100 mM de HEPES y 150 mM de NaCl que se había ajustado a pH 7,5 con (4 ml, 2,12 mg, 76 nmol). La mezcla reactiva se agitó suavemente a 20 °C. Se dividió en dos partes. Cada una de ellas se agregó a una columna PD-10 (GE-Healthcare), usando un tampón de 25 mM de HEPES que se había ajustado a pH 7,0. Los eluatos de la columna (cada uno de ellos 3,5 ml) se combinaron.

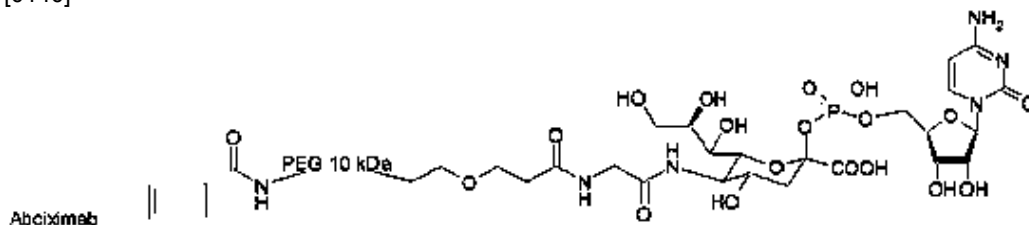
[0138] Una solución de ácido *N*-((3-(ω-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)10 kDa PEGil)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico (3,3 mg, 305 nmol) en un tampón de 25 mM de HEPES, que se había ajustado a pH 7,0 (0,43 ml), se añadió a la solución de la proteína. La mezcla reactiva se agitó suavemente a 20 °C durante 4 h. Se colocó en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se sometió a un ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 10 min. La mezcla se mantuvo en el congelador hasta su purificación.

[0139] Para la purificación, la mezcla se descongeló. Se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño utilizando un gel Superdex 200 con un tamaño de lecho de 16 mm de diámetro y 60 cm de longitud en un flujo de 1 ml/min y un tampón de 25 mM de TRIS y 150 mM de NaCl que se había ajustado a pH 8,0. Las fracciones que contenían el producto deseado se agruparon para dar 1,61 mg de la proteína deseada. El gel SDS-PAGE fue de acuerdo con lo esperado. Se descubrió que el material contenía mucha proteína agregada.

Producto intermedio ejemplo 4

Conjugación de ácido *N*-((3-(ω-(4-formilbenzoilamino)10 kDa PEGil)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico a un N-termino de Abciximab

[0140]



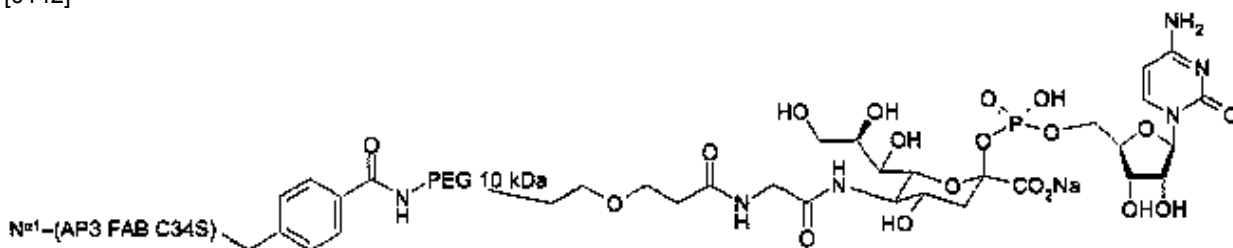
[0141] Una solución de Abciximab disponible comercialmente (ReoPro, 10 mg, 215 nmol, en una solución de 2 mg/ml del tampón comercial) se colocó en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. El tampón, que consistía en 25 mM de HEPES, que se había ajustado a pH 7,4 (5 ml) se añadió. Se llevó a cabo un ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 10 min. Se añadió el tampón que consistía en 25 mM HEPES, que se había ajustado a pH 7,4 (10 ml). Se llevó a cabo un ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 10 min. Se añadió un tampón que consistía en 25 mM de HEPES, que se había ajustado a pH 7,4 (10 ml). Se llevó a cabo un ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 10 min. La solución restante de 0,65 ml se colocó en un reactor plástico. Se añadió el tampón que consistía en 25 mM de HEPES, que se había ajustado a pH 7,4 (3,85 ml). Se añadió una solución de ácido *N*-((3-(ω-(4-formilbenzoilamino)10 kDa PEGil)propionilamino) acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico (14 mg, 1290 nmol) en un

tampón que consistía en 25 mM de HEPES que se había ajustado a pH 7,0 (1,5 ml). La mezcla reactiva se agitó suavemente a 300 r.p.m., durante 3 min, a 20 °C. Una solución de 1,0 M recién preparada de cianoborohiduro de sodio se añadió en el agua (0,025 ml). La mezcla reactiva se agitó suavemente a 300 r.p.m., a 20 °C. Después de 1 h, se añadió otra parte de la solución de cianoborohiduro de sodio (0,025 ml). Después de 1 h, se añadió otra parte de la solución de cianoborohiduro de sodio (0,025 ml). Después de 1 h, se añadió otra parte de la solución de cianoborohiduro de sodio. La solución se agitó suavemente a 300 r.p.m., a 20 °C, durante 16 h. La mezcla reactiva se colocó en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se sometió a un ultracentrifugado a 4000 r.p.m., durante 10 min, a 18° C. La solución restante de 0,360 ml se filtró y se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño en un gel Superdex200 con un tamaño de lecho de 016 mm X 60 cm, en un flujo de 1 ml/min utilizando un tampón de 25 mM de TRIS, 150 mM de NaCl, que se había ajustado a pH 8,0 como eluyente. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron en dos lotes. Cada uno de los lotes se colocó en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se sometieron a un ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 10 min, produciendo 2,67 mg y 3,27 mg, respectivamente. Para la cuantificación, se usó una absorbancia molar de 10,94 en un espectrofotómetro de NanoDrop®. El análisis del producto por SDS-PAGE fue conforme a lo esperado para un conjugado de ácido *N*-((3-(ω-(4- formilbenzoilamino)10 kDa PEGil)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico a un N-término de Abxicimab.

Producto intermedio ejemplo 5

Reacción de ácido *N*-((3-(ω-(4- formilbenzoilamino)10 kDa PEGil)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico con fragmento AP3-FAB en uno de sus N-terminales

[0142]



[0143] Se colocó una solución de 0,34 mg/ml de fragmento AP3 C39S FAB en un tampón PGS, pH 7,2 (1,7 mg, 35 nmol) en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se añadió un tampón que consistía en 25 mM de HEPES, 25 mM de NaCl, pH 7,0 (7 ml). La mezcla se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 20 °C, durante 15 min. Se añadió un tampón que consistía en 25 mM de HEPES, 25 mM de NaCl, pH 7,0 (10 ml). La mezcla se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 20 °C, durante 15 min. Se añadió un tampón que consistía en 25 mM de HEPES, 25 mM de NaCl, pH 7,0 (10 ml). La mezcla se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 20 °C, durante 15 min. Se dejó aproximadamente 0,480 ml de la solución. Se añadió una solución de ácido *N*-((3-(ω-(4- formilbenzoilamino)10 kDa PEGil)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico (2,31 mg, 212 nmol) en un tampón que consistía en 25 mM de HEPES, 25 mM de NaCl, pH 7,0 (0,37 ml). La mezcla se agitó suavemente a 20 °C durante 5 min. Se añadió una solución de 1 M de cianoborohiduro de sodio en el agua (0,0045 ml). La mezcla reactiva se agitó a 20 °C, durante 1 h. Se añadió una solución de 1 M de cianoborohiduro de sodio en el agua (0,0045 ml). La mezcla reactiva se agitó a 20 °C, durante 1 h. Se añadió una solución de 1 M de cianoborohiduro de sodio en el agua (0,0045 ml). La mezcla reactiva se agitó a 20 °C, durante 18 h. La mezcla reactiva se colocó en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se añadió un tampón que consistía en 25 mM de TRIS, 25 mM de NaCl, pH 8,00 (2,5 ml). La mezcla se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 20 °C, durante 4 min. Se añadió un tampón que consistía en 25 mM de TRIS, 25 mM de NaCl, pH 8,00 (2,2 ml). La mezcla se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 20 °C, durante 22 min. Se añadió un tampón que consistía en 25 mM de TRIS, 25 mM de NaCl, pH 8,00 (3,2 ml). La mezcla se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 20 °C, durante 12 min. Se añadió un tampón que consistía en 25 mM de TRIS, 25 mM de NaCl, pH 8,00 (2,2 ml) a la mezcla de aproximadamente 0,120 ml. Esta mezcla se dividió en dos partes iguales. Cada una de las cuales se adicionó a una columna Q de giro (VIVAPURE Q MINI M, Sartorius, product no.: VS-1X01QM24) que se había equilibrado con un tampón que consistía en 25 mM de TRIS, 25 mM de NaCl, pH 8,00. Cada columna se sometió a ultracentrifugado a 2000 r.p.m., a temperatura ambiente, durante 5 min. Se añadió un tampón que consistía en 25 mM de TRIS, 25 mM de NaCl, pH 8,00 (0,400 ml) a cada una de las columnas de giro. Cada columna se sometió a ultracentrifugado a 2000 r.p.m., a temperatura ambiente, durante 5 min. Se añadió un tampón que consistía en 25 mM de TRIS, 500 mM de NaCl, pH 8,00 (0,400 ml) a cada una de las columnas de giro. Cada columna se sometió a ultracentrifugado a 2000 r.p.m., a temperatura ambiente, durante 5 min. Los filtrados se combinaron y colocaron en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un cortado de 10 kDa. Se sometieron a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 18 °C, durante 8 min. La solución obtenida se mantuvo a -80 °C hasta su purificación.

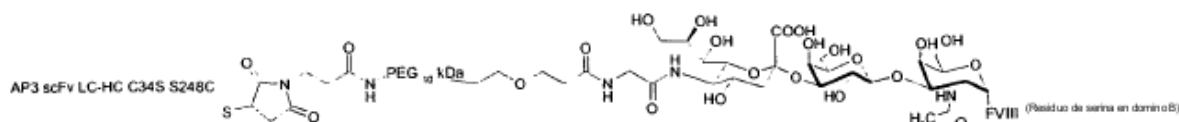
[0144] La solución se descongeló y se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 75, con un tamaño de lecho de 016 mm x 600 mm, en un flujo de 0,80 ml/min, utilizando un tampón de 25 mM de TRIS, 150 mM de NaCl, a pH 8,00. Las fracciones que contenían el producto deseado, según se estableció por SDS-PAGE, se

agruparon y colocaron en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se sometieron a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 18 °C, durante 18 min. La solución de 0,280 ml se congeló a -80 °C lo antes posible. La cuantificación en un equipo NanoDrop® utilizando una absorbancia molar de 13,05 mostró una concentración de 0,23 mg/ml. El producto mostró las bandas previstas en un SDS-PAGE por coloración de plata. El PEG no reaccionado se identificó en un SDS-PAGE utilizando un procedimiento colorante como se describe en Kurfürst, M. M. Analytical Biochemistry 200, 244-248. 1992.

Ejemplo 14

10 Conjugación de AP3 scFv LC-HC C39S S248C a FVIII

[0145]



15 [0146] Una solución de FVIII con el dominio B eliminado que tiene una secuencia de dominio B residual de SFSQNSRHPSQNPPVLKRHQR (SEC ID n° 4) en el C-término de la cadena pesada (1 mg, 5,64 mmol) en un tampón que consiste en 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 150 mM de NaCl, 0,02% de Tween80 y 1 M de glicerol, que se había ajustado a pH 7,35 (0,018 ml) se colocó en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se añadió una solución del producto de fijación de ácido *N*-((3-((ω-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)10 kDa PEGil)propionilamino) acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico a Cys 248 de AP3 scFV C34S S248C (producto intermedio ejemplo 3/ejemplo 13, 1,29 mg, 34 nmol) en una solución de 25 mM de TRIS y 150 mM de NaCl que se había ajustado a pH 8,0 (0,680 ml) y posteriormente se añadió un tampón que consistía en 20 mM de histidina, 10 mM de CaCl₂, 10% de glicerol, 0,02% de Tween80, 500 mM de NaCl que se había ajustado a pH 6,07 (3 ml). La mezcla se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 20 min. El volumen restante fue 0,800 ml o 1,25 mg/ml para FVIII. Una solución de sialidasa de *A. Urifaciens* (0,43 mg/ml, 302 U/mg, 0,0049 ml, 0,645 U) y una solución de ST3-Gal-I (2,5 mg/ml, 0,105 mg, 0,042 ml) se adicionaron posteriormente. La mezcla reactiva se agitó suavemente a 32 °C durante 1 min y luego se dejó a 32 °C durante 18 h. Se mantuvo en el congelador hasta su purificación.

30 [0147] La mezcla reactiva se descongeló. Se dividió en dos partes, cada una de las cuales se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño utilizando un gel Superose 6 con un tamaño de lecho de 10 mm de diámetro y 300 mm de longitud, a un flujo de 0,30 ml/min y un tampón que consistía en 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween80, 150 mM de NaCl y 1 M de glicerol, que se había ajustado a pH 7,35 como eluyente. Todas las fracciones de ambas rondas que contenían el producto deseado se agruparon. Se colocaron en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa y se sometieron a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 18 min.

35 [0148] Una solución de ácido CMP-*N*-acetilneuramínico (CMP NeuNac, 1,5 mg, 2597 nmol) en un tampón que consistía en 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween80, 150 mM de NaCl y 1 M de glicerol, que se había ajustado a pH 7,35 (0,100 ml) y una solución de 0,33 mg/ml de ST3Gal-III (0,10 ml, 0,033 mg) se adicionaron posteriormente. La mezcla reactiva se agitó suavemente a 300 r.p.m. y luego se mantuvo en el congelador hasta su purificación.

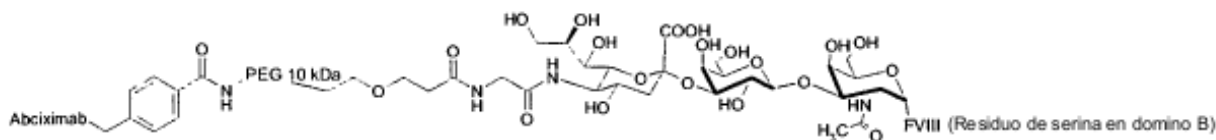
40 [0149] La mezcla reactiva se dividió en dos partes. Cada una de ellas se filtró a través de un filtro de 0,00045. Se aplicaron a una columna de sefarosa con un tamaño de lecho de 5 mm de diámetro y 5 cm de longitud a la que se había unido un anticuerpo F25 tras la activación con CNBr. F25 es un anticuerpo conocido para FVIII. Tras la aplicación, la columna se lavó durante 3 CV con un tampón que consistía en 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween80, 150 mM de NaCl y 1 M de glicerol, que se había ajustado a pH 7,35 a un flujo de 0,6 ml/min. Luego se lavó durante 3 CV con un tampón que consistía en 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween80 y 650 mM de NaCl, que se había ajustado a pH 7,35, a un flujo de 0,6 ml/min. Finalmente, el compuesto se eluyó dentro de 6 CV con un tampón que consistía en 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween80, 2,5 M de NaCl en una solución de etileno glicol/agua de 50%v/v, que se había ajustado a pH 7,35, a un flujo de 0,1 ml/min. Las fracciones de ambas rondas con el producto deseado se agruparon. Se colocaron en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se sometieron a un ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 14 min. La solución restante se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño en un material de Superose 6 con un tamaño de lecho de 10 mm de diámetro y 30 cm de longitud, con un flujo de 0,50 ml/min, utilizando un tampón que consistía en 10 mM de histidina, 1,7 mM de CaCl₂, 0,01% de Tween80, 0,3 M de NaCl, 8,8 mM de sacarosa que se había ajustado a pH 7. Las fracciones que contenían el compuesto deseado en una pureza adecuada se agruparon y se colocaron en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se sometieron a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 9 °C, durante 12 min. Utilizando una absorbancia molar de 14,46, el rendimiento resultó ser 0,0176 mg de un conjugado de AP3 scFv LC-HC C39S S248C a FVIII. Los análisis por gel SDS-PAGE bajo condiciones no reducidas fueron conforme a lo esperado. Por la forma de los picos en las cromatografías se llegó a la conclusión de que el material contenía mucha proteína agregada.

60

Ejemplo 15

Conjugación de Abciximab a FVIII en el O-glicano

5 [0150]

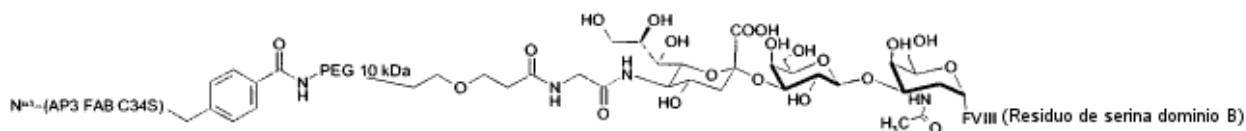


[0151] Se añadió un tampón que consistía en 20 mM de histidina, 10 mM de CaCl₂, 150 mM de NaCl, 0,02% de Tween80 y 1 M de glicerol que se había ajustado a pH 7,35 (2,5 ml) a una solución de FVIII con el dominio B eliminado que tiene una secuencia de dominio B residual de SFSQNSRHPSQNPPVLKRHQR (SEC ID nº 4) en el C-término de la cadena pesada (5,7 mg/ml, 1 mg, 5,6 nmol) en un tampón que consistía en 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 150 mM de NaCl, 0,02% de Tween80 y 1 M de glicerol que se había ajustado a pH 7,35. Se añadió una solución del conjugado de ácido *N*-((3-(ω-(4-formilbenzoilamino)10 kDa PEGil) propionilamino)acetil)-O²-[5¹⁴C]citidilil-ξ-neuramínico a un N-término de Abciximab (producto intermedio ejemplo 4, ejemplo 13, 2,3 mg, 39,5 nmol) en un tampón que consistía en 25 mM de TRIS, 150 mM de NaCl, que se había ajustado a pH 8,0 (0,323 ml). La solución se colocó en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 20 min. Se añadió un tampón que consistía en 20 mM de histidina, 10 mM de CaCl₂, 150 mM de NaCl, 0,02% de Tween80 y 1 M de glicerol que se había ajustado a pH 7,35 (2 ml). La solución se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 30 min, dejando una solución con un volumen de 1,4 ml. Una solución de sialidasa de A. Urifaciens (0,4 mg/ml, 242 U/mg, 0,0066 ml) y una solución de ST3Gal-I (2,5 mg/ml, 0,042 ml) se adicionaron posteriormente. La mezcla reactiva se agitó suavemente a 32 °C durante 15 min. Después de ello se dejó reposar la mezcla reactiva a 32 °C durante 20,5 h. Se colocó la mezcla reactiva en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 15 min. La solución restante de 0,300 ml se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño, usando material de Superose 6 con un tamaño de lecho de Ø10 mm x 300 mm a un flujo de 0,5 ml/min y utilizando un tampón que consistía en 10 mM de histidina, 1,7 mM de CaCl₂, 0,01% de Tween80, 0,3 M de NaCl, 8,8 mM de sacarosa que se había ajustado a pH 7 como eluyente. Las fracciones, que contenían el producto deseado se agruparon y se colocaron en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se añadió un tampón, que consistía en 20 mM de histidina, 10 mM de CaCl₂, 10% de glicerol, 0,02% de Tween80, 500 mM de NaCl que se había ajustado a pH 6,07 (2,5 ml). La solución se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 15 min. Se añadió un tampón, que consistía en 20 mM de histidina, 10 mM de CaCl₂, 10% de glicerol, 0,02% de Tween80, 500 mM de NaCl que se había ajustado a pH 6,07 (1,5 ml). La solución se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 15 min. La solución restante de 0,220 ml se colocó en un reactor plástico. Se añadió una solución de CMP NeuNAc disponible comercialmente (1,73 mg, 2800 nmol) en el tampón que consistía en 20 mM de histidina, 10 mM de CaCl₂, 10% de glicerol, 0,02% de Tween80, 500 mM de NaCl que se había ajustado a pH 6,07 (0,173 ml). La mezcla reactiva se agitó suavemente a 300 r.p.m., a 32 °C, durante 1 h. Se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño usando material de Superose 6 con un tamaño de lecho de Ø10 mm x 300 mm, a un flujo de 0,5 ml/min y utilizando un tampón que consistía en 10 mM de histidina, 1,7 mM de CaCl₂, 0,01% de Tween80, 0,3 M de NaCl, 8,8 mM de sacarosa que se había ajustado a pH 7 como eluyente. Las fracciones que contenían el producto deseado se agruparon y se colocaron en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. La agrupación se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 10 °C, durante 5 min para dar una solución de 0,275 ml de 0,0358 mg de un producto de conjugación de Abciximab a FVIII en el O-glicano. Para la cuantificación, se usó una absorbancia molar de 13,15 en un espectrofotómetro de NanoDrop®. El análisis SDS-PAGE fue conforme a lo esperado para un SDS-PAGE de un producto de conjugación de Abciximab a FVIII en el O-glicano.

