

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 996**

51 Int. Cl.:

A61K 38/37 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)
C07K 14/76 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2007 PCT/EP2007/011356**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2008 WO08077616**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007 E 07857067 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2097096**

54 Título: **Factores de coagulación modificados con vida media in vivo prolongada**

30 Prioridad:

22.12.2006 EP 06026747
09.01.2007 US 879334 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.10.2017

73 Titular/es:

CSL BEHRING GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE

72 Inventor/es:

SCHULTE, STEFAN;
WEIMER, THOMAS y
METZNER, HUBERT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 637 996 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

Factores de coagulación modificados con vida media in vivo prolongada.

5 **Campo de la invención:**

La presente invención se refiere a un factor de coagulación FVIII modificado que tiene en una región interna entre el aminoácido N-terminal y el aminoácido C-terminal del polipéptido de traducción primario del factor de la coagulación FVIII una inserción de un polipéptido aumentador de la vida media (HLEP). La presente invención se refiere además a
10 secuencias de ácido nucleico que codifican dicho Factor VIII de la coagulación y sus derivados, vectores de expresión recombinantes que contienen tales secuencias de ácido nucleico, células hospedadoras transformadas con tales vectores de expresión recombinantes, polipéptidos recombinantes y derivados codificados por dichas secuencias de ácido nucleico, polipéptidos y derivados recombinantes que tienen de hecho actividades biológicas junto con vida media in vivo prolongada y/o recuperación in vivo mejorada comparados con la proteína tipo salvaje no modificado. La invención se
15 refiere también a secuencias correspondientes que dan como resultado mayor estabilidad in vitro. La presente invención se refiere adicionalmente a procesos para la fabricación de tales proteínas recombinantes y sus derivados. La invención se refiere también a un vector de transferencia para uso en terapia génica humana, que comprende tales secuencias de ácido nucleico modificadas.

20 **Antecedentes de la invención:**

Existen diversos trastornos hemorrágicos causados por deficiencias de factores de coagulación de la sangre. Los trastornos más comunes son las hemofilias A y B, que son resultado de deficiencias en los factores VIII y IX de coagulación de la sangre, respectivamente. Otro conocido trastorno hemorrágico es la enfermedad de von Willebrand.

25 La hemofilia clásica o hemofilia A es un trastorno hemorrágico hereditario. La misma es resultado de una deficiencia del Factor VIII de la coagulación sanguínea ligada al cromosoma X, y afecta casi exclusivamente a los varones con una incidencia de entre uno y dos individuos por 10.000. El defecto del cromosoma X es transmitido por hembras portadoras que no son ellas mismas hemofílicas. La manifestación clínica de la hemofilia A es una tendencia aumentada a las
30 hemorragias. Antes de la introducción del tratamiento con concentrados de Factor VIII, la duración media de vida de un individuo con hemofilia grave era inferior a 20 años. El uso de concentrados de Factor VIII a partir del plasma ha mejorado considerablemente la situación para los pacientes de hemofilia A, aumentando notablemente la duración media de su vida y dando a la mayoría de ellos la posibilidad de tener una vida más o menos normal. Sin embargo, han surgido ciertos problemas con los concentrados derivados de plasma y su uso, el más grave de los cuales ha sido la transmisión de virus.
35 Hasta ahora, los virus causantes de hepatitis B, hepatitis no-A no-B y SIDA han afectado seriamente a la población. Desde entonces, se han desarrollado recientemente métodos diferentes de desactivación de virus y nuevos concentrados de Factor VIII altamente purificados, que han establecido un estándar de seguridad muy alto también para Factor VIII derivado del plasma.

40 La clonación del cDNA para Factor VIII (Wood et al., 1984. Nature 312:330-336; Vehar et al. 1984. Nature 312:337-342) hizo posible expresar Factor VIII por vía recombinante, conduciendo al desarrollo de diversos productos recombinantes de Factor VIII, que fueron aprobados por las autoridades reguladoras entre 1992 y 2003. El hecho de que el dominio B central de la cadena polipeptídica del Factor VIII que reside entre los aminoácidos Arg-740 y Glu-1649 no parece ser necesario para la actividad biológica plena ha conducido también al desarrollo de un Factor VIII delecionado del dominio
45 B.

La molécula de Factor VIII madura está constituida por 2332 aminoácidos que pueden agruparse en tres dominios A homólogos, dos dominios C homólogos y un Dominio B que están dispuestos en el orden: A1-A2-B-A3-C1-C2. La
50 secuencia completa de aminoácidos del Factor VIII humano maduro se muestra en SEQ ID NO: 2. Durante su secreción en el plasma, el Factor VIII es procesado intracelularmente en una serie de heterodímeros enlazados a iones metálicos a medida que el Factor VIII se escinde en el límite B-A3 y en sitios diferentes dentro del dominio B. Este proceso conduce a moléculas heterogéneas de cadena pesada constituidas por los dominios A1 y A2 y diversas partes del dominio B que tienen un tamaño molecular que va desde 90 kDa a 200 kDa. Las cadenas pesadas están unidas por un ion metálico a las cadenas ligeras, que están constituidas por los dominios A3, C1 y C2 (Saenko et al., 2002. Vox Sang. 83:89-96). En
55 el plasma, este Factor VIII heterodímero se une con afinidad alta al Factor von Willebrand (vWF), que protege a aquél contra el catabolismo prematuro. La vida media del Factor VIII desactivado unido al vWF es aproximadamente 12 horas en plasma.

El Factor VIII de la coagulación se activa mediante escisión proteolítica por FXa y trombina en los aminoácidos Arg372 y Arg740 dentro de la cadena pesada y Arg1689 en la cadena ligera, dando como resultado la liberación de Factor von Willebrand y generando el Factor VIII heterotrímero activado, que formará el complejo tenasa en las superficies de
60 fosfolípidos con FIXa y FX siempre que esté presente Ca^{2+} . El heterotrímero está constituido por el dominio A1, un fragmento de 50 kDa, el dominio A2, un fragmento de 43 kDa y la cadena ligera (A3-C1-C2), un fragmento de 73 kDa. Por tanto, la forma activa del Factor VIII (Factor VIIIa) está constituida por una subunidad A1 asociada a través del enlace de

ion metálico divalente a una cadena ligera A3-C1-C2 escindida por trombina y una subunidad A2 libre asociada de modo relativamente débil con los dominios A1 y A3.