Ejemplo 16

Conjugación del fragmento AP3-FAB a BDD-FVIII

[0152]



50

[0153] El producto de la reacción del producto intermedio ejemplo 5 se colocó en un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se añadió un tampón que consistía en 20 mM de histidina, 10 mM de CaCl₂, 10% de glicerol, 0,02% de Tween80, 500 mM de NaCl a pH 6,07 (4 ml). La solución se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 20 °C, durante 12 min. Se añadió una solución de FVIII con el dominio B eliminado que tiene una secuencia de dominio B residual de SFSQNSRHP SQNPPVLKRHQR (SEC ID n° 4) en el C-término de la cadena pesada (0,5 mg, 2,8 nmol) en un tampón que consistía en 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 150 mM de NaCl, 0,02% de Tween80 y 1 M de glicerol, que se había ajustado a pH 7,35 (0,088 ml) a los restantes 0,600 ml. La solución se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 20 °C, durante 30 min. Los restantes 0,125 ml se colocaron en un frasco Eppendorf. Una solución de sialidasa de *A. Urifaciens* con etiqueta His6 (0,4 mg/ml, 0,0033 ml) y una solución de ST3Gal-I (2,5 mg/ml, 0,021 ml) se adicionaron posteriormente. La mezcla reactiva se agitó suavemente a 300 r.p.m., a 32 °C. Después de 20 min, la agitación se detuvo y la mezcla reactiva se dejó a 32 °C durante 19 h. Se filtró y se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño usando material de Superose 6 con un tamaño de lecho de Ø10 mm x 300 mm, usando un tampón que consistía en 10 mM de histidina, 1,7 mM de CaCl₂, 0,01% de Tween80, 0,3 M de NaCl, 8,8 mM de sacarosa que se había ajustado a pH 7 como eluyente a un flujo de 0,500 ml/min. Las fracciones que contenían el compuesto deseado, según se estimó por SDS-PAGE, se agruparon. La agrupación se transfirió a un dispositivo de ultracentrifugado Amicon con un corte de 10 kDa. Se sometió a ultracentrifugado a 4000 r.p.m., a 20 °C. La concentración del producto deseado en los restantes 0,270 ml se determinó que fue 0,29 mg/ml en un equipo de NanoDrop, usando una absorción molar de 13,61. Los resultados de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras del producto aislado fueron conformes a la presencia de un conjugado del fragmento FAB de AP3 con FVIII.

Ejemplo 17

Acoplamiento de N8-(O)-PEG10kD-CHO a AP3-ONH₂ para obtener el conjugado AP3-N8, compuesto MZ1

Producto intermedio ejemplo A: introducción de un extremo de hidroxilamina en los N-glicanos del anticuerpo AP3

Primer paso: galactosidación de los N-glicanos del anticuerpo AP3:

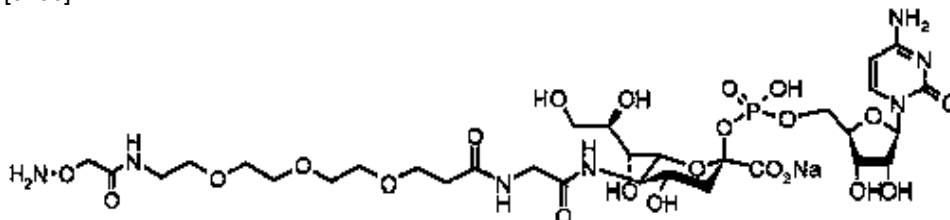
[0154] Los N-glicanos de AP3 FL mIgG son principalmente del tipo complejo, biantenarico. La mayoría de los N-glicanos biantenaricos llevan dos fracciones de N-acetil glucosamina, o una fracción de N-acetil glucosamina y una fracción de galactosa como la fracción monosacárida final (G0F, G1F). La cadena ligera tiene un glicano biantenarico con un ácido siálico y una fracción de galactosa como los monosacáridos finales. Los glicanos G0F y G1F se convirtieron en la forma G2F por β1,4-galactosiltransferasa (bovina) transferencia catalizada de galactosa a partir de galactosa UDP. En resumen, al anticuerpo AP3 FL mIgG en solución en 50mM de tampón MES, pH 6,4 (3mg, 800μl) se añadió 50mM de tampón MES, pH 6,4 (500μl), galactosa-UDP (500μl de una solución de 12,2mg/ml en 10mM de tampón de fosfato pH 7,4 que contenía 140mM de NaCl, 3mM de KCl) y cloruro de manganeso (100μl de una solución de 12,6mg/ml en agua). La reacción se inició por adición de β1,4- galactosiltransferasa (100μl de una solución enzimática de 10U/ml en 100mM tampón de HEPES, pH 7,5). La mezcla reactiva se incubó durante toda la noche a 25°C.

Segundo paso: introducción de un extremo de hidroxilamina en los N-glicanos del anticuerpo AP3

[0155] Al anticuerpo galactosilado obtenido en el primer paso (3mg, 2ml) se le adicionó GSC-ONH₂ (5,8mg en 190μl 10mM de tampón de fosfato, pH 7,4 que contenía 140mM de NaCl, 3mM de KCl). La reacción se inició por adición de ST3Gal III (80μl, 0,4mg, 480mU). La mezcla reactiva se incubó a 32°C durante 21h.

GSC-ONH₂: monofosfato de citidina ácido 5'-(2-(12-((aminoximetilcarbonil)amino)-4-7-10-trioxadodecanoil)-amino)etanol)-neuramínico

[0156]



[0157] Cualquier fracción de galactosa inmodificada se cubrió posteriormente añadiendo NAN-CMP en solución en el tampón de PBS (4,5mg, 100μl). La mezcla reactiva se incubó durante 1h a 25°C. La mezcla reactiva se filtró luego (0,45μ filtro, Gelman GHP) y el tampón se cambió a 20mM de tampón de fosfato pH 7,2 que contenía 150mM de NaCl (por ultra filtración, unidades de filtro de centrifugado Millipore, Amicon Ultra, 0,5 ml dispositivo, 10kD corte). La purificación se llevó a cabo en una columna HP de proteína A HiTrap (1ml) utilizando un sistema Äkta Purifier 10 (GE Healthcare). El tampón de carga y de lavado fue 20mM de tampón de fosfato, pH 7,2 que contenía 150mM de NaCl, el tampón de elución fue 10mM de ácido fórmico ajustado a pH 3,5 con 10M de hidróxido sódico. El flujo fue 0,5ml/min, el volumen de fracción 0,5ml (fraccionamiento en una placa de microtitulación de pocillos profunda). Antes del

fraccionamiento, 0,1 M de tampón de Tris, pH 9 (15µl) se añadió a los pocillos de la placa de microtitulación para evitar mantener el producto en pH ácido. Las fracciones pertinentes se agruparon, se sobreconcentraron y el tampón se cambió a tampón A (por ultra filtración, unidades de filtro de centrifugado Millipore, Amicon Ultra, 0,5ml dispositivo, 10kD corte), dando el producto ("AP3-ONH2") con una recuperación de proteína total de 50% (1,5mg, 0,91mg/ml).

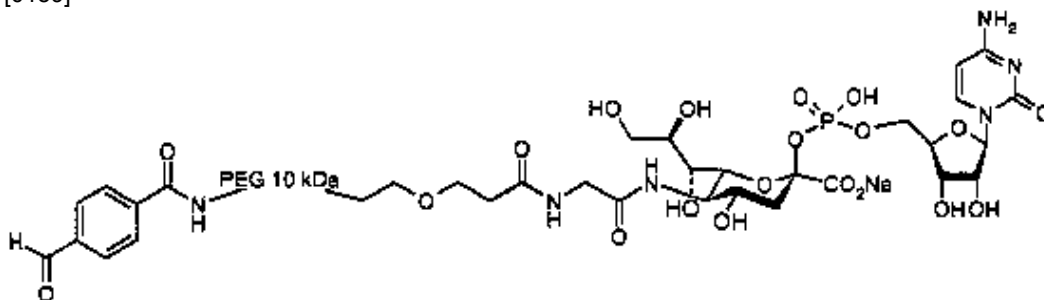
[0158] Para averiguar si la fracción de hidroxilamina se había introducido con éxito, se pegiló una alícuota del producto, usando PEG20kD-CHO (60 equivalentes molares de PEG20kD-CHO en solución en el tampón A). Se hizo un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS usando NuPage 4-12% de gel Bis-Tris (Invitrogen) bajo condiciones reductoras (200V, 40min). El gel fue azul coomassie manchado usando SimplyBlue SafeStain (Invitrogen). Las proteínas estándar fueron de Invitrogen (Novex Sharp Unstained Stds (3,5-260kD)). El gel mostró la desaparición de la cadena ligera (la cadena ligera del no pegilado, N-glicano modificado AP3 que aparece en aproximadamente 32kD) y sólo una banda débil que corresponde a la cadena pesada restante en aproximadamente 55kD) estaba presente. Cuatro nuevas bandas aparecieron en aproximadamente 70, 100, 130,170 kD, que se asumió que correspondían a respectivamente LC glicano pegilado, Fc glicanos monopegilados, Fc glicanos dipegilados y un producto indefinido. Así, fracciones de hidroxilamina se han introducido en AP3.

Producto intermedio ejemplo B: introducción de un extremo de aldehído en los O-glicanos N8:

Primer paso: desialilación de transferencia catalizada de N8 y ST3Gal1 de GSC-PEG10kD-CHO en O-glicanos (1pot):

GSC-PEG10kD-CHO: ácido *N*-((3-(ω-(4-formilbenzoilamino)10 kDa PE-Gil)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico.

[0159]



[0160] A una solución de N8 en 20mM de tampón de imidazol pH 7,3, 10mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1M de glicerol, 0,5M de NaCl (263µl, 1,5mg) se adicionó una solución de sialidasa (sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens*) (7µl, 680mU), seguido de adición de una solución de GSC-PEG10kD-CHO en tampón de PBS (68µl, 1,85mg) y una solución de His-ST3Gal I en 50mM de Tris, 100mM de NaCl, pH8 (108µl, 0,27mg). La mezcla reactiva se incubó a 23°C durante 24h.

[0161] Después de la dilución en 20mM de tampón de imidazol, pH 7,3, 10mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1M de glicerol para bajar la concentración iónica, la mezcla se purificó por intercambio de aniones (columna MonoQ 5/50GL, GE Healthcare), usando un sistema Äkta Purifier 10 (GE Healthcare): la mezcla se cargó en la columna MonoQ 5/50 GL equilibrada con 20 mM de Imidazol, pH 7,3, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol. El tampón de elución B fue 20 mM de Imidazol, pH 7,3, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1,5 M de NaCl, 1 M de glicerol. El programa de elución fue: 0 a 20% de B sobre 5 CV, 20% de B sobre 10 CV, 100% de B sobre 10 CV, con un flujo de 0,5 ml/min. El producto se eluyó con 100% de tampón de elución. Las fracciones pertinentes se agruparon. Rendimiento 1,2 mg, 80% de recuperación de proteína.

Segundo paso: recubrimiento:

[0162] Una solución del producto obtenido en el primer paso se sobreconcentró, (1,13mg proteína, 400µl), una solución de NAN-CMP se añadió en el tampón de PBS (40µl, 1,05mg). La reacción se inició por adición de ST3Gal III (110µl, 110µg, 0,13U). La mezcla reactiva se incubó a 32°C durante 1h. La mezcla reactiva se purificó luego en MonoQ, usando un programa de elución ligeramente modificada (en comparación con el método de purificación del paso 1): el programa de elución fue: 0 a 13% de B sobre 5 CV, 13% de B sobre 10 CV, 100% de B sobre 10 CV, con un flujo de 0,5ml/min. El producto ("N8-(O)-PEG10kD-CHO" (NB: este producto es una mezcla de des-O-glicano y (O)-PEG-CHO-N8) se eluyó con 100% de tampón de elución. Las fracciones pertinentes se agruparon. Rendimiento 0,96 mg, 80% de recuperación de proteína, es decir recuperación de proteína total de N8: 64%. Se llevó a cabo un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS usando NuPage 7% de gel de Tris acetato (Invitrogen) bajo condiciones reductoras (150V, 70 min). El gel fue azul coomassie manchado usando SimplyBlue SafeStain (Invitrogen). Las proteínas estándar fueron de Invitrogen (HiMark Unstained HMW). El modelo obtenido fue como estaba previsto: 3 bandas de PM aproximadamente 84kD, 93kD y 120kD, que podrían corresponder respectivamente a la cadena ligera, la cadena pesada y la cadena pesada pegilada. Las bandas a 93 y 120 kD tienen aproximadamente la misma intensidad: esto estaba previsto, ya que

sólo aproximadamente 50% de N8 porta un O-glicano en su dominio B. Así, el extremo de aldehído se ha introducido con éxito en N8.

Acoplamiento de N8-(O)-PEG10kD-CHO a AP3-ONH2

5

[0163] A N8-(O)-PEG10kD-CHO preparado según el producto intermedio ejemplo B se le cambió el tampón a 50mM de tampón de imidazol, pH 6,2, que contenía 10mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 0,5M de NaCl y se sobreconcentró por ultrafiltración (unidades de filtro de centrifugado Millipore, Amicon Ultra, 0,5 ml dispositivo, 50kD corte) a una concentración de aproximadamente 16mg/ml. Asimismo, al AP3-ONH2 preparado según el producto intermedio ejemplo

10

A se le cambió el tampón a 50 mM de tampón de imidazol, pH 6,2, que contenía 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 0,5M de NaCl y se sobreconcentró por ultrafiltración (unidades de filtro de centrifugado Millipore, Amicon Ultra, 0,5ml dispositivo, 10kD corte) a una concentración de aproximadamente 34,7mg/ml.

[0164] A la solución de AP3-ONH2 sobreconcentrada anterior (45µl, 1,56mg) se le añadió la solución sobreconcentrada de N8-(O)-PEG10kD-CHO (21,5µl, 244µg), seguido de la adición de una solución acuosa de anilina (5µl, 180µg). La mezcla se incubó a 25°C durante toda la noche. Las fracciones de hidroxilamina no reaccionada se aplacaron por adición de acetona (1,8µl, 1,4mg, aproximadamente 600 equivalentes molares). La mezcla reactiva se incubó 30min a 25°C.

15

20

[0165] La mezcla reactiva se diluyó a 3ml con 20mM de tampón de imidazol, pH 7,3, 10mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1M de glicerol, 25mM de NaCl y se filtró (0,45µ filtro GHP de Gelman) y se purificó por intercambio iónico en la columna MonoQ 5/50 GL(GE Healthcare). El tampón de carga y de lavado (tampón A) fue 20mM de tampón de imidazol, pH 7,3, 10mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1M de glicerol, 25mM de NaCl, el tampón de elución (tampón B) fue 20mM de tampón de imidazol, pH 7,3, 10mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1M de glicerol, 1M de NaCl. El programa de elución consistió en 4 pasos: 0 a 20% de B sobre 4 CV, 20% de B sobre 10 CV, de 20 a 100% de B sobre 16 CV, 100% de B sobre 5 CV. El flujo fue 0,5ml/min, la temperatura fue 15 °C. 1ml de fracciones se recuperaron en los primeros dos pasos, 0,5ml de fracciones en los últimos dos pasos.

25

30

[0166] Se eluyó AP3-ONH2 primero en aproximadamente 20% de B, el material restante se eluyó entre 30 y 65% de B como un pico mayor y varios picos menores no totalmente resueltos. Después de la sobreconcentración (por ultrafiltración, 50kD corte), las fracciones se analizaron por electroforesis en gel usando NuPage 7% de gel de acetato de Tris (Invitrogen) (150 V, 70 min). El gel fue azul coomassie manchado usando SimplyBlue SafeStain (Invitrogen). Las proteínas estándar fueron de Invitrogen (HiMark Unstained HMW). El pico principal del material en elución entre 30 y 65% de B (parte superior del pico se eluye en 52% de B) corresponde al material conjugado.

35

[0167] El material conjugado no reducido muestra tres bandas en el gel en PM 84kD, 285kD y >500kD (banda muy débil). Se asume que corresponden respectivamente a la cadena ligera (N8) de N8-(O)-PEG10kD-AP3, la cadena pesada (N8) de N8-(O)-PEG10kD-AP3 (para las muestras de control de N8-(O)-PEG10kD-CHO no-reducido: la cadena pesada aparece en aproximadamente 110kD y las muestras de control del AP3-ONH2 no-reducido aparece en aproximadamente 176kD) y a un compuesto desconocido.

40

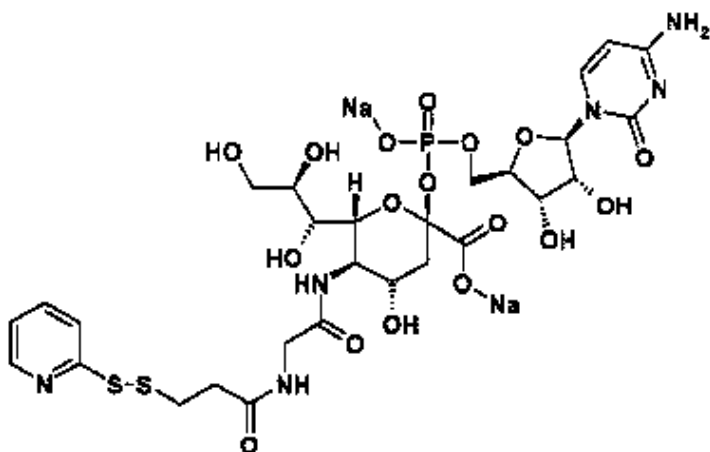
[0168] El material conjugado reducido muestra tres bandas en el gel, a PM 84kD, 145kD y 170kD, que se asume que corresponden respectivamente a cadena ligera (N8) de N8-(O)-PEG10kD-AP3 y cadena pesada pegilada N8 conjugada para la cadena ligera de AP3, y cadena pesada pegilada N8 conjugada para la cadena pesada de AP3. La cantidad de material conjugado recuperado fue 129µg, 53% de rendimiento de N8-PEG10kD-CHO.

45

Ejemplo 18

Disodio (5R,6R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1-il)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]metoxi-óxi-fosforil]oxi-4-hidroxi-5-[[2-[3-(2-piridildisulfanil) propanoilamino]acetil]amino]-6-[(2R)-1,2,3-trihidroxipropil]tetrahidropirano-2-carboxilato, compuesto 1M

50



[0169]

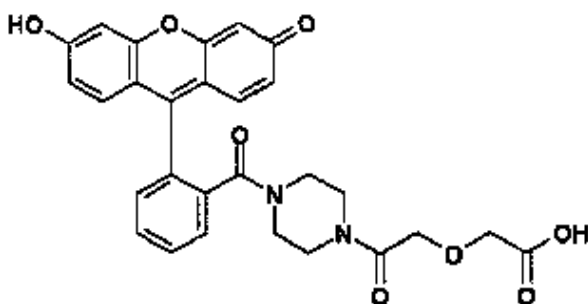
[0170] S,S'-2,2'-Ditiodipiridina (1,59 mmol, 350 mg) y ácido 3-mercaptopropiónico (0,477 mmol, 50,1 mg, 41,5 microlitros) se mezclaron en tetrahidrofurano (2 ml). La mezcla se agitó durante 45 minutos. N-hidroxisuccinimida (0,477 mmol, 54,9 mg) y N,N'-diisopropilcarbodimida (0,954 mmol, 148 microlitros) se adicionaron a la mezcla que posteriormente se agitó durante 3 h.

[0171] Disodio (5R.6R)-2-[[[(2R.3S.4R.5R)-5-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1-il)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]metoxi-óxido-fosforil]oxi-4-hidroxi-5-[2-aminoacetilamino]-6-[(2R)-1,2,3-trihidroxiopropil]tetrahidropirano-2- carboxilato (0,159 mmol, 100 mg) se disolvió en agua (500 microlitros). El pH se ajustó a 8,5 por adición de 500 mM ac. Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ (ac., sat.). El volumen final se ajustó a 2 ml por adición de agua.

[0172] Las dos soluciones (éster de NHS en tetrahidrofurano y nucleótido en agua) se mezclaron. La mezcla resultante se agitó suavemente durante 3 h. El volumen se ajustó a 20 ml por adición de agua. El compuesto bruto se purificó usando HPLC de fase inversa (0-30 vol% de acetonitrilo en agua, 10 % de 500 mM ac. NH₄HCO₃, columna C₁₈). Las fracciones seleccionadas se agruparon. Se añadió hidróxido sódico (1 M, 156 microlitros). La mezcla resultante se liofilizó. La pureza y la identidad se determinaron por HPLC y LCMS analítica ([M+H]⁺: 827,4)

Ejemplo 19

Ácido 2-[2-[4-[2-(3-hidroxi-6-oxo-xanten-9-il)benzoi]piperacina-1-il]-2-oxo-etoxi]acético, compuesto 2M

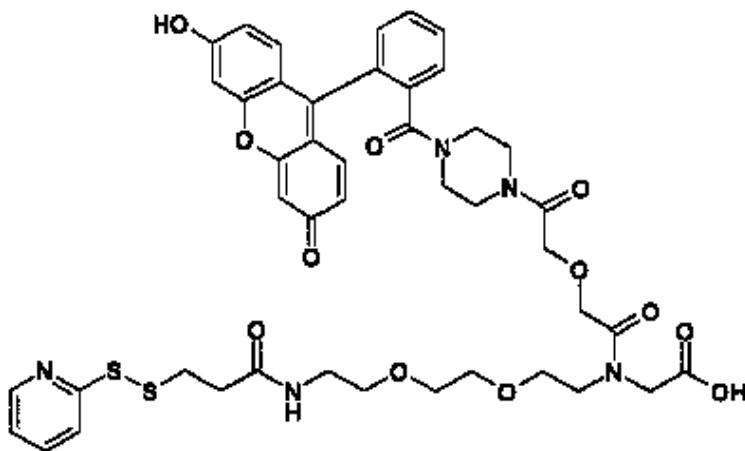


[0173]

[0174] Se suspendió hidrocloreto de 6-hidroxi-9-[2-(piperacina-1-carbonil)fenil]xanten-3-ona (5,72 mmol, 2,5 g) (preparado como se describe en . Am. Chem. Soc., 2007, 129, 8400-8401) en una mezcla de bicarbonato sódico acuoso saturado (50 ml) y tetrahidrofurano (50 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos. Se añadió anhídrido diglicólico (8,58 mmol, 1,0 g). Después de 3 h, se añadió anhídrido diglicólico adicional (500 mg). La mezcla se agitó durante 20 h. La mezcla se acidificó con ácido clorhídrico fumante para pH 1. Se adicionaron diclorometano (100 ml) y ácido clorhídrico (1 M, 100 ml). Se adicionaron solución salina (100 ml) y cloruro sódico sólido. Se observó un sólido entremedias de las dos fases. Las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con DCM (3x100 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El sólido formado entremedias de las fases se aisló por filtración. El sólido se suspendió en ácido clorhídrico (1 M) en un filtro. Los sólidos se extrajeron continuamente con ácido clorhídrico (1 M). El extracto filtrado se combinó con los extractos acuosos y la solución resultante se purificó usando HPLC de fase inversa (columna C₁₈, 10- 35 vol% de acetonitrilo en agua, 0,1 % de ácido trifluoroacético). Las fracciones seleccionadas se agruparon y se liofilizaron.
LCMS: 517.2776 [M+H]⁺

Ejemplo 20

Ácido 2-[[2-[2-[4-[2-(3-hidroxi-6-oxo-xanten-9-il)benzoil]piperacin-1-il]-2-oxo-etoxi]acetil]-[2-[2-[2-[3-piridildisulfanil]propanoilamino]etoxi]etil]amino]acético, compuesto 3M (2-



5 [0175]

[0176] Resina de tritil poliestireno (200 mg, 1,5 mmol/g, Pepchem) se colocó en una jeringa sinterizada. Se añadió cloruro de tionilo / diclorometano (1:1,5 ml). La mezcla se agitó durante ½ h. La resina se lavó con diclorometano. Una mezcla de ácido bromoacético (0,9 mmol, 125 mg) y *N,N'*-diisopropiletilamina (0,9 mmol, 156 microlitros) se añadió al diclorometano (3 ml). Después de 5 minutos, se añadió más *N,N'*-diisopropilo-etilamina (0,9 mmol, 156 microlitros). La mezcla se agitó durante ½ h. La resina se drenó y se añadió una mezcla idéntica de ácido bromoacético y *N,N'*-diisopropilo-etilamina en diclorometano a la resina. La mezcla se agitó durante 1½ h. La resina se lavó con diclorometano (5 veces), metanol y *N*-metilpirrolidona. Durante el lavado de metanol se hizo una agitación vigorosa para suprimir cualquier formación de grumos.

[0177] Se añadió una solución de 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano (7,5 mmol, 1100 microlitros) a la *N*-metilpirrolidona (3,75 ml). La mezcla se agitó durante 3 h. La resina se lavó. Una solución de 2-acetildimedona (3,0 mmol, 546 mg) en *N*-metilpirrolidona (3 ml) se añadió a la resina. La mezcla se agitó durante la noche. La resina se lavó con *N*-metilpirrolidona. Una mezcla de ácido 2-[2-[4-[2-(3-hidroxi-6-oxo-xanten-9-il)benzoil]piperacin-1-il]-2-oxo-etoxi]acético, compuesto 2M (155 mg, 0,3 mmol), 1-hidroxi-7-azabenzotriazola (0,9 mmol) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (0,9 mmol, 140 microlitros) en *N*-metilpirrolidona (1,8 ml) se añadió a la resina. La mezcla se agitó durante la noche. La resina se lavó con *N*-metilpirrolidona (3-4 veces). La resina se agitó en una mezcla de hidracina y *N*-metilpirrolidona (5 vol% de monohidrato de hidracina) 2 veces durante 5 minutos. La jeringa se drenó. La resina se lavó con *N*-metilpirrolidona.

[0178] Una mezcla de *S,S'*-2,2'-ditiodipiridina (7,5 mmol, 1650 mg) y ácido 3-mercaptopropiónico (3,0 mmol, 261 microlitros) en *N*-metilpirrolidona (3 ml) se incubó durante ½ h. Se añadió *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (1,5 mmol, 233 microlitros). La mezcla resultante se añadió a la resina. La mezcla se agitó durante 1½ h. La resina se lavó con *N*-metilpirrolidona y diclorometano.

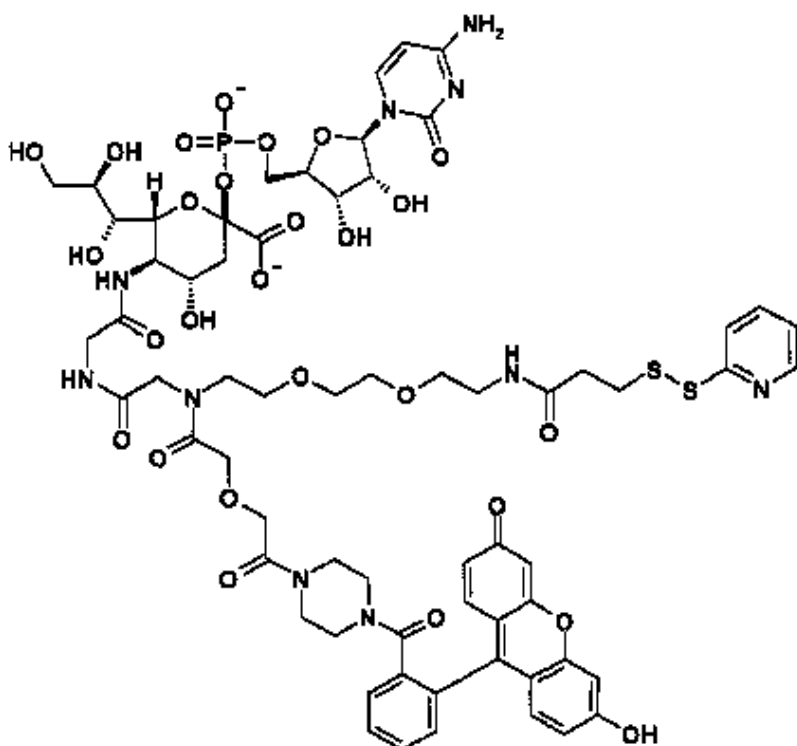
[0179] La resina se trató con una mezcla de ácido trifluoroacético y agua (95:5) durante 15 min. El filtrado se trituró con éter dietílico/*n*-heptano. El compuesto bruto se disolvió en ácido acético (2½ ml). Se agregó agua (15 ml) y un poco de acetonitrilo. La mezcla se filtró y se purificó usando HPLC de fase inversa (columna C_{18} , 20- 50 % de acetonitrilo en agua, 0,1 % de TFA).
LCMS: 902.2807 [M+H]⁺

35

Ejemplo 21

Diamonio (4*S*,5*R*,6*R*)-2-[[[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1-il)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]metoxi-óxido-fosforil]oxi-4-hidroxi-5-[[2-[2-[2-[4-[2-(3-hidroxi-6-oxo-xanten-9-il)benzoil]piperacin-1-il]-2-oxo-etoxi]acetil]-[2-[2-[2-[3-(2-piridildisul-fanil)propanoilamino]etoxi]etil]amino]acetil]amino]acetil]amino]-6-[(1*R*,2*R*)-1,2,3-trihidroxiopropil]tetrahidropirano-2-carboxilato, compuesto 4M

40



[0180]

[0181] Ácido 2-[[[2-[2-[4-[2-(3-hidroxi-6-oxo-xanten-9-il)benzoil]piperacina-1-il]-2-oxo-etoxi]acetil]-[2-[2-[3-(2-piridil)disulfanil]propanoilamino]etoxi]etoxi]etil]amino]acético, compuesto 3M (0,3 mmol, 270 mg) se disolvió en tetrahidrofurano (2 ml). N-hidroxisuccinimida (0,9 mmol, 104 mg) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (1,5 mmol, 233 microlitros) se adicionaron a la mezcla que posteriormente se agitó durante 1½ h.

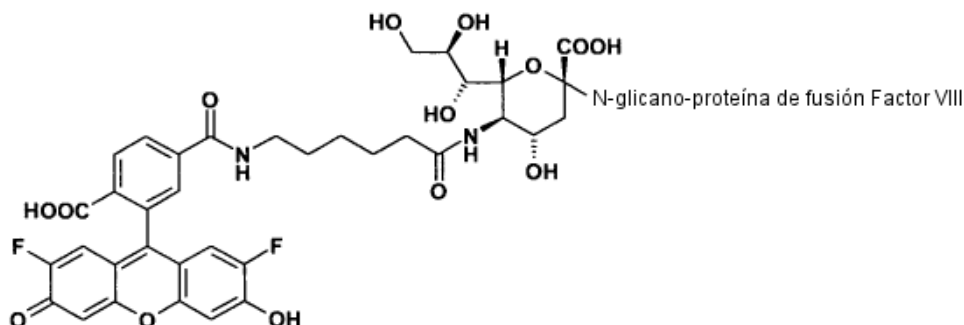
[0182] Disodio (5R,6R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1-il)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]metoxi-óxi-fosforil]oxi-4-hidroxi-5-[2-aminoacetilamino]-6-[(2R)-1,2,3-trihidroxipropil]tetrahidropirano-2-carboxilato (0,45 mmol, 303 mg) se disolvió en agua (500 microlitros). El pH se ajustó a 8,5 por adición de 500 mM acuoso. Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ (acuoso, saturado). El volumen final se ajustó a 2 ml por adición de agua.

[0183] Las dos soluciones se mezclaron. El pH resultante fue 7,5-8,0. La mezcla resultante se agitó durante 20 h. La mezcla se diluyó a 15 ml con agua, se filtró y se purificó usando HPLC de fase inversa (0-35 % de acetonitrilo en agua, 10 % de 500 mM de NH₄HCO₃ acuoso). Las fracciones seleccionadas se agruparon y se liofilizaron. LCMS: 1513,9 [M+H]⁺, 757,5 [M+H]²⁺

Ejemplo 22

[0184] Etiquetado en verde Oregón 488 de F8-500 AP3-LC-HC scFv -Δa3 vía N-glicano, compuesto 5M

[0184]



[0185] Se mezcló la proteína de fusión (F8-500 AP3-LC-HC scFv -Δa3 (SEC ID nº 39), 11 microgramos) en el tampón acuoso (20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol, 500 mM de NaCl, pH 7,3, 1,2 ml)

con sialidasa recombinante de *Clostridium perfringens* (0,1 U). El volumen final fue 1,2 ml. La mezcla se dejó a 25 grados Celsius durante 30 minutos. La mezcla se diluyó a 10 ml con tampón (20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol, pH 7,3). La mezcla se cargó sobre una columna MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare) preacondicionada (con tampón A) y se eluyó utilizando el siguiente programa: 10 CV eq 0 % de tampón B, 2 CV lavado muestra no unida (0 % tampón B), 10 CV 0 - 100 % (tampón B), 5 CV 100 % tampón B. Tampón de imidazol A: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 25 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3. Tampón de imidazol B: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3.

[0186] Las fracciones seleccionadas se agruparon y se mezclaron con disodio (2R,5R,6R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1-il)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]metoxi-óxido-fosforil]oxi-5-[6-[[[4-carboxi-3-(2,7-difluoro-3-hidroxi-6-oxo-xanten-9-il)benzoil]amino]hexanoilamino]-4-hidroxi-6-[(2R)-1,2,3-trihidroxi-propil]tetrahidropirano-2-carboxilato y sialil transferasa (ST3GalIII de rata rec.). Las concentraciones finales fueron: Factor VIII: 0,026 micromolares, reactivo de etiquetado de fluorescencia: 39 micromolares, ST3GalIII: 177 U/l. Volumen final: 2,1 ml. La mezcla se incubó a 32 grados Celsius durante 4 horas. Disodio (2R,5R,6R)-5-acetamido-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1-il)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]metoxi-óxido-fosforil]oxi-4-hidroxi-6-[(2R)-1,2,3-trihidroxi-propil]tetrahidropirano-2-carboxilato se añadió a la mezcla (concentración final: 54 micromolares). La mezcla se incubó a 32 grados Celsius durante 3 horas. La mezcla se diluyó a 25 ml con tampón (20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol, nada de NaCl, pH 7,3). La mezcla se cargó sobre una columna MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare) preacondicionada (con tampón A) y se eluyó utilizando el siguiente programa: 10 CV eq, 5 CV lavado muestra no unida, 10 CV 0 - 25 % tampón B, 10 CV 25-28 % (tampón B), 25 CV 28 - 100 % tampón B y 10 CV 100 % tampón B. Tampón de imidazol A: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol, pH 7,3. Tampón de imidazol B: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3.

[0187] El análisis SDS-PAGE (reducido, 7% de Tris acetato de NuPage, 1,0 mm, Invitrogen, 150 V, 70 min) confirmó la incorporación del fluoróforo en la proteína.

Ejemplo 23

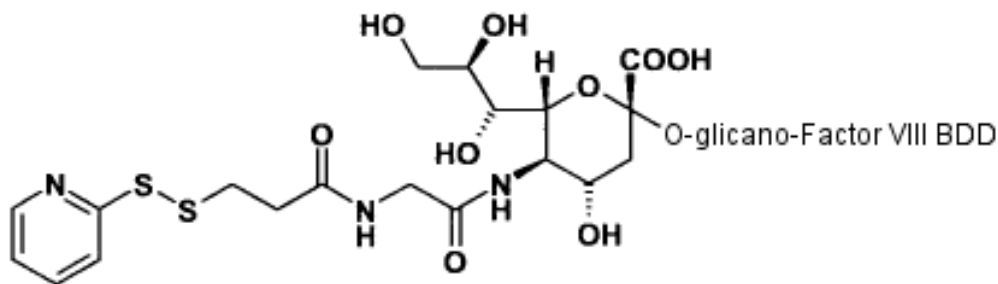
30 N,O-glicano-asialo-Factor VIII BDD, compuesto 6M

[0188] Factor VIII BDD (1 mg) en tampón acuoso (20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol, 500 mM de NaCl, pH 7,3) se mezcló con sialidasa recombinante de *Arthrobacter Ureafaciens* (Biotechnol. Appl. Biochem., 2005, 41, 225-231). Las concentraciones finales fueron: Factor VIII: 5,7 mg/ml y sialidasa: 1,5 U/ml. La mezcla se dejó a 25 grados Celsius durante 30 minutos. La mezcla se diluyó a 20 ml con tampón (20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol, 25 mM de NaCl, pH 7,3). La mezcla se cargó sobre una columna MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare) preacondicionada (con tampón A) y se eluyó utilizando el siguiente programa: 0,1 CV eq 5 % tampón B, 2 CV lavado muestra no unida (5 % tampón B), 10 CV 5 - 100 % (tampón B), 5 CV 100 % tampón B. Tampón de imidazol A: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 25 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3. Tampón de imidazol B: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3.