Para evitar una coagulación excesiva, el Factor VIIIa tiene que desactivarse poco después de la activación. La desactivación del Factor VIIIa por la vía de la proteína C activada (APC) por escisión en Arg336 y Arg562 no se considera como el paso principal de limitación de la velocidad. Es más bien la disociación de la subunidad A2 del heterotrímero unido no covalentemente lo que se cree es el paso limitante de la velocidad en la desactivación del Factor VIIIa después de la activación por trombina (Fay et al., 1991. J Biol Chem 266 8957, Fay & Smudzin 1992. J Biol Chem 267:13246-50). Este es un proceso rápido, que explica la corta vida media del Factor VIIIa en plasma, que es sólo 2,1 minutos (Saenko et al., 2002. Vox Sang. 83:89-96).

En los pacientes de hemofilia A grave sometidos a tratamiento profiláctico, el Factor VIII tiene que administrarse por vía intravenosa (i.v.) aproximadamente 3 veces por semana debido a la corta vida media en plasma del Factor VIII, de aproximadamente 12 horas. Cada administración i.v. es molesta, va asociada a dolor y conlleva riesgo de infección, debido especialmente a que la misma se realiza en el domicilio por los propios pacientes o por los padres de los niños diagnosticados de hemofilia A.

Por tanto, sería muy deseable crear un Factor VIII con vida media funcional aumentada que permitiera la fabricación de composiciones farmacéuticas que contengan Factor VIII, que tengan que administrarse menos frecuentemente.

Se han hecho varias tentativas para prolongar la vida media del Factor VIII desactivado, ya sea por reducción de su interacción con receptores celulares (WO 03/093313A2, WO 02/060951A2), por unión covalente de polímeros al Factor VIII (WO 94/15625, WO 97/11957 y US 4970300) o por encapsulación del Factor VIII (WO 99/55306).

En WO 97/03193 se especulaba que la introducción de nuevos sitios de unión de metales podría estabilizar el Factor VIII y en particular mutantes en los cuales se encuentren His o Met en sustitución de cualquiera de Phe652, Tyr1786, Lys1818, Asp1840 y/o Asn1864. Sin embargo, no se proporcionaba ninguna explicación racional acerca del modo de determinar el éxito que implicaría la estabilización resultante de tales modificaciones ni una explicación racional de por qué se habían elegido los aminoácidos propuestos. Este enfoque sigue siendo especulativo, dado que no se ha publicado desde entonces ninguna prueba adicional.

Otro enfoque se ha basado en la creación de un Factor VIIIa, que es resistente a la desactivación por unión covalente en primer lugar del dominio A2 al dominio A3 y en segundo lugar por mutación de los sitios de escisión de la APC (Pipe & Kaufman. 1997. PNAS 94:11851-11856, WO 97/40145 y WO 03/087355.). El constructo genético subyacente se utilizó también para producir animales transgénicos como se describe en WO 02/072023A2. La variante presente exhibía todavía 38% de su actividad pico 4h después de la activación por la trombina, pero carece del dominio de unión a vWF, dado que por la fusión del dominio A2 al A3 se delecionó este dominio particular. Dado que la unión a vWF prolonga significativamente la vida media del FVIII in vivo, debe esperarse que la vida media de la forma desactivada de la variante de FVIII presente se vea comprometida. Los propios inventores reconocieron esto y trataron de resolver el problema por adición de un anticuerpo que establezca la cadena ligera en una conformación que conserva cierta afinidad para vWF.

Gale et al. 2002 (Protein Science 11:2091-2101) publicaron la estabilización de FVa por unión covalente del dominio A3 al dominio A2. Dichos autores identificaron dos aminoácidos vecinos conforme a predicciones estructurales, localizados uno en el dominio A2 y el otro en el dominio A3, y reemplazaron estos dos aminoácidos con residuos cisteína, que formaban un puente disulfuro durante la exportación al retículo endoplasmático. Se utilizó el mismo método para unir covalentemente mediante puentes disulfuro el dominio A2 al A3 del Factor VIII (WO 02/103024A2). Tales mutantes de Factor VIII con dominios A3 y A2 unidos covalentemente, estabilizando así FVIIIa, retenían cerca del 90% de su actividad máxima inicial durante 40 minutos después de la activación, mientras que la actividad del Factor VIII tipo salvaje disminuía rápidamente al 10% de su actividad máxima inicial. Los mutantes de Factor VIII retenían el 90% de su actividad durante 3 h adicionales sin pérdida ulterior alguna de actividad (Gale et al., 2003. J Thromb. Haemost. 1:1966-1971).

WO2006/108590 revela diversos mutantes de FVIII estabilizados caracterizados por la inserción de diferentes enlazadores peptídicos que reemplazan el sitio de activación de trombina en Arg372 y estabilizan también la forma activada del Factor VIII. El nivel de actividad de FVIII aumentaba concomitantemente con la longitud del enlazador, alcanzando un máximo cuando se insertaban 99 aminoácidos (L99). Utilizando un método de ensayo cromógeno, la actividad de FVIII detectada con FVIII L99 era similar a la de FVIII tipo salvaje. El FVIII L99 activado era prácticamente estable durante más de 1 hora.

Dado que ninguno de los enfoques descritos anteriormente ha dado lugar todavía a una molécula FVIII mejorada aplicable en pacientes, hay una necesidad creciente de desarrollar moléculas del Factor VIII de la coagulación modificadas que exhiban una vida media prolongada.

Teniendo en cuenta un riesgo trombogénico potencial, es más deseable prolongar la vida media de la forma desactivada de FVIII que la de FVIIIa.

Otro problema encontrado generalmente con la producción de FVIII recombinante es el bajo rendimiento. Se han intentado diversos métodos conocidos por el experto en la técnica, pero no han resuelto el problema del bajo rendimiento.

Descripción de la invención

- 5 Es un objetivo de esta invención proporcionar moléculas del FVIII de la coagulación de la sangre con vida media aumentada in vivo.
- 10 Es otro objetivo de esta invención proporcionar moléculas del FVIII de la coagulación de la sangre con recuperación in vivo aumentada.
- Otro objetivo de la invención es que estas moléculas del FVIII de la coagulación de la sangre modificadas puedan ser expresadas por células de mamífero y retengan su actividad biológica en las proteínas modificadas expresadas.
- 15 Otro objetivo de la invención es proporcionar un rendimiento mejorado por aumento de la expresión y/o aumento de la estabilidad de las moléculas de FVIII de la coagulación en cultivo de células de mamífero.
- Otro objetivo adicional de la invención es proporcionar moléculas de FVIII con mayor estabilidad en cultivo de células de mamífero en medios de cultivo exentos de suero y/o de proteínas animales, especialmente en ausencia de vWF.
- 20 Conforme a un primer aspecto, la presente invención se refiere a un Factor VIII de la coagulación modificado que tiene en una región interna entre el aminoácido N-terminal y el aminoácido C-terminal del polipéptido de traducción primario de dicho factor de coagulación una inserción de un polipéptido aumentador de la vida media (HLEP) como se define en la reivindicación 1.
- 25 Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que la inserción de polipéptidos heterólogos tales como albúmina en la molécula de FVIII, preferiblemente tales que los mismos reemplazan el dominio B de FVIII casi totalmente o en parte, no sólo permite la expresión y secreción de proteínas quiméricas de FVIII a partir de células de mamífero, sino que da también como resultado moléculas de FVIII modificadas que conservan actividad importante de FVIII. Además, tales moléculas de FVIII modificadas exhiben vida media in vivo prolongada y/o recuperación in vivo mejorada.
- 30 Un beneficio potencial adicional de dichas realizaciones de la presente invención en las cuales el dominio A2 del factor de la coagulación FVIII sigue estando unido no covalentemente al dominio A3 después de la activación, es que sólo se aumenta la vida media de la forma desactivada de FVIII, mientras que la vida media de la forma activada de FVIII sigue siendo esencialmente la misma, lo que podría dar como resultado en una disminución del riesgo de trombogenicidad.
- 35 Se ha encontrado además que las moléculas FVIII de la invención son más estables que el FVIII tipo salvaje en cultivo de células de mamífero, especialmente en ausencia del factor estabilizador von Willebrand (vWF) en medios de cultivo exentos de suero y/o proteínas animales.
- 40 Tales moléculas pueden generarse por inserción de un resto de proteína aumentadora de la vida media (HLEP) en la secuencia de aminoácidos de la molécula del factor FVIII de coagulación de la sangre. El HLEP se inserta en y/o reemplaza el dominio B de FVIII o parte del mismo.
- 45 Las HLEPs en el sentido de la presente invención se seleccionan de un grupo constituido por miembros de la familia de las albúminas, que incluye albúmina, afamina, alfa-fetoproteína y la proteína de unión de la vitamina D, así como porciones de una región constante de inmunoglobulina. El HLEP más preferida es albúmina humana.
- 50 En la técnica anterior se han descrito fusiones de factores de coagulación a albúmina (WO 01/79271), alfa-fetoproteína (WO 2005/024044) e inmunoglobulina (WO 2004/101740) como polipéptidos aumentadores de la vida media. Se creía que éstos se fijan a los términos carboxi o amino o a ambos términos del resto de la proteína terapéutica respectiva, unidos ocasionalmente por enlazadores peptídicos, preferiblemente por enlazadores constituidos por glicina y serina.
- 55 Ballance et al (WO 01/79271) describieron polipéptidos de fusión N- o C-terminal de una multitud de diferentes polipéptidos terapéuticos unidos a seroalbúmina humana. Se han descrito largas listas de parejas de fusión potenciales sin revelar datos experimentales para prácticamente ninguno de estos polipéptidos, tanto si las proteínas de fusión de albúmina respectivas retienen realmente actividad biológica y tienen propiedades mejoradas como si no lo hacen. Entre dicha lista de polipéptidos terapéuticos se menciona también el Factor VIII.
- 60 Contrariamente a las proteínas de fusión de la técnica anterior, la secuencia de aminoácidos heteróloga en el factor de coagulación modificado de esta invención no está fusionada al propio término N o al término C del factor de coagulación, sino que está insertada dentro de una región interna de la secuencia de aminoácidos del factor de coagulación. Sorprendentemente, la inserción de incluso grandes polipéptidos no daba como resultado una pérdida completa de

actividad biológica del factor de coagulación. En lugar de ello, el factor de coagulación así modificado tenía actividad biológica, vida media funcional in vivo y recuperación in vivo aumentadas y mayor estabilidad.

5 La presente invención se refiere por tanto a un Factor VIII de la coagulación modificado que tiene en una región interna del factor de la coagulación una inserción de un polipéptido aumentador de la vida media (HLEP) como se ha definido anteriormente, caracterizado por que el Factor VIII de la coagulación modificado tiene una vida media funcional prolongada comparada con la vida media funcional del factor de la coagulación que carece de dicha inserción, y/o comparada con la vida media funcional del factor de la coagulación tipo salvaje.

10 La presente invención se refiere también a la inserción de más de un HLEP donde el HLEP, que se inserta varias veces, puede ser el mismo HLEP o puede ser una combinación de diferentes HLEPs. También están abarcadas por la invención combinaciones de inserciones de uno o más HLEPs en una región interna del factor de la coagulación con fusiones N-y/o C-terminales adicionales de uno o más HLEPs, que podrían ser el mismo HLEP o una combinación de diferentes HLEPs.

15 La presente invención se refiere también a un factor de coagulación modificado que tiene, en una región interna del factor de la coagulación una inserción de un polipéptido aumentador de la vida media (HLEP), caracterizado por que el factor de coagulación modificado tiene una recuperación in vivo mejorada comparada con la recuperación in vivo del factor de la coagulación que carece de dicha inserción, y/o comparada con la recuperación in vivo del factor de la coagulación tipo salvaje.

20 En otro aspecto de la invención, el factor de coagulación modificado tiene mayor estabilidad en medios de cultivo exentos de suero, comparada con la del factor de la coagulación que carece de dicha inserción, y/o comparada con la estabilidad del factor de la coagulación tipo salvaje. En otro aspecto de la invención, el factor de coagulación modificado tiene estabilidad aumentada en medios de cultivo exentos de proteínas animales, comparada con la del factor de la coagulación que carece de dicha inserción, y/o comparada con la estabilidad del factor de la coagulación tipo salvaje. La mayor estabilidad en medios de cultivo exentos de suero y/o exentos de animales es especialmente acusada si están ausentes cantidades estabilizadoras de vWF.