Ejemplo 24

45 Extremo 3-(2-piridildisulfanil)propanoilamino conjugado a FVIII BDD vía O-glicano, compuesto 7M

[0189]



[0190] Factor VIII BDD asialo, compuesto 6 (3,95 mg) en el tampón (20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol, 500 mM de NaCl, pH 7,3) se mezcló con disodio (5R,6R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1-il)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-ol]metoxi-óxido-fosforil]oxi-4-hidroxi-5-[[2-[3-(2-piridildisulfanil)propanoilamino]acetil]amino]-6-[(2R)-1,2,3-trihidroxipropil]tetrahidropirano-2-carboxilato y sialil transferasa (ST3Gall). Las concentraciones finales fueron: Factor VIII: 1,16 mg/ml, sialiltransferasa: 0,22 mg/ml, nucleótido: 250 micromolares. Volumen final: 3,4 ml. La mezcla se dejó a 32 grados Celsius durante 20 horas. Disodio (2R,5R,6R)-5-acetamido-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1-il)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]metoxi-óxido-fosforil]oxi-4-hidroxi-6-[(2R)-1,2,3-trihidroxipropil]tetrahidropirano-2-carboxilato se añadió a la mezcla (concentración final: 54 micromolares). La mezcla se incubó a 32 grados Celsius durante 30 minutos. La mezcla se diluyó a 25 ml con tampón (20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol, 25 mM de NaCl, pH 7,3).

[0191] La mezcla se cargó sobre una columna MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare) preacondicionada (con tampón A) y se eluyó utilizando el siguiente programa: 1 CV eq 0 % tampón B, 2 CV lavado muestra no unida (0 % tampón B), 10 CV 0 - 20 % tampón B, 10 CV 20 % tampón B, 10 CV 100 % tampón B. Tampón de imidazol A: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 25 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3. Tampón de imidazol B: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3.

[0192] La proteína aislada se mezcló con sialil transferasa (ST3GallIII) y disodio (2R,5R,6R)-5-acetamido-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1-il)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]metoxi-óxido-fosforil]oxi-4-hidroxi-6-[(2R)-1,2,3-trihidroxipropil]tetrahidropirano-2-carboxilato. Las concentraciones finales fueron: Factor VIII: 1,12 mg/ml, sialiltransferasa: 0,13 mg/ml, nucleótido: 54 micromolares. Volumen final: 3,2 ml. La mezcla se dejó a 32 grados Celsius durante 1 hora.

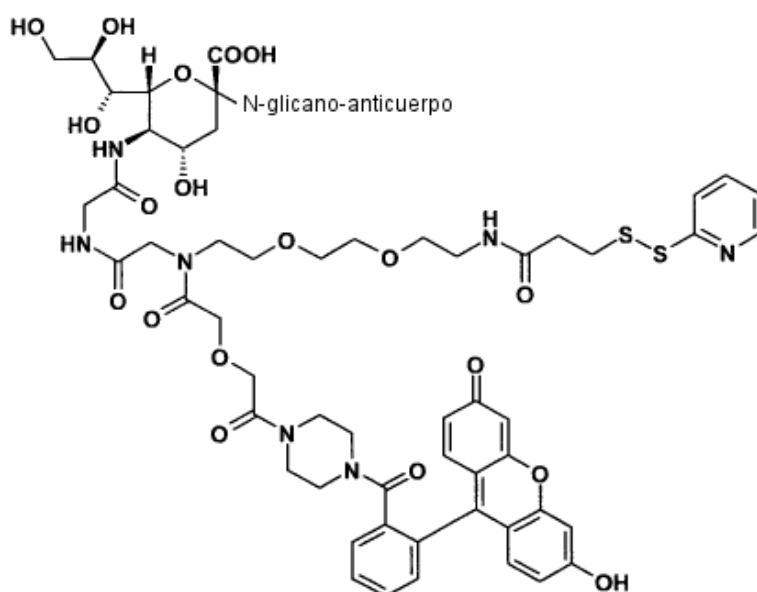
[0193] La mezcla se diluyó a 40 ml con tampón (20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol, 25 mM de NaCl, pH 7,3). La mezcla se cargó sobre una columna MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare) preacondicionada (con tampón A) y se eluyó utilizando el siguiente programa: 5 CV lavado muestra no unida (0 % tampón B), 5 CV 0 - 20 % tampón B, 15 CV 20 % tampón B, 10 CV 100 % tampón B. Tampón de imidazol A: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 25 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3. Tampón de imidazol B: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3.

[0194] La incubación del producto con PEG 30 kDa tior antes del análisis SDS-PAGE dio como resultado la presencia de una banda con PM más alto que FVIII bajo condiciones no reducidas pero no bajo condiciones reducidas.

Ejemplo 25

Extremo de 2-piridildisulfanil fluorescente conjugado a anticuerpo AP3 de longitud total vía N-glicano, compuesto 8M

[0195]



[0196] El anticuerpo AP3 mIgG1 wt HC LC C39S de longitud total (1,5 mg) en el tampón acuoso (50 % 100 mM de HEPES.HCl, 150 mM de NaCl, pH 7,5, 33 % 100 mM de Glicina.HCl, pH 3,5, 17 % 20 mM de HEPES.HCl, 150 mM de

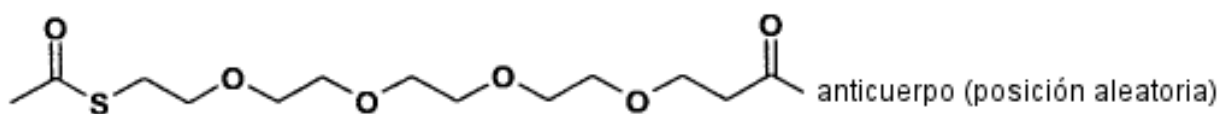
CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 25 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3. Tampón de imidazol B: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3.

5 [0200] El análisis SDS-PAGE (reducido y no reducido, 7 % Tris acetato de NuPage, 1,0 mm, Invitrogen, 150 V, 70 min) confirmó la incorporación del fluoróforo en la cadena pesada de FVIII BDD.

Ejemplo 27

10 Extremo de 3-[2-[2-[2-(2-acetilsulfaniletoksi)etoxi]etoxi]etoxi]propanoil conjugado a anticuerpo de longitud total AP3, posiciones aleatorias, compuesto 10 M

[0201]



15 [0202] El anticuerpo AP3 mlgG1 wt Hc Lc C39S de longitud total (1,3 mg) en el tampón (50 % 100 mM HEPES.HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5, 33 % 100 mM Glicina.HCl, pH 3,5, 17 % 20 mM HEPES.HCl, 150 mM NaCl, 0,01 % Tween80, pH 7,5, pH final 7,2) se colocó en un dispositivo Millipore Amicon Ultra Centrifugal, MWCO 10,000 Da. La proteína se lavó varias veces con tampón (20 mM de HEPES, pH 7,3). La solución se concentró a 65 microlitros en dicho tampón.

20 [0203] Se disolvió (2,5-dioxopirrolidin-1-il) 3-[2-[2-[2-(2-acetilsulfaniletoksi)etoxi]etoxi] etoxi]propanoato (Pierce/Thermo Scientific, 2,2 mg, 5,2 micromoles) en el tampón (20 mM de HEPES, pH 7,3, 100 microlitros). 4 microlitros de esta solución (209 nmol) se añadió a la solución de proteína. La mezcla resultante se incubó durante 1 hora. La solución se colocó en un dispositivo Millipore Amicon Ultra Centrifugal, MWCO 10.000 Da. La proteína se lavó varias veces con
25 tampón (20 mM de HEPES, pH 7,3).

Ejemplo 28

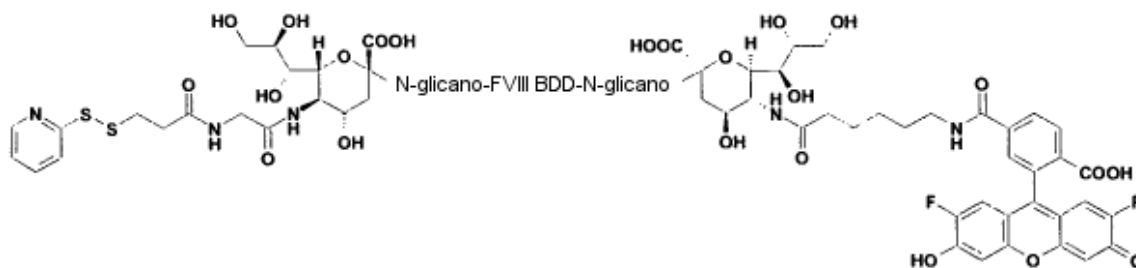
N-glicano-asialo-Factor VIII BDD, compuesto 11M

30 [0204] Se mezcló Factor VIII BDD (7 mg) en el tampón acuoso (20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol, 500 mM de NaCl, pH 7,3) con sialidasa recombinante de sialidasa recombinante de *Clostridium perfringens* (4 U). El volumen final fue 4 ml. La mezcla se dejó a 25 grados Celsius durante 30 minutos. La mezcla se diluyó a 5 ml con tampón (20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol, 25 mM de NaCl, pH 7,3). La mezcla se cargó sobre una columna MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare) preacondicionado (con tampón A) y se eluyó utilizando el siguiente programa: 5 CV eq 0 % tampón B, 2 CV lavado muestra no unida (0 % tampón B), 25 CV 0-70 % (tampón B), 10 CV 70-100 % (tampón B), 5 CV 100 % tampón B. Tampón A: histidina (1,5 mg/ml), CaCl₂ (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (2,9 mg/ml) y sacarosa (3 mg/ml), pH 7,0. Tampón B: histidina (1,5 mg/ml), CaCl₂ (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (58 mg/ml) y sacarosa (3 mg/ml), pH 7,0

Ejemplo 29

45 Extremo de 3-(2-piridildisulfanil)propanoilamino conjugado a FVIII BDD marcado con fluorescencia vía *N*-glicano, compuesto 12M

[0205]



[0206] Se mezcló N-glicano-asialo-Factor VIII BDD, compuesto 11M (3 mg) en el tampón (histidina (1,5 mg/ml), CaCl₂ (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (30 mg/ml) y sacarosa (3 mg/ml), pH 7,0) con disodio (5R,6R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1-il)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]metoxi-oxido-fosforil]oxi-4-hidroxi-5-[[2-(3-(2-piridildisulfanyl)propanoilamino)acetil]amino]-6-[(2R)-1,2,3-trihidroxiopropil]tetrahidropirano-2-carboxilato, compuesto 1M, disodio (2R,5R,6R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1-il)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]metoxi-oxido-fosforil]oxi-5-[6-[[4-carboxi-3-(2,7-difluoro-3-hidroxi-6-oxo-xanten-9-il) benzoil]amino]hexanoilamino]-4-hidroxi-6-[(2R)-1,2,3-trihidroxiopropil]tetrahidropirano-2-carboxilato y sialil transferasa (ST3GalIII de rata rec.). Las concentraciones finales fueron: Factor VIII: 0,85 mg/ml, sialiltransferasa: 271 U/l, nucleótido de verde Oregón 488: 14, micromolares, compuesto 1M: 15 micromolares. Volumen final: 3,5 ml. La mezcla se dejó a 32 grados Celsius durante 18 horas. Se añadió disodio (2R,5R,6R)-5-acetamido-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1-il)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]metoxi-oxido-fosforil]oxi-4-hidroxi-6-[(2R)-1,2,3-trihidroxiopropil]tetrahidropirano-2-carboxilato a la mezcla (concentración final: 54 micromolares). La mezcla se incubó a 32 grados Celsius durante 30 minutos.

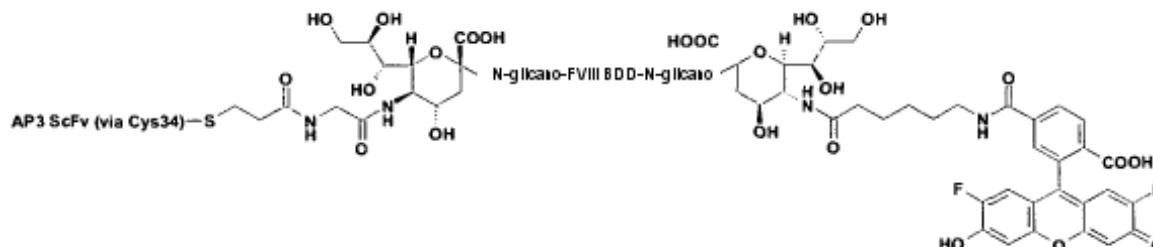
[0207] La mezcla se diluyó a 14 ml con tampón (histidina (1,5 mg/ml), CaCl₂ (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (2,9 mg/ml), y sacarosa (3 mg/ml), pH 7,0). La mezcla se cargó sobre una columna MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare) preacondicionada (con tampón A) y se eluyó utilizando el siguiente programa: 5 CV eq, 2 lavado muestra no unida, 25 CV 0-70%, 10 CV 70-100 % tampón B, y 5 CV 100 % B. Tampón de imidazol A: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 25 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3. Tampón de imidazol B: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3.

[0208] El análisis SDS-PAGE (reducido y no reducido, 7 % Tris acetato de NuPage, 1,0 mm, Invitrogen, 150 V, 70 min) confirmó la incorporación del fluoróforo en las cadenas pesada y ligera del FVIII BDD. La incubación del producto con PEG 30 kDa tior antes del análisis SDS-PAGE dio como resultado la presencia de una banda fluorescente con PM más alto que FVIII bajo condiciones no reducidas pero no bajo condiciones reducidas.

Ejemplo 30

Conjugado entre extremo de 3-(2-piridildisulfanyl) propanoilamino conjugado a FVIII BDD marcado con fluorescencia vía N-glicano, compuesto 12M y AP3 scFv LC-HC, compuesto 13M

[0209]



35

[0210] AP3 scFv en una mezcla 1:1 de tampón de glicina (100 mM, pH 3,5) y tampón de HEPES (100 mM, pH 7,5) se mezcló con extremo de 3-(2-piridildisulfanyl) propanoilamino conjugado a FVIII BDD marcado con fluorescencia vía N-glicano, compuesto 12M en el tampón acuoso (20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol, 500 mM de NaCl, pH 7,3). Las concentraciones finales fueron: compuesto 12M: 0,25 mg/ml, ScFv: 2 micromolares, 0,06 mg/ml. Volumen final: 2,1 ml. La mezcla se dejó a 23 grados Celsius durante 3 horas. Se agregaron

5 soluciones de cisteína (1 mg/ml) en el tampón (2,3 microlitros) y cistina (1 mg/ml) en el tampón (3,5 microlitros). La mezcla se dejó a 23 grados Celsius durante 15 minutos. La mezcla se diluyó a 40 ml con tampón (20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol, 25 mM de NaCl, pH 7,3). La mezcla se cargó sobre una columna MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare) preacondicionada (con tampón A) y se eluyó utilizando el siguiente programa: 5 CV eq 0 % tampón B, 2 CV lavado muestra no unida (0 % tampón B), 25 CV 0-70 % (tampón B), 50 CV 70-100 % (tampón B), 5 CV 100 % tampón B. Tampón de imidazol A: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 25 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3. Tampón de imidazol B: 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3.

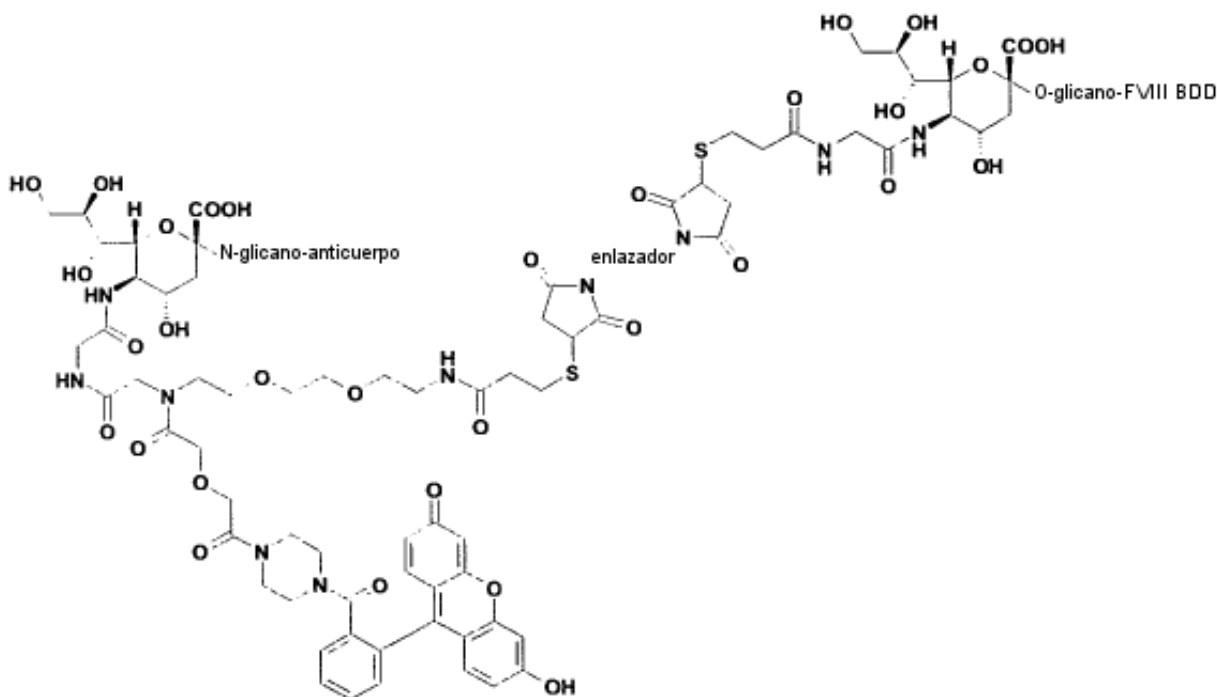
10 [0211] Las fracciones seleccionadas se transfirieron a un dispositivo Millipore Amicon Ultra Centrifugal, MWCO 50.000 Da y el volumen total se redujo a 0,5 ml. La mezcla se cargó sobre una columna Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare) preacondicionada (con tampón) y se eluyó utilizando el siguiente tampón: histidina (1,5 mg/ml), CaCl₂ (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (18 mg/ml) y sacarosa (3 mg/ml), pH 7,0.

15 [0212] El análisis SDS-PAGE (no reducido al igual que trombina digerida/no reducida, 7 % Tris acetato de NuPage, 1,0 mm, Invitrogen, 150 V, 70 min) mostró la presencia de bandas fluorescentes con PM más alto que el material de partida. La proteína se mostró que no enlazaba con plaquetas lo que podrían racionalizarse por el hecho de que Cys-34 se encuentra en una región CDR, por lo tanto, efectúa afinidad de enlace.

20 **Ejemplo 31**

Conjugado entre extremo de 3-(2-piridildisulfanil) fluorescente anticuerpo conjugado AP3 mlgG1 wt HC LC C39S de longitud total vía N-glicano, compuesto 8M y FVIII BDD vía extremo en O-glicano, compuesto 7M

25 [0213]



30 [0214] El anticuerpo AP3 mlgG1 wt Hc Lc C39S de longitud total conjugado a un extremo, por ejemplo, compuesto 8M en el tampón se mezcla con una solución de tris(carboxietil)fosfina en el tampón. El tampón se cambia para eliminar la trialquilfosfina en exceso después de la reducción selectiva del enlace bisulfuro. Se añade una solución de una bismaleimida, por ejemplo, bismaleimida PEG 6000 de Rapp Polymere GmbH, n° de catálogo: 11 6000-45, en el tampón. El tampón se cambia después de la finalización de la reacción.

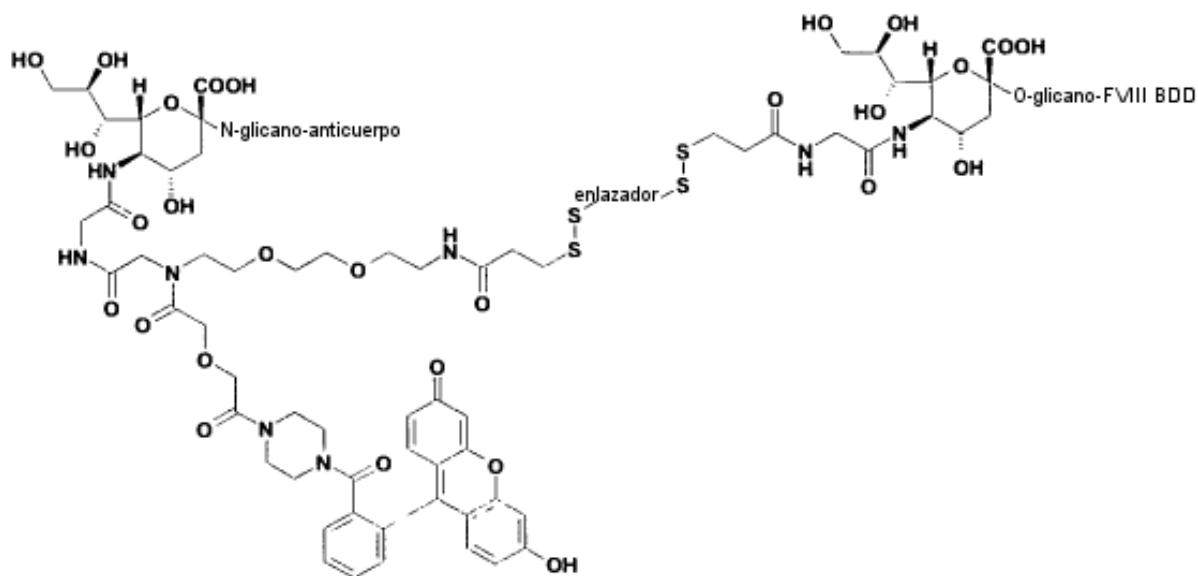
35 [0215] FVIII conjugado a un extremo de 3-(2-piridildisulfanil)propanoamino, por ejemplo, compuesto 7M, en el tampón se mezcla con una solución de tris(carboxietil)fosfina en el tampón. El tampón se cambia para eliminar la trialquilfosfina en exceso después de la reducción selectiva del enlace bisulfuro.

[0216] Las dos soluciones de proteínas modificadas (FVIII y AP3 Ab) se mezclan. La formación del conjugado deseado se monitoriza por análisis SDS-PAGE. La purificación se lleva a cabo utilizando un tipo adecuado de cromatografía, por ejemplo, intercambio de iones o cromatografía de afinidad anti-FVIII.

5 Ejemplo 32

Conjugado entre anticuerpo AP3 mlgG1 wt HC LC C39S de longitud total a extremo 3-(2-piridildisulfanil) fluorescente conjugado vía N-glicano, compuesto 8M y FVIII BDD vía extremo en O-glicano, compuesto 7M

10 [0217]

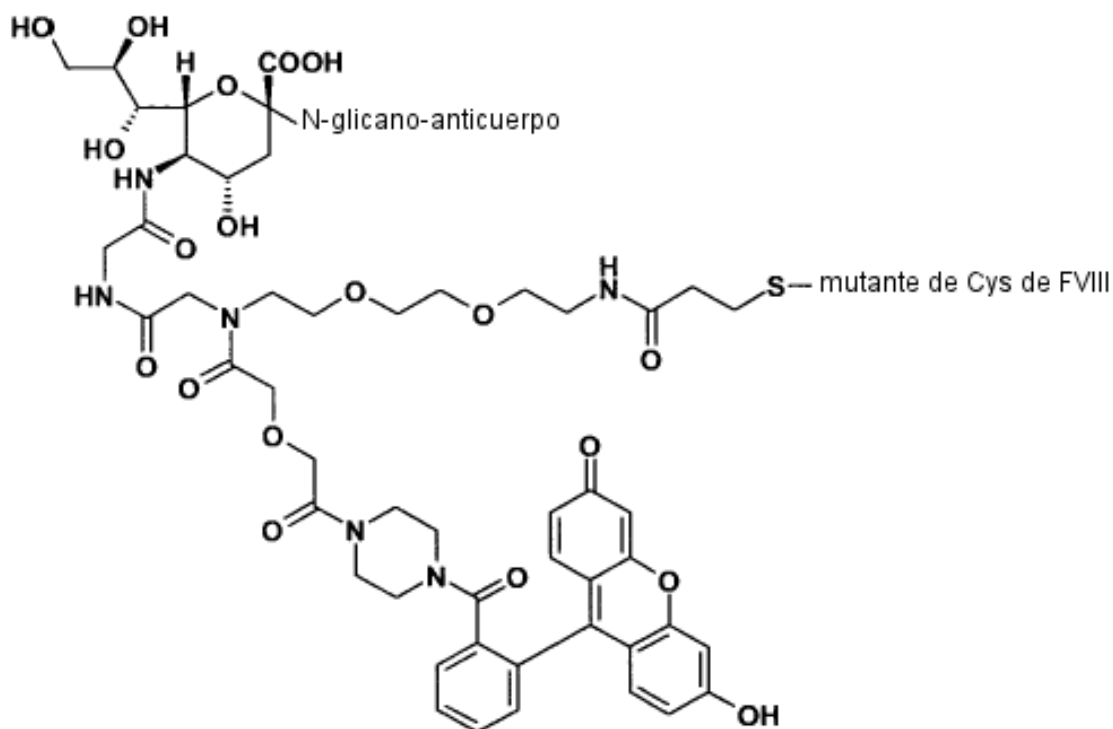


[0218] Anticuerpo AP3 mlgG1 wt Hc Lc C39S de longitud total conjugado a un extremo, por ejemplo, compuesto 8M en tampón se mezcla con una solución de un ditiol, por ejemplo, 3,6-dioxa-1,8-octaneditiol, en tampón. El tampón se cambia tras la finalización de la reacción. Una solución de extremo 3-(2-piridildisulfanil)propanoilamino conjugado a FVIII, por ejemplo, compuesto 7M, se añade. La formación del conjugado deseado se monitoriza por análisis SDS-PAGE. La purificación se realiza utilizando un tipo adecuado de cromatografía, por ejemplo, intercambio de iones o cromatografía de afinidad anti-FVIII.

20 Ejemplo 33

Conjugado entre anticuerpo AP3 mlgG1 wt HC LC C39S de longitud total conjugado al extremo 3-(2-piridildisulfanil) fluorescente vía N-glicano, compuesto 8M y mutante Cys de FVIII

[0219]



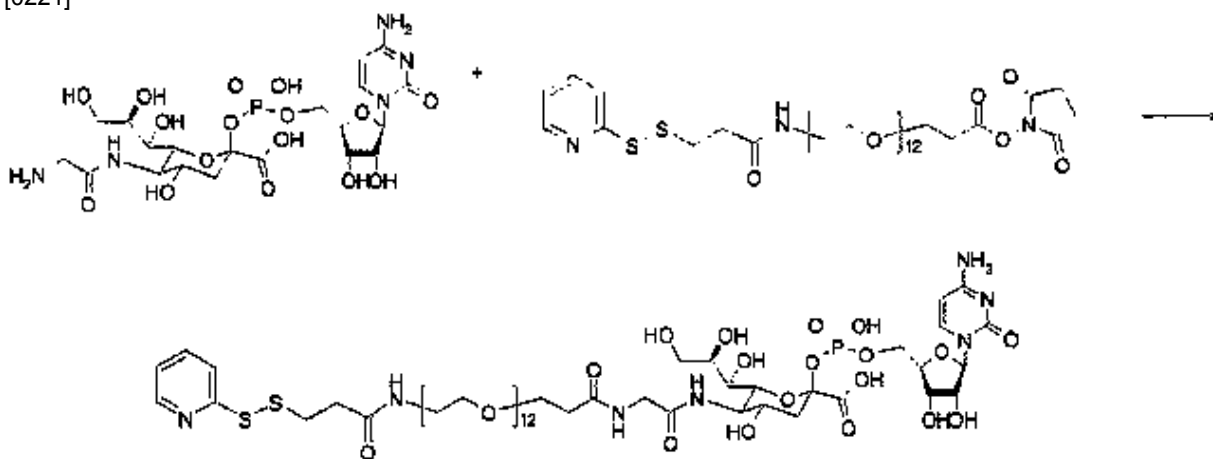
[0220] Un mutante de Cys accesible de superficie de FVIII se conjuga al anticuerpo AP3 o similar (o fragmento del mismo) utilizando los mismos métodos que se han descrito anteriormente. El mutante de Cys de FVIII se trata, si es necesario, con agente de reducción para eliminar los sustituyentes ligados de manera covalente a la cisteína mutada, dando así como resultado la generación / garantía de la presencia de un tiol. La proteína formada se conjuga con un reactivo adecuado del tipo descrito, por ejemplo, extremo de 2- piridilidisulfanil fluorescente conjugado a anticuerpo de longitud total AP3 vía N-glicano, compuesto 8M. La formación del conjugado deseado se monitoriza por análisis SDS-PAGE. La purificación se realiza utilizando un tipo adecuado de cromatografía, por ejemplo, intercambio de iones o cromatografía de afinidad anti-FVIII.

Ejemplo 34

15 Preparación de FVIII modificado con verde Oregon 488 en los N-glicanos y dPEG12-SH en el O- glicano

Paso 1: preparación de PySS-dPEG12-GSC (compuesto J1)

[0221]



[0222] Éster 5'-monofosfato de citosina de ácido glicil-siálico (GSC, sal de dimetilamina, PM 673,85% puro, 96 mg, 153 μ mol) se disolvió en 100 mM de tampón de TRIS, pH 8,4 (650 μ L) seguido de acetonitrilo (650 μ L) y se agitó para observar un sistema bifásico. SPDP-dPEG12-NHS-éster (Quanta Biodesign, prod. no. 10378, 1,2 eq, 183 μ mol, 170 mg) se disolvió en 650 μ L de THF, seguido de 100 mM de TRIS, pH 8,4, (650 μ L) se observó un leve precipitado blanco nebuloso y esta solución de éster de NHS se añadió a la solución GSC. La solución era ligeramente nebulosa a pH 8,4. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 7 h y la mezcla resultante se congeló y se liofilizó para obtener el compuesto bruto. El polvo blanco obtenido después de la liofilización se purificó por HPLC preparativa usando agua limpia como tampón de equilibrado y un gradiente lineal de acetonitrilo puro para la elución. Las fracciones que contenían el producto deseado se agruparon y se liofilizaron para producir 100 mg del compuesto objetivo, que fue homogéneo por HPLC analítica y se identificó por espectrometría de masas.

Paso 2: acoplamiento de PySS-dPEG12-GSC al O-glicano de wt BDD FVIII (compuesto J2)

[0223] Se añadió a wt BDD FVIII ("N8", 5,7 mg/ml; 5 mg, 875 μ l) sialidasa *A. urifaciens* (0,44 mg/ml, 50 μ l) y PySS-dPEG12-GSC (J1), 1 mg/ml en el tampón 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02% de Tween 80, 200 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3, 100 μ l se usó) y His-ST3Gal-I (2,5 mg/ml, 375 μ l). La mezcla reactiva se incubó a 32°C durante toda la noche durante un periodo de 17 h. Luego se diluyó con 25 ml de tampón 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02% de Tween 80, 25 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3, para bajar la conductividad. La mezcla se cargó luego a una columna MonoQ 5/50 GL equilibrada con 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02% de Tween 80, 25 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3. El producto se eluyó utilizando un gradiente con tampón de elución 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02% de Tween 80, 1 M de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3. Se eluyó material no relacionado con FVIII con 20% de tampón de elución, mientras el producto se eluyó con 100% de tampón de elución. Las fracciones que contenían el producto deseado (J2) se agruparon. Rendimiento 4,1 mg, 1,17 mg/ml.

Paso 3: etiquetando con verde Oregón y recubrimiento de los N-glicanos (J3)

[0224] La proteína modificada preparada según el paso 2 (J2) se mezcló con MBP-ST3Gal-III (1,2 U/ml, 300 μ l) y verde Oregón 488-GSC (2 mg se disolvieron en 800 μ l de tampón 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02% de Tween 80, 200 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3, 200 μ l, 0,5 mg, 20 eq. se usó) y se incubó a oscuras a 32 °C durante toda la noche. Posteriormente, CMP-NAN (9 mg en 250 μ l de tampón 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02% de Tween 80, 200 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3) se añadió a la mezcla reactiva y se incubó durante 1 hora más a 32°C. Luego se diluyó con 30 ml 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02% de Tween 80, 25 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3 para reducir la conductividad. La purificación se efectuó por ALEX como se indica en el paso 2. Rendimiento: 1,54 mg, 0,51 mg/ml.

Paso 4: reducción con TCEP

[0225] La proteína modificada preparada según el paso 3 (J3) se mezcló con fosfina triscarboxilética (TCEP, 700 eq., 1,69 mg; 6 mg de TCEP se disolvió en el tampón de 1 ml, 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02% de Tween 80, 200 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3, 282 μ l se usó) y se incubó durante 30 min a 5 °C a oscuras. Luego se diluyó con 30 ml de 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0,02% de Tween 80, 25 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3 para reducir la conductividad. La purificación se efectuó por ALEX como se indica en el paso 2. Rendimiento: 610 μ g, 610 μ g/ml. El producto se purificó más por SEC (columna: Superdex 200 10/300 GL) usando el tampón: histidina (1,5 mg/ml), CaCl_2 (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (18 mg/ml), sacarosa (3 mg/ml) como fase móvil. Las fracciones que contenían el producto deseado (J4) se agruparon. Rendimiento: 420 μ g, 120 μ g/ml. Los datos del análisis del gel SDS PAGE del producto fueron esencialmente idénticos a N8 y la formación de imágenes por fluorescencia en gel mostró que la HC y la LC contenían ambas marcador de fluorescencia. El producto se sometió a una reacción de ensayo utilizando una PEG-maleimida 30 kDa. El análisis SDS PAGE de esta reacción mostró bandas con PM aumentado y la desaparición de la banda de FVIII HC, indicando así la presencia del grupo tiol libre.

[0226] Este ejemplo muestra que el FVIII se puede modificar en el O-glicano con un grupo tiol.

Ejemplo 35

Preparación del anticuerpo AP3 mIgG de longitud total modificado con los grupos SSPy (J5)

[0227] Al AP3 mIgG1 wt LC C39S de longitud total (3,0 mg/ml, 400 μ l, 1200 μ g, 8 nmol, pH 7,2, en una mezcla de tampones 50 % de 100 mM de HEPES HCl, 150 mM de NaCl, pH 7,5, 33 % de 100 mM de glicina HCl, pH 3,5 y 17 % de 20 mM de HEPES HCl, 150 mM de NaCl, 0,01 % de Tween80, pH 7,5) se le cambió el tampón a HEPES 100 mM, pH 7,5 por concentración a 100 μ l (15 min, 12.000 g, Millipore Amicon Ultra 10 kDa), diluyendo a 900 μ l y luego concentrado a 100 μ l (12 min, 12.000 g) x 6. Volumen final fue de aproximadamente 80 μ l. Luego se diluyó aprox. 260 μ l usando HEPES 100 mM, pH 7,5. Posteriormente, SPDP-dPEG12 NHS- éster (Quanta Biodesign, prod no. 10378, 1,8 mg se disolvió en 400 μ l ml HEPES 100 mM, pH 7,5 de éste, 20 eq., 144 μ g, 32 μ l se usó) se añadió al AP3 FL mIgG cambiado de tampón. La mezcla reactiva se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. El análisis de gel SDS-PAGE reducido y no reducido mostró que las bandas correspondientes al anticuerpo FL y las cadenas individuales

pesada y ligera aumentaron el peso molecular, además de ser más amplias en apariencia, mostrando así que la modificación deseada había tenido lugar. A la proteína se le cambió el tampón a HEPES 100 mM, pH 7,5 como se ha descrito anteriormente. Rendimiento 765 µg, 8,5 mg/ml.

- 5 [0228] Este ejemplo muestra que AP3 FL mIgG se puede modificar con un agente de acilación que contiene el grupo de conjugación SSPy sensible al tiol.

Ejemplo 36

- 10 Preparación de un conjugado entre FVIII y AP3 FL mIgG

[0229] AP3 mIgG1 dPEG12-SSPy (J5, 8,5 µg/µl, 0,057 nmol/µl, 31 µl, 1,76 nmol) se mezcló con 2500 µl del derivado de FVIII J4 (300 µg, 1,76 nmol, 120 µg/ml). La mezcla se filtró de forma estéril, se envolvió en una hoja de aluminio y se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche, después de lo cual el análisis de gel SDS-PAGE mostró que los productos con PM correspondientes al aducto o aductos deseados entre wt BDD FVIII y AP3 FL mIgG se habían formado. La formación de imágenes por fluorescencia en gel mostró que estas bandas contenían marcador de fluorescencia, lo que muestra se originaron a partir de las cadenas HC o LC de FVIII. El análisis de gel también se llevó a cabo en presencia de exceso de N-etilmaleimida para verificar que la conjugación no ocurrió durante la preparación de la muestra de SDS. Se dejó reaccionar la mezcla durante un tiempo adicional de 3 días, después de lo cual se diluyó con 30 ml de 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 25 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3 y se cargó en una columna MonoQ 5/50 GL equilibrada con 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 25 mM de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3. El producto se eluyó utilizando un gradiente lineal con tampón de elución 20 mM de Imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0,02% de Tween 80, 1 M de NaCl, 1 M de glicerol, pH 7,3. De esta manera, el AP3 FL mIgG libre se separó del FVIII BDD libre y el conjugado. El análisis SDS-PAGE no reducido y reducido mostró que unas fracciones contenían el producto deseado. El gel no reducido indicó una desaparición de la banda de HC de FVIII mientras que mostró bandas de alto PM que correspondían a conjugados entre AP3 FL mIgG y FVIII. La transferencia Western con Ab específico de mIgG mostró que estas bandas contenían el anticuerpo AP3 FL. El gel reducido mostró la presencia de la cadena pesada y ligera de FVIII y AP3.

- 30 [0230] Este ejemplo muestra que AP3 FL mIgG y FVIII BDD se pueden conjugar vía un enlace bisulfuro formado por la reacción entre un grupo tiol en el AP3 FL mIgG y un grupo SSPy en el FVIII BDD.

Ejemplo 37

- 35 FVIII:C en las cosechas de cultivos celulares medido por ensayo cromogénico

[0231] La actividad de FVIII (FVIII:C) del compuesto rFVIII en la cosecha del cultivo celular (fracción sobrenadante) se evaluó en un ensayo de FVIII cromogénico usando reactivos COATEST SP (Chromogenix) de la siguiente manera: las muestras de rFVIII y un FVIII estándar (Coagulation reference, Technoclone) se diluyeron en el tampón de ensayo COATEST (50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1 % de BSA, pH 7,3, con conservante). Cincuenta µl de muestras, estándares y control negativo de tampón se agregaron a placas de microtitulación de 96 pocillos (Spectraplates MB, Perkin Elmer). Todas las muestras se evaluaron diluidas 1:100, 1:400, 1:1600 y 1:6400. El reactivo de factor IXa/factor X, el reactivo de fosfolípido y CaCl₂ del kit COATEST SP se mezclaron 5:1:3 (vol:vol:vol) y 75 µl de esto se añadió a los pocillos. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, se añadió 50 µl de la mezcla de sustrato de Factor Xa S-2765/inhibidor de trombina I-2581 y las reacciones se incubaron 5 min a temperatura ambiente antes de añadir 25 µl de 1 M de ácido cítrico, pH 3. La absorbancia a 405 nm se midió en un lector de placa de microtitulación Envision (Perkin Elmer) con absorbancia a 620 nm usada como longitud de onda de referencia. El valor para el control negativo se sustrajo de todas las muestras y una curva de calibración preparada por regresión lineal de los valores de absorbancia trazados vs. concentración de FVIII. La actividad específica se calculó por división de la actividad de las muestras con la concentración de proteína determinada por ELISA.