30 Los medios exentos de proteínas animales en el sentido de la invención son medios exentos de proteínas o fragmentos de proteínas derivadas de animales.

Otro aspecto de la invención son polinucleótidos o conjuntos de polinucleótidos que codifican el factor de coagulación modificado de la invención.

35 La invención se refiere además a plásmidos o vectores que comprenden un polinucleótido descrito en esta memoria, a células hospedadoras que comprenden un polinucleótido o un plásmido o vector descrito en esta memoria.

Otro aspecto de la invención es un método de producción de un factor de coagulación modificado, que comprende:
40 (a) cultivar las células hospedadoras de la invención en condiciones tales que se expresa el factor de coagulación modificado; y
(b) opcionalmente, recuperar el factor de coagulación modificado de las células hospedadoras o del medio de cultivo.

45 La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden un factor de coagulación modificado, un polinucleótido, o un plásmido o vector descrito en esta memoria.

Otro aspecto adicional de la invención es el uso de un factor de coagulación modificado, un polinucleótido, o un plásmido o vector, o una célula hospedadora de acuerdo con esta invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno de la coagulación de la sangre.

50

Descripción detallada de la invención

55 La invención se refiere a un Factor VIII de la coagulación modificado que comprende, en una región interna entre el aminoácido N-terminal y el aminoácido C-terminal del polipéptido de traducción primario del factor de la coagulación una inserción de un polipéptido aumentador de la vida media (HLEP) conforme a la reivindicación 1, caracterizado por que el factor de coagulación modificado tiene preferiblemente una vida media funcional prolongada comparada con la vida media funcional del factor de la coagulación que carece de dicha inserción, y/o comparada con la vida media funcional del factor de la coagulación tipo salvaje.

60

La "vida media funcional" conforme a la presente invención es la vida media de la función biológica del factor de la coagulación, una vez que el mismo ha sido administrado a un mamífero, y puede medirse in vitro en muestras de sangre extraídas a diferentes intervalos de tiempo de dicho mamífero después que se ha administrado el factor de coagulación.

Las frases "inserción", "insertar" e "insertado" se refieren a la adición de aminoácidos en una posición interna de la secuencia de aminoácidos del factor de coagulación. A diferencia del caso de las proteínas de fusión N-terminales o C-terminales, los aminoácidos conforme a esta invención no se añaden al propio término N o término C de la secuencia de aminoácidos del factor de coagulación, sino que se insertan en una posición interna dentro de la secuencia de aminoácidos del factor de coagulación. El término "inserción" abarca no sólo la adición de aminoácidos (sin delecionar aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del factor de coagulación), sino también el reemplazamiento de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del factor de coagulación con los aminoácidos a "insertar". Por ejemplo, un dominio interno completo o una parte sustancial del mismo puede reemplazarse con el HLEP.

En una realización, el Factor VIII de la coagulación modificado conforme a la invención tiene la estructura siguiente:

N-L1-H-L2-C, [fórmula 1]

en donde

N es una porción N-terminal del factor de coagulación,
L1 y L2 son independientemente enlaces químicos o secuencias enlazadoras, secuencias enlazadoras que pueden ser secuencias enlazadoras diferentes o las secuencias enlazadoras iguales,
H es un HLEP, y
C es una porción C-terminal del factor de coagulación.

Preferiblemente, N comprende uno o dos o tres o cuatro o cinco dominios de proteína que están presentes en el término N del factor de la coagulación tipo salvaje. C comprende preferiblemente uno o dos o tres o cuatro o cinco dominios de proteína que están presentes en el término C del factor de la coagulación tipo salvaje. El factor de coagulación tipo salvaje puede tener sustancialmente la estructura N-C. En una alternativa, el factor de coagulación tipo salvaje puede tener sustancialmente la estructura N-D-C, en donde D representa un dominio o una parte del mismo que está reemplazada con el HLEP en el factor de coagulación modificado o, dicho con otras palabras, D representa una delección de una parte del factor de la coagulación tipo salvaje (es decir, un dominio completo o parte del mismo) que está reemplazada con el HLEP en el factor de coagulación modificado. Secuencias del factor de la coagulación preferidas se describen más adelante. Usualmente, la longitud de N + C no excede de la del factor de la coagulación tipo salvaje.

L1 y L2 pueden ser independientemente enlaces químicos o secuencias enlazadoras constituidas por uno o más aminoácidos, por ejemplo, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5 ó 1 a 3 (v.g. 1, 2 ó 3) aminoácidos y que pueden ser iguales o diferentes unos de otros. Usualmente, las secuencias enlazadoras no están presentes en la posición correspondiente en el factor de coagulación tipo salvaje. Ejemplos de aminoácidos adecuados presentes en L1 y L2 incluyen Gly y Ser.

Secuencias HLEP preferidas se describen más adelante. El factor de coagulación modificado de la invención puede comprender más de una secuencia HLEP, por ejemplo, dos o tres secuencias HLEP. Estas secuencias HLEP múltiples pueden insertarse en tándem, por ejemplo, como repeticiones sucesivas, o las mismas pueden estar presentes en diferentes posiciones de la secuencia del factor de la coagulación incluyendo también fusiones de secuencias HLEP en el propio término N o en el propio término C o en ambos términos de la secuencia del factor de coagulación, en donde al menos una secuencia HLEP tiene que estar insertada en una posición interna dentro de la secuencia del factor de coagulación. En estas realizaciones, el factor de coagulación modificado puede tener una de las estructuras siguientes:

N-L1-H-L2-I-L3-H-L4-C [fórmula 2]

N-L1-H-L2-C-L3-H [fórmula 3]

H-L1-N-L2-H-L3-C [fórmula 4]

H-L1-N-L2-H-L3-C-L4-H [fórmula 5]

en donde

N es una porción N-terminal del factor de coagulación,
L1, L2, L3 y L4, independientemente, son enlaces químicos o secuencias enlazadoras, secuencias enlazadoras que pueden ser secuencias enlazadoras diferentes o secuencias enlazadoras iguales,
H es un HLEP
I es una secuencia interna del factor de coagulación y
C es una porción C-terminal del factor de coagulación.