Ejemplo 38

- 55 Actividad específica de las proteínas de fusión de AP3-FVIII en los ensayos de actividad de FVIII clínicamente relevantes

[0232] La actividad de FVIII de las proteínas purificadas y los conjugados (N8 control, F8-500 AP3-LC-HC scFV-Δa3 (SEC ID nº 39), F8-500 AP3-LC-HC scFV (SEC ID nº 42) y F8-500 AP3-HC-LC scFV (SEC ID nº 41)) se evaluó en el ensayos estándar de FVIII:C, bien ensayos cromogénicos bien en un ensayo de coagulación de una etapa. La actividad de FVIII cromogénico de las proteínas purificadas se evaluó utilizando el ensayo COATEST SP (Chromogenix, Lexington, MA, USA). El ensayo se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante con modificaciones mínimas y se realizó en un formato de placa de 96 pocillos. En resumen, las muestras de FVIII diluido y el material de referencia de FVIII se incubaron con una mezcla de reactivo de factor IXa/factor X, reactivo de fosfolípido y CaCl₂ del kit COATEST SP. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla de sustrato de factor Xa S-2765/ inhibidor de trombina I-2581 se añadió y las reacciones se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente antes de que se detuviera la reacción con 20% de ácido cítrico. La absorbancia a 415 nm se midió en un lector de placa de

microtitulación Spectramax (Molecular Devices) con absorbancia a 620 nm usada como longitud de onda de referencia. Un FVIII recombinante calibrado contra el 7° FVIII estándar recombinante WHO/NIBSC se usó como material de referencia. Véase la tabla 4

5 Ejemplo 39

FVIII:C en muestras purificadas medido por ensayo de coágulo de una etapa

10 [0233] La actividad de coagulación de FVIII de los compuestos de FVIII se determinó por dilución de las muestras de FVIII concentrado y el material de referencia primero en el tampón y luego en plasma deficitario de FVIII con Factor de von Willebrand (Siemens, Deerfield, IL, USA) según las recomendaciones SSC. Cada muestra de FVIII se midió en 4 concentraciones diferentes. La actividad de coagulación de FVIII se midió en un instrumento ACL 9000 utilizando el programa de factor único (FVIII:Cd) donde las muestras de FVIII se mezclaron con reactivo APTT (Synthasil, ILS, Bedford, MA, USA), 25 mM de CaCl₂ y plasma deficitario de FVIII. Un FVIII recombinante calibrado contra el 7° FVIII estándar recombinante WHO/NIBSC se usó como material de referencia. S

Tabla 4

Compuesto	Actividad de coágulo específica (IU/mg)	Actividad cromogénica específica (IU/mg)
Conjugado N8-AP3 IgG compound MZ1	n.d.	2687 ± 177
F8-500 AP3 HC-LC	6867 ± 101 (n=2)	6837 ± 1241 (n=2)
F8-500 AP3-LC-HC scFV	5565 ± 69 (n=2)	5677 ± 1049 (n=2)
F8-500 AP3-LC-HC scFV-Δa3	13528 ± 2205 (n=3)	10554 ± 1410 (n=3)
N8 control	8533 ± 638 (n=5)	7769 ± 692 (n=5)

20

[0234] Como se muestra en la tabla 4, las proteínas de fusión de AP3-FVIII y los conjugados tienen actividades de FVIII similares en los ensayos de actividad de FVIII cromogénico y de coagulación a las del material de inicio N8.

25 Ejemplo 40

Generación de trombina soportada por proteínas de fusión AP3-N8 específicamente ligadas a plaquetas

30 [0235] Pruebas de coagulación globales tales como prueba de generación de trombina (TGT) se ha sugerido que son mediciones fisiológicamente más relevantes de la actividad de Factor VIII (FVIII) que los ensayos cromogénicos y de coagulación, especialmente cuando las plaquetas están incluidas en los ensayos. Para valorar el efecto de AP3-N8 en las plaquetas, se evaluaron los compuestos de FVIII (F8-500 AP3-LC-HC scFV-Δa3 y N8 control) en un sistema que simula la hemofilia A humana. Los simuladores de hemofilia A se prepararon por sustitución del plasma deficitario de FVIII (>1% de actividad de FVIII) con plaquetas lavadas de donantes de sangre normales particulares. El proceso de coagulación se inicia con factor tisular y calcio y la generación de trombina se puede seguir incluyendo sustrato de trombina fluorogénica en el ensayo, que se puede detectar incluso cuando se forman coágulos de fibrina. Así en la simulación de la hemofilia A, la cantidad de trombina generada y la velocidad de generación de trombina dependerán de la cantidad de FVIII presente en el TGT. El método TGT usado en este caso está modificado a partir de un ensayo de plasma rico en plaquetas (PRP). En resumen, las plaquetas aisladas de sangre citrada recogida de donantes sanos normales particulares y purificadas a través de una serie de pasos de lavado según el procedimiento de plaquetas Mustard *Washed se adicionó al plasma deficitario de FVIII (George King, Overland Park, KA, USA) en una concentración de 150,000 plaquetas/μl. 80μL de estas PRP deficitarias de FVIII (100,000 plaquetas/μl final) se mezcló con 10μl de Innovin (dilución final 1:200.000) en una placa de microtítulo y se preincubó durante 10 min a 37°C, antes de añadir 10 μl de compuesto de FVIII o tampón y 20 μl de sustrato fluorogénico (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem, concentración final 417 nM) mezclado con CaCl₂ (concentración final 16,7 mM). La emisión a 460 nm después de la excitación a 390nm se midió continuamente durante 2 horas en el lector de placa Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Corporation). La señal de fluorescencia se corrigió para actividad de trombina ligada a α2-macroglobulina y se convirtió a concentración de trombina utilizando un calibrador y el software TrombinoScope (Synapse BV).

50 [0236] Para demostrar que AP3 transporta una unión de plaqueta específica para N8 que permitiría que la molécula de FVIII fuera portada con la plaqueta en circulación y no sólo localizar a la plaqueta en el momento de la activación, el ensayo TGT anteriormente descrito se realizó con los siguientes pasos adicionales: *una vez que se obtuvieron las plaquetas lavadas, las plaquetas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con proteína de fusión AP3-N8 o N8 (20 U/ml) para permitir que los compuestos N8 se enlazaran a las plaquetas. Esta incubación estuvo seguida de dos pasos de lavado adicionales para eliminar todos los N8 no específicamente ligados a las plaquetas en reposo. Tras

5 estos dos pasos de lavado adicionales, las plaquetas se agregaron al plasma deficitario de FVIII, calcio y sustrato fluorogénico y la actividad de FVIII en forma de generación de trombina se midió como se ha descrito. Los parámetros obtenidos del software están registrados como "tiempo de latencia", que describe el tiempo que tarda en iniciarse la generación de trombina, "Pico" que describe el índice máximo de generación de trombina en nM y "Tiempo para pico". Un coágulo fuerte se caracteriza por la aparición temprana y rápida y altos índices de formación de trombina.

Tabla 5

Compuesto	Tiempo de latencia (min)	Pico (nM Trombina)	Tiempo para pico (min)
Tampón	18,2	9,9	97,9
N8 control	17,1	16,5	99,6
F8-500 AP3-LC-HC scFV- Δ a3	8,2	68,2	27,4

10

[0237] Los resultados muestran una generación de trombina fuerte en el experimento donde se incubaron las plaquetas con las proteínas de fusión AP3- N8, mientras que las plaquetas incubadas con N8 mostraron poco más que niveles de fondo (hemofilia A) de generación de trombina. Así, mientras el N8 control se podía eliminar de las plaquetas, la proteína de fusión AP3-N8 permanecía ligada a las plaquetas, demostrando así directamente una actividad de FVIII portada por las plaquetas.

15

Ejemplo 41

Análisis de unión de proteína de fusión a GPIIIa purificada

20

[0238] El análisis de interacción de unión se obtuvo por resonancia de plasmón de superficie en un instrumento Biacore T-100. La captura de GPIIb/IIIa purificada (Enzyme Research Laboratories) en una concentración fija se obtuvo por inmovilización directa a un chip CM5 a un nivel de 1000-4000 RU en 10 mM de acetato sódico, pH 4,5-5,0. Las diluciones de dos veces de los derivados de FVIII de 5-0,31 nM se evaluaron para unión a la GPIIb/IIIa inmovilizada. Tampón de migración y de dilución: 10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, 0,005% de p20, pH 7,4. Todos los derivados de FVIII se dializaron y diluyeron en el tampón de migración. Se obtuvo regeneración por 10 mM de glicina, pH 1,7. La determinación de constantes cinéticas y de unión (k_{on} , k_{off}) se obtuvo asumiendo una interacción 1:1 del derivado de FVIII y GPIIb/IIIa utilizando el software de evaluación Biacore T100. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

25

30

Tabla 6: análisis de resonancia de plasmón de superficie (SPR)

ID derivativa de FVIII	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	KD (nM)
F8-500 AP3-HC-LC scFV	1,3E+05	1,5E-04	1,2
F8-500 AP3-LC-HC scFV	1,4E+06	n.d.	n.d.
F8-500 AP3-LC-HC scFV- Δ a3	2,2E+06	5,0E-05	0,02
Conjugado N8-AP3 Compuesto MZ 1	2,5E+05	6,1E-06	0,02
n.d. índice de disociación observado demasiado bajo para determinación exacta de k_{off}			

Ejemplo 42

Análisis de enlace de fusiones/conjugados de FVIII a plaquetas

35

[0239] El enlace a plaquetas de una proteína de fusión se puede evaluar por citometría de flujo. Las plaquetas de la sangre periférica se pueden purificar o se puede usar toda la sangre. Las plaquetas pueden estar activadas o en reposo. Las plaquetas se incuban con proteína de fusión durante 15-30 min. La proteína de fusión puede estar directamente marcada con un fluoróforo o se puede detectar utilizando un anticuerpo secundario marcado de forma fluorescente. Un anticuerpo específico de plaquetas marcado de forma fluorescente que no interfiere con la unión de la proteína de fusión se puede añadir para valorar si las partículas que enlazan la proteína de fusión son de hecho plaquetas. Tras la incubación, las células se lavan para eliminar la proteína de fusión y las muestras se analizan en un citómetro de flujo. El citómetro de flujo detecta células no marcadas y moléculas marcadas de manera fluorescente que se enlazan a

40

45

células y así se puede utilizar para analizar específicamente hasta qué punto la proteína de fusión está enlazada a las plaquetas (u otras células).

5 [0240] La especificidad de unión se puede evaluar por ejemplo añadiendo un exceso de anticuerpos no marcados (cuando se usa proteína de fusión directamente marcada). La unión de la fracción de FVIII a las plaquetas se pueden evaluar, por ejemplo, añadiendo un exceso de annexina V o FVIII. La interiorización de la proteína de fusión por la plaqueta en reposo se puede evaluar, por ejemplo, mediante la incubación de plaquetas con proteína de fusión directamente marcada seguida de incubación con un anticuerpo, que aplaca la señal de la proteína de fusión de enlace de superficie (es decir, no interiorizado). Sólo la proteína de fusión interiorizada se detectará entonces por citometría de flujo. Se puede suponer que las plaquetas activadas liberarán proteína de fusión interiorizada en el sitio de formación de coágulo.

Ejemplo 43

15 Prueba de fusiones y conjugados FVIII-AP3 que enlazan a plaquetas

[0241] El enlace a plaquetas de F8-500 AP3-LC-HC scFV- Δ a3 (SEC ID nº 39) (AP3-N8 2097) y AP3 IgG de longitud total químicamente acoplado a N8 (MZ1 en el ejemplo 18) se evaluó por citometría de flujo. Las plaquetas lavadas de sangre periférica humana se prepararon y se incubaron con AP3-N8 en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 20 30 min (- 300.000 plaquetas por muestra). Como marcador de plaquetas, la proteína de peridina clorofila (PerCP)-marcada anti CD42a se añadió a las muestras junto con los constructos AP3-N8. Tras la incubación, las células se lavaron con tampón (20 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, 1 mg/ml de BSA, 5 mM de CaCl_2) para eliminar el anticuerpo no unido y se añadió (10 $\mu\text{g/ml}$) un anticuerpo monoclonal anti-FVIII ficoeritrina-Cy7 (PE-Cy7). Después de 30 min de incubación, las células se lavaron con tampón y las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD LSRFortessa™ con los detectores de dispersión trasero y lateral en el modo log (se analizaron al menos 5.000 eventos por muestra). Las dosis de AP3-N8 de ~ 0,025-51,2 nM (25,6 nM para MZ1) se analizaron para valorar dependencia de la dosis de la unión. Tres donantes se evaluaron en experimentos individuales para AP3-N8 2097 y un donante para el constructo MZ1. La especificidad de la unión a AP3-N8 se evaluó añadiendo exceso de AP3-LC-HC scFV-FLAG no marcado (SEC ID nº 21) a las muestras (hasta exceso de 50 veces). Así, los datos muestran unión específica de AP3 de los constructos al receptor de GPIIb/IIIa en las plaquetas. Experimentos que utilizan un constructo AP3-N8 similar, donde la fracción N8 estaba directamente marcada con verde Oregón dieron resultados comparables, soportando enlace específico del constructo AP3-N8 a las plaquetas (n = 5).

[0242] La interiorización del AP3-N8 se puede evaluar primero mediante la incubación de plaquetas con AP3-N8 marcado de manera fluorescente y medición de la fluorescencia por citometría de flujo y añadiendo luego un anticuerpo, que aplaca la señal del AP3-N8 enlazado de superficie (es decir, no interiorizado). Al reanalizar las muestras por citometría de flujo, sólo se detectará el AP3-N8 interiorizado.

Ejemplo 44

40 Prueba de efecto antiagregante de F8-500 AP3-LC-HC scFV- Δ a3 (SEC ID nº 39) en plaquetas

[0243] El efecto antiagregante posible de F8-500 AP3-LC-HC scFV- Δ a3 (SEC ID nº 39) se midió mediante el control del cambio en la transmisión de luz a través de una suspensión de plaquetas aisladas. Este método fue descrito en primer lugar esencialmente por Gustav von Born en los años 60 (Born, Nature, 194:927-29 1962) y hoy es uno de los métodos más usados para la evaluación de la función de las plaquetas. En resumen, el método mide la capacidad de la luz para pasar a través de una suspensión de plaquetas. Esta suspensión de plaquetas pueden ser plasma rico en plaquetas o plaquetas aisladas. Tras la activación, la GPIIb/IIIa cambia su conformación a un estado de alto enlace fibrinógeno y, en presencia de fibrinógeno, las plaquetas comenzarán a formar agregados. Esto se registra como un aumento en la transmisión de luz, ya que más luz atravesará una prueba con pocos agregados grandes que con muchas plaquetas individuales. El efecto inhibidor de un anticuerpo se examina generalmente por la capacidad del anticuerpo para reducir la respuesta agregatoria de plaquetas a un activador (p. ej. ADP o trombina) medida, por ejemplo, por cambio en la transmisión de luz (Coller *et al.* JCI 72(1):325-38, 1983).

55 [0244] El término "plaquetas humanas aisladas", en este ejemplo, se refiere a plaquetas derivadas de la sangre total humana mantenidas en un tampón isotónico. Las plaquetas se aislaron de sangre humana de venas humanas heparinizada de voluntarios sanos que se mezcló con solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD) (6:1 v/v) que contenía 85 mM de Na-citrato, 71 mM de ácido cítrico y 111 mM de glucosa. La sangre se centrifugó a 220g durante 20 minutos para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). Se añadió ácido acetilsalicílico (100 μM) y apirasa 0,5 U/ml para evitar la activación de las plaquetas por eicosanoides y nucleótidos de adenina durante el proceso de preparación. Las plaquetas en el PRP se centrifugaron durante 20 minutos a 480g y el sobrenadante se eliminó. Las plaquetas se suspendieron suavemente en la solución de Hepes libre de calcio (pH 7,4) compuesta de 145 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgSO_4 , 10 mM de glucosa, 10 mM de Hepes y 1 U/ml de apirasa. Las suspensiones de plaquetas se mantuvieron en tubos plásticos a temperatura ambiente y $[\text{Ca}^{2+}]$ se ajustó a 1 mM y la temperatura se ajustó a 37°C en cada experimento.

[0245] Las muestras de plaquetas se mantuvieron en cubetas de vidrio siliconizado con agitación continua (1200 r.p.m.), a 37°C, mientras se medía la transmisión de luz utilizando el instrumento Platelet Aggregation Profiler® (PAP)-8E (Bio/Data Corporation, Horsham, PA). Las muestras se incubaron con F8-500 AP3-LC-HC scFV-Δa3 (SEC ID nº 39) (30 nM), AP3-LC- HC scFV-FLAG (SEC ID nº 21) (30 nM) o abciximab (ReoPro®) (30 nM) durante 3 minutos antes de ser activadas con un péptido activador del receptor-1 activado por proteasa (PAR-1) (secuencia de aminoácidos SFLLRN) (10 μM). Los resultados no muestran ninguna diferencia significativa en la agregación plaquetaria en plaquetas tratadas con AP3-N8 en comparación con el control (Tabla 7). Además, AP3-LC-HC scFV-FLAG se evaluó para propiedades antiagregantes a 30 nM sin mostrar ningún indicio de efecto inhibitor. No obstante, el abciximab antiagregante (ReoPro®) (30 nM) inhibió la agregación plaquetaria eficazmente en casi 40 % en plaquetas activadas SFLLRN (tabla 7). La diferencia entre F8-500 AP3-LC-HC scFV-Δa3 y ReoPro® con respecto a la inhibición de agregación plaquetaria fue incluso más pronunciada cuando aumentó la concentración. La figura 2 muestra la agregación plaquetaria al usar F8-500 AP3-LC-HC scFV-Δa3 (100 nM) o ReoPro® (100 nM). Esta concentración más alta produce una inhibición aumentada con ReoPro® mientras que la concentración aumentada de F8-500 AP3-LC-HC scFV-Δa3 no influye en la agregación plaquetaria.

Tabla 7. Agregación plaquetaria

F8-500 AP3-LC-HC scFV-Δa3 (30 nM)	AP3-LC-HC scFV-FLAG (30 nM)	ReoPro® (30 nM)	Control
86,02±5,8	95,09±3,5	60,72±22,1	100
<i>Datos mostrados como % de control (SFLLRN 10 μM) ±SD y n=3 en todos los grupos.</i>			

20

Ejemplo 45

Preparación y uso de una cepa de ratón con un receptor IgB3 humanizado

[0246] Un vector que contiene el ADNc humano ITGB3 {de exón 2 (G26) a exón 15 (incluyendo 3'UTR parcial de ADNc proporcionado) } se crea genéticamente por inserción del intrón 5 ITGB3 (647 pares de bases) entre las secuencias que corresponden a exones humanos 5 y 6. Una cassette de parada transcripcional se inserta inmediatamente debajo de la 3'UTR humana parcial. El ADNc humano ITGB3 creado genéticamente se inserta a su posición correspondiente en el exón de ratón 1. Para optimizar el procesamiento de la proteína humana ITGB3 en las células de ratón, el alelo humanizado expresará una proteína de fusión entre el péptido señal de ratón Itgb3 (codificado dentro del exón 1) y la proteína madura humana ITGB3. El marcador de selección (Puro) está flanqueado por los sitios F3 e insertado abajo de la 3'UTR humana ITGB3. Alelo humanizado después de la eliminación mediada por FLP del marcador de selección. La proteína humana Itgb3 será expresada bajo el control del promotor de ratón Itgb3. La inserción del ADNc humano ITGB3 creado genéticamente, incluyendo su región 3'UTR, en el exón de ratón 1 debería llevar a la inactivación del gen de ratón Itgb3. La secuencia confirmada del vector dirigido final se muestra en la Figura 3.