Los factores de la coagulación pueden procesarse proteolíticamente en varias etapas. Por ejemplo, como se ha mencionado arriba, durante su secreción en el plasma, el Factor VIII monocatenario se escinde intracelularmente en el límite B-A3 y en diferentes sitios dentro del dominio B. La cadena pesada está unida por un ion metálico a la cadena ligera que tiene la estructura de dominios A3-C1-C2. El Factor VIII se activa por escisión proteolítica en los aminoácidos Arg372 y Arg740 dentro de la cadena pesada y Arg1689 en la cadena ligera, generando el heterotrímero del Factor VIII activado que está constituido por el dominio A1, el dominio A2 y la cadena ligera (A3-C1-C2), un fragmento de 73 kDa. Por tanto, la forma activa del Factor VIII (Factor VIIIa) está constituida por una subunidad A1 asociada por el enlace de ion metálico

divalente a una cadena ligera A3-C1-C2 escindida por trombina y una subunidad A2 libre asociada de modo relativamente flojo con los dominios A1 y A3.

Por tanto, la presente invención abarca también factores de coagulación modificados que no están presentes como polipéptidos monocatenarios, sino que están constituidos por diversos polipéptidos (v.g., uno o dos o tres) que están asociados unos a otros por enlaces no covalentes. A modo de ejemplo, la estructura del factor de la coagulación modificado puede ser como sigue:

N-L1-H-L2-...-C,	[fórmula 6]
N-L1-H...L2-C,	[fórmula 7]
N-L1...H-L2-C,	[fórmula 8]
N...L1-H-L2-C,	[fórmula 9]

en donde "..." significa un enlace no covalente, y el significado de N, L1, L2, H y C es como se ha definido arriba. Formas escindidas análogas a las de fórmula 6 a fórmula 9 de polipéptidos de acuerdo con fórmula 2 a fórmula 5 están abarcadas también por la invención.

Usualmente, el sitio de inserción se elige de tal modo que la actividad biológica del factor de la coagulación se mantiene por completo o al menos en parte. Preferiblemente, la actividad biológica del factor de la coagulación modificado de la invención es al menos 25%, más preferiblemente al menos 50%, muy preferiblemente al menos 75% de la actividad biológica del factor de la coagulación que carece de la inserción o de la forma tipo salvaje del factor de coagulación.

Generalmente, se prefiere la inserción entre dos dominios del factor de la coagulación o en la proximidad del límite entre dos dominios. Los dos dominios pueden ser dominios adyacentes en el factor de coagulación tipo salvaje, o no.

Cuando se hace referencia en esta memoria a una inserción entre dos dominios (por ejemplo, una "inserción entre el dominio X y el dominio Y"), esto significa preferiblemente una inserción exactamente entre el aminoácido C-terminal del dominio X y el aminoácido N-terminal del dominio Y. Sin embargo, una "inserción entre el dominio X y el dominio Y" en el sentido de esta invención puede incluir también una inserción en una posición de aminoácido hasta n aminoácidos aguas arriba del aminoácido C-terminal del dominio X, o en una posición de aminoácido hasta n aminoácidos aguas abajo del aminoácido N-terminal del dominio Y. La cifra n es un número entero que no debería ser mayor que 10%, preferiblemente no mayor que 5% del número total de aminoácidos del dominio de referencia. Por lo general, n es 20, preferiblemente 15, más preferiblemente 10, aún más preferiblemente 5 o menos (p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5).

Se prefiere también que la estabilidad del factor de la coagulación modificado en medio exento de suero sea mayor que la del factor de la coagulación que carece de la inserción y/o que la de la forma tipo salvaje del factor de coagulación. Se prefiere también que la estabilidad del factor de la coagulación modificado en medio exento de proteínas animales sea mayor que la del factor de la coagulación que carece de la inserción y/o que la de la forma tipo salvaje del factor de coagulación. Preferiblemente, el aumento de estabilidad comparado con el factor de coagulación que carece de la inserción y/o con la forma tipo salvaje del factor de la coagulación es al menos 10%, más preferiblemente al menos 25%, muy preferiblemente al menos 50%. La estabilidad del factor de la coagulación en tales medios puede determinarse como se describe en el ejemplo 7.

La vida media funcional conforme a la presente invención es la vida media de la función biológica del factor de la coagulación una vez que el mismo ha sido administrado a un mamífero y se mide in vitro. La vida media funcional del factor de la coagulación modificado conforme a la invención es mayor que la del factor de la coagulación que carece de la modificación como se ensaya en la misma especie. La vida media funcional se incrementa preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 50% y aún más preferiblemente al menos 100% comparada con el factor de coagulación que carece de la modificación y/o con la forma tipo salvaje del factor de coagulación.

La vida media funcional de un factor de coagulación modificado que incluye una modificación HLEP, puede determinarse por administración del factor de la coagulación modificado respectivo (y en comparación con la del factor de la coagulación no modificado) a ratas, conejos u otras especies de animales experimentales por vía intravenosa o subcutánea y siguiendo la eliminación de la actividad biológica de dicho factor de coagulación modificado o respectivamente no modificado en muestras de sangre extraídas a intervalos apropiados después de la aplicación. Métodos de test adecuados son los tests de actividad que se describen en esta memoria.

Como un marcador sustitutivo para la vida media de la actividad biológica se pueden medir también los niveles de antígeno del factor de la coagulación modificado o respectivamente no modificado. Así, están abarcados también por la invención factores de coagulación modificados que tienen en una región interna entre el aminoácido N-terminal y el aminoácido C-terminal del polipéptido de traducción primario del factor de la coagulación una inserción de un polipéptido aumentador de la vida media (HLEP), caracterizados por que el factor de coagulación modificado tiene una vida media prolongada del antígeno del factor de coagulación comparada con la vida media del antígeno del factor de coagulación que carece de dicha inserción. La "vida media del antígeno del factor de coagulación" conforme a la presente invención es la vida media del antígeno del factor de la coagulación una vez que el mismo ha sido administrado a un mamífero y se mide in vitro. Los

métodos de test del antígeno están basados en anticuerpos específicos en un formato de inmunoensayo enzimático como es conocido por el experto en la técnica y están disponibles comercialmente (v.g., Dade Behring, Instrumentation Laboratory, Abbott Laboratories, Diagnostica Stago). Las vidas medias funcionales y del antígeno pueden calcularse utilizando los puntos temporales de la fase beta de la eliminación conforme a la fórmula $t_{1/2} = \ln 2 / k$, donde k es la pendiente de la línea de regresión.