35

Generación de células dirigidas heterocigotas C57BL/6 ES

[0247] La línea celular C57BL/6N ES se cultiva en una capa alimentadora inactivada mitóticamente compuesta por fibroblastos embrionarios de ratón en medio alto en glucosa DMEM que contiene 20% de FBS y 1200 u/mL de Factor inhibidor de leucemia. 1×10^7 de células y 30 μg de vector de ADN linealizado se someten a electroporación a 240 V y 500 μF. La selección del clon se basa en la selección de puomicina (1 μg/mL) iniciada en d2 y la contraselección con Gancyclovir (2 μM) iniciado en d5 después de la electroporación. Los clones ES se aíslan en d8 y se analizan por transferencia de Southern después de la expansión.

45

Generación de animales heterocigotos:

[0248] Después de la administración de hormonas, hembras superovuladas Balb/c se aparean con machos Balb/c. Se aíslan los blastocistos del útero en 3,5 dpc. Para la microinyección, los blastocistos se colocan en una gota de DMEM con 15% de FCS bajo aceite mineral. Una pipeta de microinyección piezo-accionada de punta plana con un diámetro interno de 12-15 micrómetros se usa para inyectar 10-15 células dirigidas C57BL/6 N.tac ES en cada blastocisto. Después de la recuperación, 8 blastocistos inyectados se transfieren a cada cuerno uterino de hembras NMRI pseudopreñadas de 2,5 días *post coitum*. El quimerismo se mide en quimeras (G0) por aportación de color de revestimiento de las células ES al huésped Balb/c (negro/blanco). Los ratones altamente quiméricos se crían para las hembras de la cepa C57BL/6. La transmisión de la línea germinal se identificó por la presencia de descendencia (g1) de la cepa C57BL/6, negra.

55

Generación de animales homocigóticos

[0249] La descendencia G1 se propagó bien por cultivo de ratones heterocigotos, bien por fecundación *in vitro*. De los intentos iniciales de apareamiento y FIV, las distribuciones genotípicas se determinaron como se muestra en la tabla 8.

60

Tabla 8. Genotipificación de ratones GPIIb humanizados.

Genotipo	FIV		Apareamiento
	Machos	Hembras	
<i>itgB3 humano</i>			
Homocigoto	ninguno	ninguno	3
Heterocigoto	10	12	7
Tipo salvaje	8	11	4

5

Ejemplo 46

Farmacocinética de proteínas de fusión dirigidas a GPIIIa en los ratones transgénicos GPIIIa

10

[0250] El anticuerpo AP3 se enlaza al receptor de GPIIb/IIIa humana (integrina $\alpha IIb\beta 3$) en las plaquetas, pero no reconoce la GPIIb/IIIa murina, evitando el uso de ratones de tipo salvaje para análisis farmacocinético (PK). El perfil PK de un conjugado o fusión de AP3-FVIII se puede analizar en ratones transgénicos que expresan GPIIIa humana (criados en Taconic M&B), que se asocia con GPIIb murina permitiendo la unión de AP3 al receptor. Los ratones transgénicos de GPIIIa recibirán una única inyección *i.v.* de fusión o conjugado de AP3-FVIII y se recogerá la sangre del plexo periorbital en puntos temporales hasta 288 horas después de la inyección. Se recogerán aproximadamente tres muestras de cada ratón durante el estudio y se recogerán 2-4 muestras en cada punto temporal. La sangre se estabiliza y se diluye en el tampón apropiado. La fusión o conjugado de AP3-FVIII inyectado (libre y/o ligado a placa) se puede cuantificar mediante ELISA o citometría de flujo usando bien anticuerpos contra N8, bien directamente fusión o conjugado AP3-FVIII marcado.

15

20

Ejemplo 47

Duración del efecto de las proteínas de fusión dirigidas a GPIIIa en los ratones transgénicos de GPIIIa

25

[0251] Para evaluar la eficacia y la duración de la acción del efecto de una proteína de fusión dirigida a GPIIIa en un modelo de enfermedad animal, se genera una cepa de ratón con un receptor humanizado IgB3. La cepa de ratón generada se puede cruzar con otras cepas de ratones (transgénicos), esto incluye, pero de forma no limitativa, ratones que carecen del Factor VIII o IX de coagulación. Los ratones se pueden criar por apareamiento natural o usando transferencia FIV (p. ej., G.Vergara Theriogenology 1997; 47, 1245-1252). Alternativamente, las plaquetas humanizadas se pueden transferir a otros ratones por medio de trasplante de médula ósea. Las células de médula ósea se aíslan de los ratones humanizados por ejemplo por el método descrito en Shi *et al.* (Blood. 2008; 112, 2713-2721) y se inyectan en ratones receptores preparados apropiados, es decir, ratones carentes de Factor VIII o IX. La eficacia se puede evaluar en los modelos de animales anteriormente mencionados midiendo la capacidad para reducir el sangrado en una prueba de sangrado de cola (Holmberg *et al.*, J Thromb Haemost 2009; 7: 1517-22) o la capacidad para formar un coágulo en el modelo de lesión FeCl3 (Moller & Tranholm, Haemophilia 2010; 16, e216-e222). La duración de la acción se puede evaluar mediante la eficacia del medicamento después de prolongado en los modelos anteriormente mencionados.

30

35

40 Listado de secuencias

[0252]

45 <110> Novo Nordisk A/S
<120> Entrega dirigida de proteínas de Factor VIII a plaquetas

<130> 8044.504-WO

<160> 42

<170> PatentIn version 3.5

50

<210> 1

<211> 2351

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55

<400>

1

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

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

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
 195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
 210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750
 Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro
 755 760 765
 Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp
 770 775 780
 Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
 785 790 795 800
 Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
 805 810 815
 Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
 820 825 830
 Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
 835 840 845
 Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
 850 855 860
 Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
 865 870 875 880
 Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
 885 890 895
 Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
 900 905 910
 Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
 915 920 925
 Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
 930 935 940
 Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu
 945 950 955 960
 Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu

Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile
 1220 1225 1230
 His Thr Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu
 1235 1240 1245
 Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr
 1250 1255 1260
 Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn
 1265 1270 1275
 Arg Thr Lys Lys His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu
 1280 1285 1290
 Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu
 1295 1300 1305
 Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln
 1310 1315 1320
 Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg
 1325 1330 1335
 Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp
 1340 1345 1350
 Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro
 1355 1360 1365
 Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala
 1370 1375 1380
 Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser
 1385 1390 1395
 Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser
 1400 1405 1410
 Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe
 1415 1420 1425
 Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys
 1430 1435 1440
 Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys
 1445 1450 1455

Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly
 1460 1465 1470
 Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser
 1475 1480 1485
 Val Thr Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp
 1490 1495 1500
 Leu Pro Lys Thr Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His
 1505 1510 1515
 Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser
 1520 1525 1530
 Pro Gly His Leu Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr
 1535 1540 1545
 Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val
 1550 1555 1560
 Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser
 1565 1570 1575
 Lys Leu Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln
 1580 1585 1590
 Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys
 1595 1600 1605
 Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys
 1610 1615 1620
 Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys
 1625 1630 1635
 Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg
 1640 1645 1650
 Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu
 1655 1660 1665
 Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr
 1670 1675 1680
 Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile
 1685 1690 1695

Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys
 1700 1705 1710
 Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr
 1715 1720 1725
 Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser
 1730 1735 1740
 Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
 1745 1750 1755
 Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu
 1760 1765 1770
 His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp
 1775 1780 1785
 Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
 1790 1795 1800
 Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly
 1805 1810 1815
 Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr
 1820 1825 1830
 Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu
 1835 1840 1845
 Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu
 1850 1855 1860
 Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His
 1865 1870 1875
 Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln
 1880 1885 1890
 Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp
 1895 1900 1905
 Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn
 1910 1915 1920
 Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His
 1925 1930 1935
 Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met

1940						1945								1950
Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser
1955						1960					1965			
Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr
1970						1975					1980			
Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr
1985						1990					1995			
Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly
2000						2005					2010			
Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly
2015						2020					2025			
Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro
2030						2035					2040			
Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala
2045						2050					2055			
Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His
2060						2065					2070			
Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser
2075						2080					2085			
Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro	Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile
2090						2095					2100			
Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser
2105						2110					2115			
Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr
2120						2125					2130			
Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu	Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn
2135						2140					2145			
Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn	Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile
2150						2155					2160			
Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg
2165						2170					2175			
Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly	Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys
2180						2185					2190			

Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln
 2195 2200 2205

Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser
 2210 2215 2220

Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp
 2225 2230 2235

Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe
 2240 2245 2250

Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys
 2255 2260 2265

Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser
 2270 2275 2280

Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys
 2285 2290 2295

Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val
 2300 2305 2310

Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His
 2315 2320 2325

Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu
 2330 2335 2340

Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 2345 2350

<210> 2
 <211> 1457
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400>
 2

ES 2 427 627 T3

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

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

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
 50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
 65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
 85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
 100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
 115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
 130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
 145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
 165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
 180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
 195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
 210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met

305					310					315				320	
Asp	Leu	Gly	Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His
				325					330					335	
Asp	Gly	Met	Glu	Ala	Tyr	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro
			340					345					350		
Gln	Leu	Arg	Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp
		355					360					365			
Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser
	370					375					380				
Pro	Ser	Phe	Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr
385					390					395					400
Trp	Val	His	Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro
				405					410					415	
Leu	Val	Leu	Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn
			420					425					430		
Asn	Gly	Pro	Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met
		435					440					445			
Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu
	450					455					460				
Ser	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu
465					470					475					480
Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro
				485					490					495	
His	Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys
			500					505					510		
Gly	Val	Lys	His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe
		515					520					525			
Lys	Tyr	Lys	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp
	530					535					540				
Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg
545					550					555					560
Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu
				565					570					575	

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
755 760 765

Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln
770 775 780

Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu
785 790 795 800

Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe
805 810 815

Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp
820 825 830

Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln
 835 840 845
 Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
 850 855 860
 Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His
 865 870 875 880
 Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile
 885 890 895
 Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
 900 905 910
 Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
 915 920 925
 Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
 930 935 940
 Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp
 945 950 955 960
 Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu
 965 970 975
 Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His
 980 985 990
 Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe
 995 1000 1005
 Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn
 1010 1015 1020
 Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
 1025 1030 1035
 Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
 1040 1045 1050
 Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
 1055 1060 1065
 Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
 1070 1075 1080

Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met
 1085 1090 1095

Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met
 1100 1105 1110

Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly
 1115 1120 1125

Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser
 1130 1135 1140

Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg
 1145 1150 1155

Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
 1160 1165 1170

Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser
 1175 1180 1185

Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro
 1190 1195 1200

Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe
 1205 1210 1215

Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp
 1220 1225 1230

Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu
 1235 1240 1245

Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn
 1250 1255 1260

Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
 1265 1270 1275

Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly
 1280 1285 1290

Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys
 1295 1300 1305

Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn
 1310 1315 1320

Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln

1325						1330									1335
Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	
1340						1345									1350
Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	
1355						1360									1365
Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	
1370						1375									1380
Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	
1385						1390									1395
Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	
1400						1405									1410
Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	
1415						1420									1425
Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	
1430						1435									1440
Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr		
1445						1450									1455

<210> 3
 <211> 1464
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5

<400>
 3

ES 2 427 627 T3

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
 1 5 10 15

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

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
 35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
 50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
 65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
 85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
 100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
 115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
 130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
 145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
 165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
 180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
 195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
 210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp

ES 2 427 627 T3

610						615						620					
Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val		
625					630					635					640		
Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp		
				645					650						655		
Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe		
			660					665					670				
Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr		
		675					680					685					
Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro		
	690					695					700						
Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly		
705					710					715					720		
Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp		
				725					730					735			
Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys		
			740					745						750			
Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro		
		755					760					765					
Ser	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg		
		770				775					780						
Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile		
785					790					795					800		
Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu		
				805					810						815		
Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys	Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile		
			820					825					830				
Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His		
		835					840						845				
Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys		
	850					855					860						
Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr		
865					870					875					880		

Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg
 885 890 895
 Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser
 900 905 910
 Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln
 915 920 925
 Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr
 930 935 940
 Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp
 945 950 955 960
 Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu
 965 970 975
 Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr
 980 985 990
 Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe
 995 1000 1005
 Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe
 1010 1015 1020
 Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln
 1025 1030 1035
 Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile
 1040 1045 1050
 Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln
 1055 1060 1065
 Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu
 1070 1075 1080
 Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg
 1085 1090 1095
 Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly
 1100 1105 1110
 Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp
 1115 1120 1125

Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser
 1130 1135 1140
 Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly
 1145 1150 1155
 Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly
 1160 1165 1170
 Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser
 1175 1180 1185
 Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile
 1190 1195 1200
 Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr
 1205 1210 1215
 Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe
 1220 1225 1230
 Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg
 1235 1240 1245
 Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp
 1250 1255 1260
 Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala
 1265 1270 1275
 Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr
 1280 1285 1290
 Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met
 1295 1300 1305
 Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr
 1310 1315 1320
 Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser
 1325 1330 1335
 Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro
 1340 1345 1350
 Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys
 1355 1360 1365

Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu
 1370 1375 1380

Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln
 1385 1390 1395

Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys
 1400 1405 1410

Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser
 1415 1420 1425

Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln
 1430 1435 1440

Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys
 1445 1450 1455

Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 1460

<210> 4
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5

<400>
 4

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

Lys Arg His Gln Arg
 20

10

<210> 5
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> artificial

15

<220>
 <223> Enlazador del dominio B de FVIII marcado con HIS

<400>
 5

20

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser His His His His His His
 1 5 10 15

Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg
 20 25

<210> 6
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> artificial

25

<220>

ES 2 427 627 T3

<223> Enlazador del dominio B de FVIII marcado con HIS

<400>

6

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser His His His His His His
1 5 10 15

Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg
20 25

5

<210> 7

<211> 44

<212> ADN

<213> artificial

10

<220>

<223> Cebador

<400> 7

15 ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcagca gagt 44

<210> 8

<211> 22

<212> ADN

20 <213> artificial

<220>

<223> Cebador

25

<400> 8

ctaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 9

<211> 36

30 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Cebador

35

<400> 9

gctctagact aacactcatt cctgttgaag ctcttg 36

<210> 10

40 <211> 44

<212> ADN

<213> artificial

<220>

45 <223> Cebador

<400> 10

ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcagca gagt 44

50

<210> 11

<211> 22

<212> ADN

<213> artificial

55

<220>

<223> Cebador

<400> 11

ctaatacgac tcactatagg gc 22

60

ES 2 427 627 T3

<210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 12
 10 acacacgtga de gtctaccaca c 21
 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 13
 gacttttgt atgaattcct caccatgagg tgc 33
 <210> 14
 <211> 28
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 14
 caacacttac ttgtcctggt tctgcag 28
 <210> 15
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 15
 ctgcaggaac caggacaagt aagtgtg 28
 <210> 16
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 50 <400>
 16 **Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr**

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320

Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
 340 345 350

Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
 355 360 365

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 17
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> mus musculus

5

<400>
 17
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Cys Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

10

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190

Arg His Asn Asn Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 18
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> mus musculus

5

<400>
 18

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

5 <210> 19
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Cebador

ES 2 427 627 T3

	<400> 19 caacacttac ttgtcctggt tcctgcag	28
5	<210> 20 <211> 28 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 20 ctgcaggaac caggacaagt aagtgtg	28
15	<210> 21 <211> 256 <212> PRT <213> mus musculus	
20	<400> 21	

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Cys Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 130 135 140
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 145 150 155 160
 Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 165 170 175
 Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Asn Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 180 185 190
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 210 215 220
 Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
 225 230 235 240
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 245 250 255

<210> 22
<211> 256
<212> PRT
<213> mus musculus

5

<400>
22

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Asn Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro
 130 135 140

Ser Val Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser
 145 150 155 160

Ser Arg Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Cys Trp Phe
 165 170 175

Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser
 180 185 190

Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser
 225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 245 250 255

<210> 23
 <211> 256

<212> PRT
<213> mus musculus

5 <400>
23

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 130 135 140
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 145 150 155 160
 Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 165 170 175
 Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Asn Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 180 185 190
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 210 215 220
 Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
 225 230 235 240
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 245 250 255

<210> 24
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 24
 10 cgacgacgac aagtgctgaa agcttcgtac g 31
 <210> 25
 <211> 31
 <212> ADN
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 25
 cgtacgaagc tttcagcact tgcgctgctc g 31
 <210> 26
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 26
 gctgcgacta de gtgaccgtga caaggac 27
 <210> 27
 <211> 27
 35 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 40 <223> Cebador
 <400> 27
 gtcctgtag tgcagctca cggcac 27
 45 <210> 28
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 28
 55 caacacttac ttgcctggt tcctgcag 28
 <210> 29
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <400> 29
 65 ctgcaggaac caggacaagt aagtgtg 28

<210> 30
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> mus musculus

5

<400>

30

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Cys Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 130 135 140

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 145 150 155 160

Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 165 170 175

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Asn Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 180 185 190

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 210 215 220

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
 225 230 235 240

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 245 250 255

Cys

<210> 31
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> mus musculus

5

<400>
 31

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 130 135 140
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 145 150 155 160
 Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 165 170 175
 Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Asn Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 180 185 190
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 210 215 220
 Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
 225 230 235 240
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Cys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 245 250 255

<210> 32
 <211> 30

ES 2 427 627 T3

<212> ADN
<213> artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 32
cagggattgt ggttgaaagc ctgcatatg 30

10 <210> 33
<211> 30
<212> ADN
<213> artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 33
catatgcaag gctttcaacc acaatccctg 30

20 <210> 34
<211> 223
<212> PRT
<213> mus musculus

25 <400>
34

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Asn Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
 115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
 210 215 220

<210> 35

<211> 51

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Cebador

10

ES 2 427 627 T3

<400> 35
aaccaccgg tcttgaaacg ccatcaacgg caggctccagc tgcagcagag c 51

5 <210> 36
<211> 39
<212> ADN
<213> artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 36
gaaagctccg cgggctctgc cgcttgattt ccagcttgg 39

15 <210> 37
<211> 51
<212> ADN
<213> artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 37
aaccaccgg tcttgaaacg ccatcaacgg gacatcgtga tgaccaggc t 51

25 <210> 38
<211> 39
<212> ADN
<213> artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 38
gaaagctccg cgggctctgg ctgctcacgg tcacggagg 39

35 <210> 39
<211> 1656
<212> PRT
<213> artificial

40 <220>
<223> FVIII y proteína de fusión AP3

45 <400>
39
Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
 35 40 45
 Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
 50 55 60
 Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
 65 70 75 80
 Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
 85 90 95
 Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
 100 105 110
 Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
 115 120 125
 Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
 130 135 140
 Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
 145 150 155 160
 His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
 165 170 175
 Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
 180 185 190
 His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
 195 200 205
 His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
 210 215 220
 Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
 225 230 235 240
 Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255
 Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270
 Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
 275 280 285
 Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly

290						295										300
Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His	Asp	Gly	Met	
305					310					315					320	
Glu	Ala	Tyr	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Arg	
				325					330					335		
Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp	Leu	Thr	Asp	
			340					345					350			
Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Phe	
		355					360					365				
Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	Trp	Val	His	
	370					375					380					
Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	Leu	Val	Leu	
385					390					395					400	
Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	Gly	Pro	
				405					410					415		
Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met	Ala	Tyr	Thr	
			420					425					430			
Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	Ser	Gly	Ile	
		435					440					445				
Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile	
	450					455					460					
Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	His	Gly	Ile	
465					470					475					480	
Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	Val	Lys	
				485					490					495		
His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Tyr	Lys	
			500					505					510			
Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	
		515					520					525				
Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala	
	530					535					540					
Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	
545					550					555					560	