Una vez que un factor de coagulación se activa in vivo durante la coagulación, puede no ser ya deseable mantener la vida media aumentada del factor de la coagulación ahora activado, dado que ello podría dar lugar a complicaciones trombóticas como sucede ya para un factor de coagulación activado tipo salvaje FVIIa (Aledort 2004. J Thromb Haemost 2:1700-1708) y que sería posiblemente mucho más amenazante si el factor activado tuviera una vida media mayor. Por tanto, es otro objetivo de la presente invención proporcionar moléculas de factor de coagulación de vida larga, que después de activación endógena in vivo o después de la disponibilidad de un cofactor in vivo tienen de hecho una vida media funcional comparable a la de un factor de coagulación no modificado escisión por trombina. Esto puede lograrse manteniendo ciertos sitios de la escisión en el factor de coagulación modificado (véase más adelante) que conducen a una escisión proteolítica durante la activación que separa el factor de coagulación del HLEP. Por consiguiente, en una realización, la vida media funcional del factor de coagulación endógenamente activado y modificado es sustancialmente igual a la del factor de la coagulación activado no-modificado que carece de la modificación, y/o es sustancialmente igual a la del factor de la coagulación activado tipo salvaje (v.g., $\pm 15\%$, preferiblemente $\pm 10\%$).

En otra realización, la vida media funcional del factor de la coagulación modificado activado endógenamente está prolongada comparada con la del factor de coagulación activado no modificado que carece de la inserción, o comparada con la del factor de coagulación activado tipo salvaje. El aumento puede ser mayor que 15% , por ejemplo, al menos 20% o al menos 50% . Una vez más, tales valores de vida media funcional pueden medirse y calcularse como se describe arriba para las vidas medias funcionales. Las vidas medias aumentadas de los factores de coagulación modificados activados endógenamente pueden ser beneficiosas en situaciones en las que sólo están disponibles niveles muy bajos de los factores de coagulación y que por tanto no son trombogénicas. Tales situaciones pueden ocurrir, por ejemplo, durante tratamientos de terapia génica en los que pueden alcanzarse a menudo sólo tasas de expresión bajas. Por tanto, tales factores de coagulación estabilizados podrían ser beneficiosos en, por ejemplo, terapia génica a pesar de un riesgo trombogénico ligado a tales factores de la coagulación si se administran como proteínas en dosis altas o fisiológicas.

Polipéptidos aumentadores de la vida media (HLEPs)

Un "polipéptido aumentador de la vida media" como se utiliza en esta memoria, se selecciona del grupo constituido por miembros de la familia de las albúminas, es decir, albúmina, afamina, alfa-fetoproteína y la proteína de unión de la vitamina D, así como la región constante de la inmunoglobulina G y fragmentos de los mismos. Puede ser una proteína de longitud total aumentadora de la vida media descrita en esta memoria (por ejemplo, albúmina, un miembro de la familia de las albúminas o la región constante de la inmunoglobulina G) o uno o más fragmentos de aquéllos que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica o la actividad biológica del factor de coagulación. Dichos fragmentos pueden ser de 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, o más aminoácidos contiguos de la secuencia del HLEP o pueden incluir parte o la totalidad de dominios específicos del HLEP respectivo, con tal que el fragmento HLEP proporcione una extensión de la vida media funcional de al menos 25% comparado con un factor de coagulación tipo salvaje.

La porción de HLEP de los constructos de inserción del factor de coagulación de la invención propuestos puede ser una variante de un HLEP normal. El término "variantes" incluye inserciones, delecciones y sustituciones, conservadoras o no conservadoras, donde tales cambios no alteran sustancialmente el sitio activo, o dominio activo que confiere las actividades biológicas de los factores de coagulación modificados.

Los constructos de inserción del HLEP de FVIII o reemplazamiento del dominio B de la invención propuestos pueden incluir variantes polimórficas naturales de HLEPs y fragmentos de HLEPs. El HLEP puede derivarse de cualquier vertebrado, especialmente de cualquier mamífero, por ejemplo, humano, de mono, vaca, oveja o cerdo. HLEPs no-mamíferos incluyen, pero sin carácter limitante, gallina y salmón.

Albúmina como HLEP

Los términos, "seroalbúmina humana" (HSA) y "albúmina humana" (HA) y "albúmina" (ALB) se utilizan indistintamente en esta solicitud. Los términos "albúmina" y "seroalbúmina" son más amplios y abarcan seroalbúmina humana (y fragmentos y variantes de la misma) además de albúmina de otras especies (y fragmentos y variantes de las mismas).

Como se utiliza en esta memoria, "albúmina" hace referencia colectivamente al polipéptido o la secuencia de aminoácidos de albúmina, o a un fragmento o variante de albúmina, que tiene una o más actividades funcionales (p. ej., actividades biológicas) de albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a albúmina humana o fragmentos de la misma, especialmente la forma madura de albúmina humana que se muestra en SEQ ID NO: 3 en esta memoria o albúmina de otros vertebrados o fragmentos de la misma, o análogos o variantes de estas moléculas o fragmentos de los mismos.

En particular, los constructos de inserción del factor de coagulación de la invención propuestos pueden incluir variantes polimórficas naturales de albúmina humana y fragmentos de albúmina humana. Hablando en términos generales, un fragmento o variante de albúmina tendrá al menos 10, preferiblemente al menos 40, muy preferiblemente más de 70 aminoácidos de longitud. La variante de albúmina puede estar constituida preferiblemente o comprender alternativamente al menos un dominio entero de albúmina o fragmentos de dichos dominios, por ejemplo los dominios 1 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 3), 2 (aminoácidos 195-387 de SEQ ID NO: 3), 3 (aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 3), 1 + 2 (1-387 de SEQ ID NO: 3), 2 + 3 (195-585 de SEQ ID NO: 3) o 1 + 3 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 3 + aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 3). Cada dominio está constituido en sí mismo por dos subdominios homólogos, a saber 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, con regiones enlazadoras flexibles inter-subdominios que comprenden los residuos Lys106 a Glu119, Glu292 a Val315 y Glu492 a Ala511.