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
 660 665 670

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
 705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
 725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn
 740 745 750

Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Asp Ile Val Met Thr Gln Ala
 755 760 765

Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys
 770 775 780

Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Cys
 785 790 795 800

Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg
 805 810 815

Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 820 825 830

Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
 835 840 845

Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe
 850 855 860

Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Ser Gly
 865 870 875 880

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
 885 890 895

Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
 900 905 910

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln
 915 920 925

Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly
 930 935 940

Gly Tyr Asn Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 945 950 955 960

Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
 965 970 975

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr
 980 985 990

Asp Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 995 1000 1005

Ser Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe
 1010 1015 1020

Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser
 1025 1030 1035

Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln
 1040 1045 1050

Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr
 1055 1060 1065

Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu
 1070 1075 1080
 Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr
 1085 1090 1095
 Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu
 1100 1105 1110
 Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys
 1115 1120 1125
 Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
 1130 1135 1140
 Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala
 1145 1150 1155
 Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser
 1160 1165 1170
 Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn
 1175 1180 1185
 Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe
 1190 1195 1200
 Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn
 1205 1210 1215
 Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp
 1220 1225 1230
 Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr
 1235 1240 1245
 Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg
 1250 1255 1260
 Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His
 1265 1270 1275
 Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu
 1280 1285 1290
 Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu
 1295 1300 1305
 Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu

1310						1315						1320		
Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Phe
1325						1330					1335			
Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser
1340						1345					1350			
Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly
1355						1360					1365			
Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile
1370						1375					1380			
Asn	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val	Asp
1385						1390					1395			
Leu	Leu	Ala	Pro	Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile	Lys	Thr	Gln	Gly	Ala
1400						1405					1410			
Arg	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met
1415						1420					1425			
Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser
1430						1435					1440			
Thr	Gly	Thr	Leu	Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Gly
1445						1450					1455			
Ile	Lys	His	Asn	Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile
1460						1465					1470			
Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Leu	Arg	Met
1475						1480					1485			
Glu	Leu	Met	Gly	Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu	Gly
1490						1495					1500			
Met	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser
1505						1510					1515			
Tyr	Phe	Thr	Asn	Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Arg
1520						1525					1530			
Leu	His	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val	Asn
1535						1540					1545			
Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met	Lys
1550						1555					1560			

Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser
 1565 1570 1575

Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His
 1580 1585 1590

Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln
 1595 1600 1605

Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro
 1610 1615 1620

Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val
 1625 1630 1635

His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln
 1640 1645 1650

Asp Leu Tyr
 1655

<210> 40

<211> 1656

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> FVIII y proteína de fusión AP3

<400>

40

ES 2 427 627 T3

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
 1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
 20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
 35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
 50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
 65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
 85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala

ES 2 427 627 T3

	100							105								110
Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val	115							120					125			
Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn	130							135					140			
Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser	145							150					155			160
His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu								165								175
Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu								180								190
His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp								195								205
His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser								210								220
Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg								225								240
Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His								245								255
Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu								260								270
Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile								275								285
Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly								290								300
Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met								305								320
Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg								325								335
Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp								340								350
Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe								355								365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
 370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
 385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
 405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
 420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640
 Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655
 Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
 660 665 670
 Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685
 Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700
 Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
 705 710 715 720
 Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
 725 730 735
 Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn
 740 745 750
 Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
 755 760 765
 Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
 770 775 780
 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln
 785 790 795 800
 Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly
 805 810 815
 Gly Tyr Asn Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 820 825 830
 Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
 835 840 845
 Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr
 850 855 860
 Asp Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 865 870 875 880

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 885 890 895
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 900 905 910
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser
 915 920 925
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Cys Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 930 935 940
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 945 950 955 960
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 965 970 975
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 980 985 990
 Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 995 1000 1005
 Arg Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe
 1010 1015 1020
 Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser
 1025 1030 1035
 Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln
 1040 1045 1050
 Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr
 1055 1060 1065
 Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu
 1070 1075 1080
 Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr
 1085 1090 1095
 Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu
 1100 1105 1110
 Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys
 1115 1120 1125
 Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val

1130						1135								1140
Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Lys	Ala
1145						1150					1155			
Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	His	Ser
1160						1165					1170			
Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu	Asn
1175						1180					1185			
Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu	Phe
1190						1195					1200			
Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn
1205						1210					1215			
Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu	Asp
1220						1225					1230			
Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr
1235						1240					1245			
Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg
1250						1255					1260			
Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile	His
1265						1270					1275			
Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys	Glu
1280						1285					1290			
Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe	Glu
1295						1300					1305			
Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val	Glu
1310						1315					1320			
Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Phe
1325						1330					1335			
Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser
1340						1345					1350			
Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly
1355						1360					1365			
Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile
1370						1375					1380			

Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp
 1385 1390 1395
 Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala
 1400 1405 1410
 Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met
 1415 1420 1425
 Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser
 1430 1435 1440
 Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly
 1445 1450 1455
 Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile
 1460 1465 1470
 Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met
 1475 1480 1485
 Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly
 1490 1495 1500
 Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser
 1505 1510 1515
 Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg
 1520 1525 1530
 Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn
 1535 1540 1545
 Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys
 1550 1555 1560
 Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser
 1565 1570 1575
 Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His
 1580 1585 1590
 Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln
 1595 1600 1605
 Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro
 1610 1615 1620

Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val
1625 1630 1635

His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln
1640 1645 1650

Asp Leu Tyr
1655

<210> 41

<211> 1694

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> FVIII y proteína de fusión AP3

<400>

41

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
 1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
 20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
 35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
 50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
 65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
 85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
 100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
 115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
 130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
 145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
 165 170 175

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

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445
 Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460
 Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480
 Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495
 His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510
 Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525
 Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540
 Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560
 Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575
 Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590
 Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605
 Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620
 Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640
 Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655
 Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
 660 665 670
 Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
 705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
 725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Val
 740 745 750

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val
 755 760 765

Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Leu
 770 775 780

Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp
 785 790 795 800

Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Asn Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys Gly
 805 810 815

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
 820 825 830

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
 835 840 845

Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 850 855 860

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 865 870 875 880

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val
 885 890 895

Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg
 900 905 910

Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Cys Trp Phe Leu Gln
 915 920 925

Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu
 930 935 940

Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala

ES 2 427 627 T3

945		950		955		960
Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr		965		970		975
Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr		980		985		990
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His		995		1000		1005
Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu		1010		1015		1020
Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp		1025		1030		1035
Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe		1040		1045		1050
Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu		1055		1060		1065
Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg		1070		1075		1080
Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln		1085		1090		1095
Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu		1100		1105		1110
Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu		1115		1120		1125
Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg		1130		1135		1140
Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln		1145		1150		1155
Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu		1160		1165		1170
Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr		1175		1180		1185
Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val		1190		1195		1200

Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu
 1205 1210 1215
 Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val
 1220 1225 1230
 Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr
 1235 1240 1245
 Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala
 1250 1255 1260
 Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr
 1265 1270 1275
 Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly
 1280 1285 1290
 Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser
 1295 1300 1305
 Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His
 1310 1315 1320
 Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr
 1325 1330 1335
 Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser
 1340 1345 1350
 Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu
 1355 1360 1365
 His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys
 1370 1375 1380
 Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln
 1385 1390 1395
 Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala
 1400 1405 1410
 Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu
 1415 1420 1425
 Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile
 1430 1435 1440

His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu
 1445 1450 1455
 Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys
 1460 1465 1470
 Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe
 1475 1480 1485
 Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn
 1490 1495 1500
 Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr
 1505 1510 1515
 Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu
 1520 1525 1530
 Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser
 1535 1540 1545
 Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala
 1550 1555 1560
 Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser
 1565 1570 1575
 Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln
 1580 1585 1590
 Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln
 1595 1600 1605
 Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu
 1610 1615 1620
 Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln
 1625 1630 1635
 Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr
 1640 1645 1650
 Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu
 1655 1660 1665
 Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met
 1670 1675 1680
 Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 1685 1690

<210> 42

<211> 1694

<212> PRT

<213> artificial

5

<220>

<223> FVIII y proteína de fusión AP3

<400>

10

42

ES 2 427 627 T3

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
 1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
 20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
 35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
 50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
 65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
 85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
 100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
 115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
 130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
 145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
 165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
 180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
 195 200 205

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

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480
 Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495
 His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510
 Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525
 Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540
 Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560
 Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575
 Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590
 Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605
 Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620
 Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640
 Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655
 Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
 660 665 670
 Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685
 Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700
 Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
 705 710 715 720
 Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala

				725						730						735
Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro	Ser	Asp	Ile	
			740					745					750			
Val	Met	Thr	Gln	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Ser	
		755					760					765				
Val	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Arg	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	
	770					775					780					
Asn	Thr	Tyr	Leu	Cys	Trp	Phe	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	
785					790					795					800	
Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	
				805					810					815		
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile	Ser	Arg	
		820						825					830			
Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His	Leu	Glu	
		835					840					845				
Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	
	850					855					860					
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	
865				870						875					880	
Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Thr	Ser	Val	
				885					890					895		
Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Trp	Leu	
			900					905					910			
Gly	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	His	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Asp	
		915					920					925				
Ile	Tyr	Pro	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asn	Lys	Tyr	Asn	Glu	Asn	Phe	Lys	Gly	
	930					935					940					
Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	
945					950					955					960	
Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	
				965					970					975		
Glu	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			980					985					990			

Ser Val Thr Val Ser Ser Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His
 995 1000 1005

Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu
 1010 1015 1020

Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp
 1025 1030 1035

Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe
 1040 1045 1050

Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu
 1055 1060 1065

Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg
 1070 1075 1080

Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln
 1085 1090 1095

Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu
 1100 1105 1110

Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu
 1115 1120 1125

Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg
 1130 1135 1140

Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln
 1145 1150 1155

Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu
 1160 1165 1170

Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr
 1175 1180 1185

Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val
 1190 1195 1200

Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu
 1205 1210 1215

Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val
 1220 1225 1230

Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr
 1235 1240 1245
 Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala
 1250 1255 1260
 Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr
 1265 1270 1275
 Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly
 1280 1285 1290
 Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser
 1295 1300 1305
 Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His
 1310 1315 1320
 Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr
 1325 1330 1335
 Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser
 1340 1345 1350
 Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu
 1355 1360 1365
 His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys
 1370 1375 1380
 Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln
 1385 1390 1395
 Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala
 1400 1405 1410
 Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu
 1415 1420 1425
 Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile
 1430 1435 1440
 His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu
 1445 1450 1455
 Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys
 1460 1465 1470

Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe
 1475 1480 1485

Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn
 1490 1495 1500

Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr
 1505 1510 1515

Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu
 1520 1525 1530

Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser
 1535 1540 1545

Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala
 1550 1555 1560

Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser
 1565 1570 1575

Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln
 1580 1585 1590

Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln
 1595 1600 1605

Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu
 1610 1615 1620

Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln
 1625 1630 1635

Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr
 1640 1645 1650

Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu
 1655 1660 1665

Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met
 1670 1675 1680

Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 1685 1690

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de FVIII que incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a la parte madura de una secuencia de aminoácidos seleccionada de la lista que consiste en SEC ID n°: 1 y SEC ID n°: 3, esta molécula está fijada de manera covalente a una molécula específica de las plaquetas, donde dicha molécula específica de las plaquetas es un anticuerpo GPIIb/IIIa que no inhibe la agregación plaquetaria.
2. Molécula de FVIII según la reivindicación 1, donde dicha molécula tiene una capacidad reducida de enlace al vWF.
- 10 3. Molécula de FVIII según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la molécula es una proteína de fusión.
4. Molécula de FVIII según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el anticuerpo GPIIb/IIIa que no inhibe la agregación plaquetaria está fijado de manera covalente al FVIII vía un enlazador.
- 15 5. Molécula de FVIII según la reivindicación 4, donde el enlazador comprende un glicano N-enlazado o un glicano O-enlazado sobre la molécula de FVIII.
6. Molécula de FVIII según la reivindicación 5, donde el glicano está colocado en el dominio B.
- 20 7. Molécula de FVIII según la reivindicación 3, donde el anticuerpo GPIIb/IIIa que no inhibe la agregación plaquetaria está fusionado al dominio B de una molécula de Factor VIII con el dominio B truncado.
8. Molécula de FVIII según la reivindicación 3, donde el dominio a3 de la molécula de FVIII está sustituido por el anticuerpo GPIIb/IIIa que no inhibe la agregación plaquetaria.
- 25 9. Molécula de FVIII según la reivindicación 6, donde la molécula de FVIII comprende la secuencia tal y como se presenta en SEC ID n° 3, y donde el enlazador comprende un glicano O-enlazado colocado en el dominio B.
- 30 10. Ácido nucleico que codifica una molécula de FVIII según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.
11. Célula huésped que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 10.
12. Método para producir una molécula de FVIII, dicho método comprende la expresión del ácido nucleico según la reivindicación 10 en una célula huésped según la reivindicación 11.
- 35 13. Método para producir una molécula de FVIII según cualquiera de las reivindicaciones 4, 5, 6 y 9, donde dicho método comprende la conjugación de la molécula de FVIII con el anticuerpo GPIIb/IIIa que no inhibe la agregación plaquetaria.
- 40 14. Composición farmacéutica que comprende una molécula de FVIII según cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
15. Molécula de FVIII según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un método para el tratamiento de la hemofilia A.

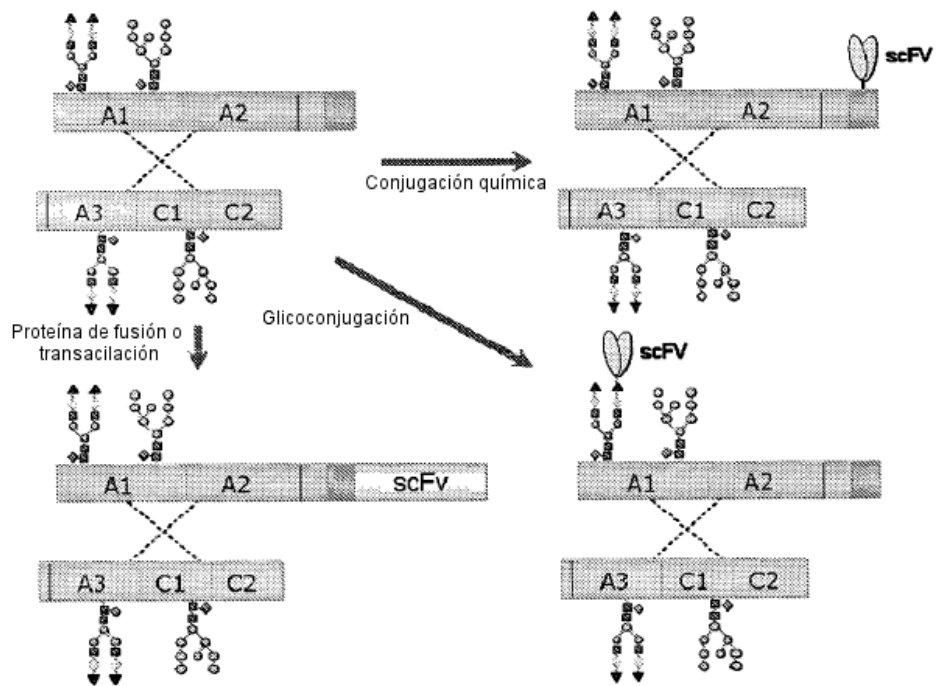


Fig. 1

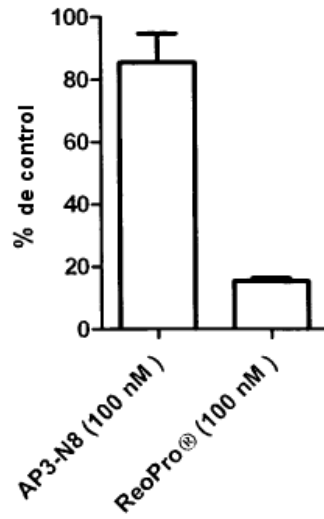


Fig. 2.

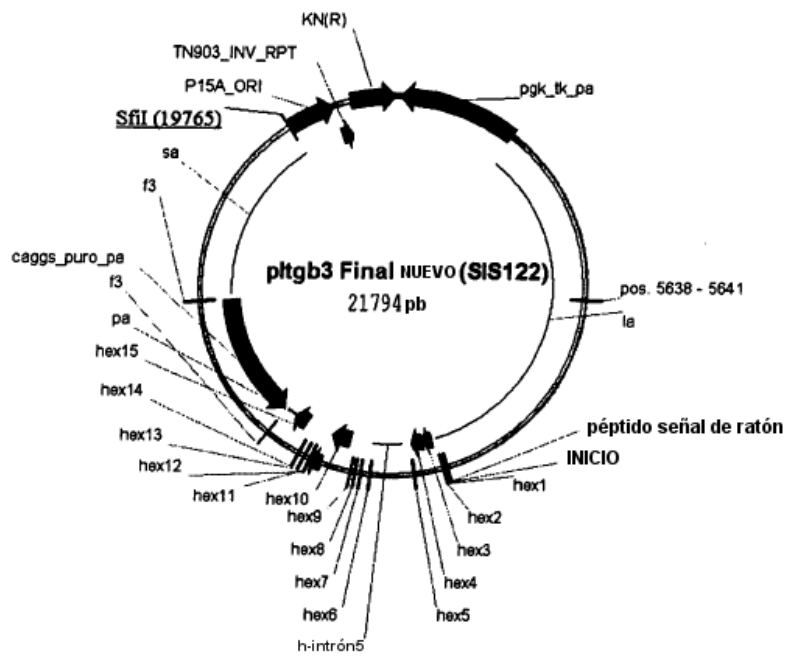


Fig. 3

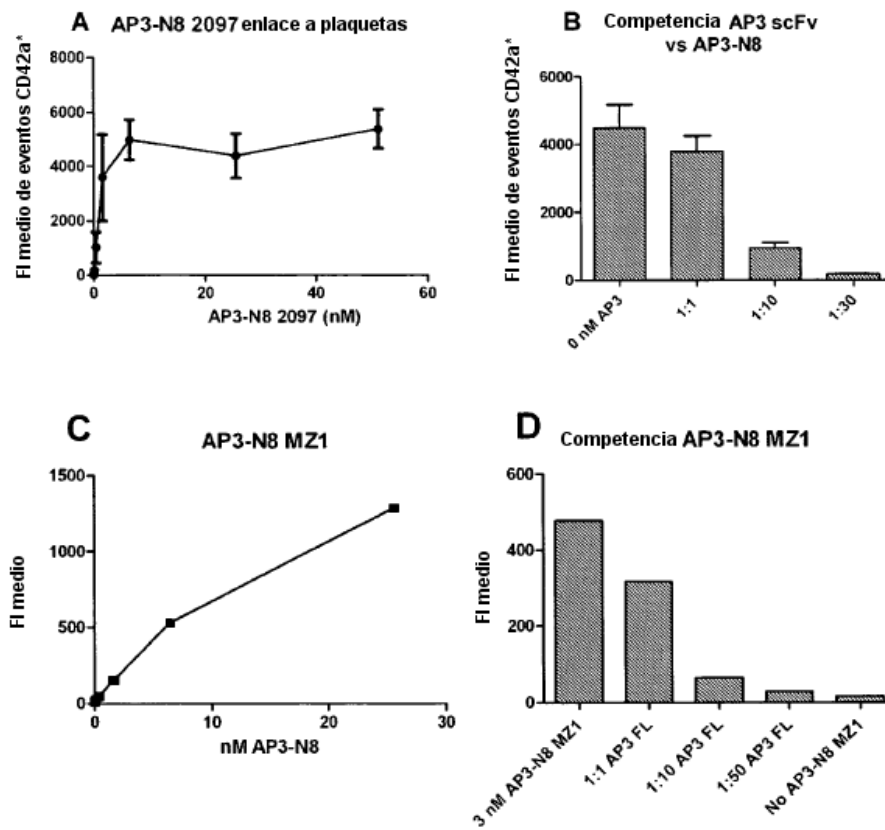


Fig. 4