La porción de albúmina de los constructos de inserción del factor de la coagulación de la invención propuestos puede comprender al menos un subdominio o dominio de HA o modificaciones conservadoras de los mismos.

15 Afamina, alfa-fetoproteína y proteína de unión de la vitamina D como HLEPs

Además de la albúmina, la alfa-fetoproteína, otro miembro de la familia de las albúminas, ha sido reivindicada como aumentadora de la vida media de un polipéptido terapéutico unido in vivo (WO 2005/024044). La familia de albúminas de las proteínas, proteínas de transporte del suero evolutivamente afines, está constituida por albúmina, alfa-fetoproteína (AFP; Beattie & Dugaiczky 1982. Gene 20:415-422), afamina (AFM; Lichenstein et al., 1994. J. Biol. Chem. 269:18149-18154) y proteína de unión de la vitamina D (DBP; Cooke & David 1985. J. Clin. Invest. 76:2420-2424). Sus genes representan una agrupación multigénica con semejanzas estructurales y funcionales que mapean en la misma región cromosómica en humanos, ratones y ratas. La semejanza estructural de los miembros de la familia de las albúminas sugiere su utilidad como HLEPs. Por tanto, es otro objeto de la invención utilizar tales miembros de la familia de las albúminas, fragmentos y variantes de los mismos como HLEPs. El término "variantes" incluye inserciones, delecciones y sustituciones, conservadoras o no conservadoras, con tal que la función deseada esté presente todavía.

Los miembros de la familia de las albúminas pueden comprender la longitud total de la proteína AFP, AFM y DBP respectiva, o pueden incluir uno o más fragmentos de las mismas que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica. Dichos fragmentos pueden tener 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de la proteína respectiva o pueden incluir parte o la totalidad de dominios específicos de la proteína respectiva, con tal que los fragmentos HLEP proporcionen una extensión de la vida media de al menos 25%. Los miembros de la familia de las albúminas de las proteínas de inserción de la invención pueden incluir variantes polimórficas naturales de AFP, AFM y DBP.

35 Las Inmunoglobulinas como HLEPs

Se conocen en la técnica regiones constantes (Fc) de inmunoglobulina G (IgG) que aumentan la vida media de proteínas terapéuticas (Dumont JA et al. 2006. 20:151 BioDrugs-160). La región constante de IgG de la cadena pesada está constituida por 3 dominios (CH1 - CH3) y una región bisagra. La secuencia de inmunoglobulina puede derivarse de cualquier mamífero, o de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, respectivamente. IgG y fragmentos de IgG sin un dominio de fijación de antígeno pueden utilizarse también como HLEPs. La porción del polipéptido terapéutico está conectada a la IgG o los fragmentos de IgG preferiblemente a través de la región bisagra del anticuerpo o un enlazador peptídico, que puede incluso ser escindible. Varias patentes y solicitudes de patente describen la fusión de proteínas terapéuticas a regiones constantes de inmunoglobulina para aumentar las vidas medias de proteínas terapéuticas in vivo. US 2004/0087778 y WO 2005/001025 describen proteínas de fusión de dominios Fc o al menos porciones de regiones constantes de inmunoglobulina con péptidos biológicamente activos que aumentan la vida media del péptido, que en caso contrario sería eliminado in vivo rápidamente. Se describieron proteínas de fusión Fc-IFN- β que alcanzaban mayor actividad biológica, vida media circulante prolongada y mayor solubilidad (WO 2006/000448). Se dieron a conocer proteínas Fc-EPO con una vida media en suero prolongada y mayor potencia in vivo (WO 2005/063808) así como fusiones de Fc con G-CSF (WO 2003/076567), péptido 1 similar a glucagón (WO 2005/000892), factores de coagulación (WO 2004/101740) e interleucina -10 (U.S. 6.403.077), todas ellas con propiedades aumentadoras de la vida media.

55 Factores de la coagulación

El término "factor de coagulación" como se utiliza en esta memoria designa el Factor VIII de la coagulación de la sangre. Los factores de coagulación de la presente invención pueden ser también variantes del Factor VIII de la coagulación tipo salvaje. El término "variantes" incluye inserciones, delecciones y sustituciones, conservadoras o no conservadoras, siempre que tales cambios no alteren sustancialmente el sitio activo, o dominio activo, que confiere las actividades biológicas del factor de la coagulación respectivo.

FVIII

Los términos "Factor VIII de la coagulación de la sangre", "Factor VIII" y "FVIII" se utilizan indistintamente en esta memoria. El "Factor VIII de la coagulación de la sangre" incluye Factor VIII de la coagulación de la sangre tipo salvaje, así como derivados del Factor VIII de la coagulación de la sangre tipo salvaje que tienen la actividad procoagulante del Factor VIII de la coagulación de la sangre tipo salvaje. Los derivados pueden tener delecciones, inserciones y/o adiciones comparada con la secuencia de aminoácidos del Factor VIII tipo salvaje. El término FVIII incluye formas procesadas proteolíticamente de Factor VIII, por ejemplo, la forma antes de la activación, que comprende cadena pesada y cadena ligera. El término "Factor VIII" incluye cualesquiera variantes o mutantes de Factor VIII que tienen al menos 10%, preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 50%, muy preferiblemente al menos 75% de la actividad biológica del Factor VIII tipo salvaje.

Como ejemplos no limitantes, las moléculas de Factor VIII incluyen mutantes de Factor VIII, que previenen o reducen la escisión de APC (Amano 1998. *Thromb. Haemost.* 79:557-563), mutantes de Factor VIII que estabilizan adicionalmente el dominio A2 (WO 97/40145), mutantes de FVIII que dan como resultado un aumento de la expresión (Swaroop et al., 1997. *JBC* 272:24121-24124), mutantes de Factor VIII que reducen su inmunogenicidad (Lollar 1999. *Thromb. Haemost.* 82:505-508), FVIII reconstituido a partir de cadenas pesadas y ligeras expresadas diferentemente (Oh et al. 1999. *Exp. Mol. Med.* 31:95-100), mutantes de FVIII que reducen la unión a receptores que conducen al catabolismo de FVIII como HSPG (proteoglicanos de sulfato de heparano) y/o LRP (proteína afin al receptor de lipoproteínas de baja densidad) (Ananyeva et al., 2001. *TCM*, 11:251-257), variantes de FVIII estabilizadas por enlaces disulfuro (Gale et al., 2006. *J. Thromb. Hemost.* 4:1315-1322), mutantes de FVIII con propiedades de secreción mejoradas (Miao et al., 2004. *Blood* 103:3412-3419), mutantes de FVIII con actividad específica de cofactores aumentada (Wakabayashi et al., 2005. *Biochemistry* 44:10298-304), mutantes de FVIII con biosíntesis y secreción mejoradas, interacción reducida con las chaperonas del ER, transporte ER-Golgi mejorado, activación o resistencia a la desactivación mejoradas y vida media aumentada (resumido por Pipe, 2004. *Sem. Thromb. Hemost.* 30:227-237).

Un test adecuado para determinar la actividad biológica del Factor VIII es el ensayo de coagulación de una etapa o de dos etapas (Rizza et al., 1982. *Coagulation Assay of FVIII:C and FIXa in Bloom ed. The Hemophilias*. NY Churchill Livingston 1992) o el ensayo del sustrato cromógeno de FVIII:C (S. Rosen, 1984. *Scand J Haematol* 33:139-145, suppl.).

La secuencia de cDNA y la secuencia de aminoácidos de la forma madura tipo salvaje del Factor VIII de coagulación de la sangre humana se muestran en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente. La referencia a la posición de un aminoácido de una secuencia específica significa la posición de dicho aminoácido en la proteína FVIII tipo salvaje y no excluye la presencia de mutaciones, por ejemplo, delecciones, inserciones y/o sustituciones en otras posiciones en la secuencia a que se hace referencia. Por ejemplo, una mutación en "Glu2004" refiriéndose a SEQ ID NO: 2 no excluye que en el homólogo modificado falten uno o más aminoácidos en las posiciones 1 a 2332 de SEQ ID NO: 2.

Proteínas FVIII con una inserción de HLEP

En el sentido más general, las proteínas FVIII modificadas de la invención se caracterizan por que comprenden moléculas FVIII con un HLEP integrado en las moléculas FVIII como se definen en esta memoria, tales que el HLEP no reduce la actividad molar específica de FVIII de la proteína quimérica por debajo de aproximadamente 10% de la actividad molar específica de FVIII tipo salvaje. La inserción del HLEP puede tener lugar en cualquier lugar sitio entre el aminoácido N-terminal y el término C de la secuencia de FVIII. Preferiblemente, el HLEP está integrado entre los dominios de la proteína FVIII tipo salvaje.

Los dominios de FVIII comprenden las posiciones de aminoácidos siguientes (los números de los aminoácidos se refieren a SEQ ID NO: 2):

A1: ...1-336
a1: ...337 - 372
A2: ...373 - 710

a2: ...711 - 740
B: ...741 - 1648
a3: ...1649 - 1689
A3: ...1690-2019
C1: ...2020 - 2172
C2: ...2173 - 2332

El sitio de integración es la región del dominio B, donde el dominio B puede estar reemplazado parcialmente o en su totalidad (figura 2).

En una realización preferida de la invención, las proteínas quiméricas FVIII de la invención se caracterizan por que comprenden moléculas FVIII con delección parcial o total del dominio B y un HLEP integrado en las moléculas FVIII tal que el HLEP se inserta entre un dominio funcional A1/A2 en su término amino y un dominio funcional A3/C1/C2 en su término carboxi.

5 Se ha encontrado que es posible insertar HLEPs o derivados de HLEP dentro del dominio B (la secuencia FVIII entre los dominios A2 y A3 [aminoácidos 741 a 1648] que parece prescindible para la función biológica de FVIII (Pittman et al., 1992. Blood 81:2925-2935) a fin de proporcionar moléculas FVIII con propiedades nuevas y mejoradas al tiempo que conservan la actividad biológica del FVIII. El dominio B tiene una longitud de aproximadamente 900 aminoácidos, y el
10 HLEP puede insertarse en cualquier lugar dentro del dominio B sin delección alguna del dominio B, o el dominio B puede estar reemplazado por un HLEP parcialmente o en su totalidad. Delección parcial se refiere a delecciones de al menos 1 aminoácido, preferiblemente a delecciones de 100 a 600 aminoácidos y muy preferiblemente a delecciones de más de 600 aminoácidos del dominio B (figura 2e-h).

15 En una realización preferida de la invención, la mayor parte del dominio B se reemplaza por un HLEP, si bien se conservan unos pocos aminoácidos de la secuencia de los terminales amino y carboxi del dominio B que contienen sitios de procesamiento importantes para la escisión y activación de las moléculas FVIII de la invención (figuras 1a, b, d y 2h - i). Con preferencia, aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, más preferiblemente 3 a 10 aminoácidos, en el término C y en el término N del dominio B, que se requieren para conservación de los sitios de procesamiento para trombina en la posición
20 del aminoácido 740 de la secuencia de FVIII (SEQ ID NO 2) y la proteasa que escinde entre el dominio B y el dominio A3 durante el proceso de secreción, se mantienen dentro de la molécula FVIII de la invención (figura 1 y figura 2h). Alternativamente, los aminoácidos retenidos del dominio B podrían estar reemplazados por sitios de escisión artificiales. Un sitio de escisión PACE/Furina (Nakayama 1997. Biochem. J. 327:625-635) puede utilizarse para guiar el procesamiento durante la secreción, y sitios artificiales de escisión por trombina como se describen en WO 2004/005347 (figura 1c) u
25 otros sitios de escisión por proteasas pueden introducirse para el procesamiento de la activación (figura 1e).

Otro aspecto de la invención es la inserción de más de un HLEP, en donde el HLEP, que se inserta varias veces, puede ser el mismo HLEP o puede ser una combinación de diferentes HLEPs. Asimismo, están abarcadas por la invención combinaciones de inserciones de uno o más HLEPs en FVIII con fusiones adicionales N- y/o C-terminales de uno o más
30 HLEPs, que podrían ser el mismo HLEP o una combinación de diferentes HLEPs.

Una vez que un factor de coagulación se activa endógenamente durante la coagulación in vivo, puede no ser ya deseable mantener la vida media funcional aumentada del factor de la coagulación ahora activado, dado que esto podría dar lugar a complicaciones trombóticas, como sucede ya para un factor de coagulación activado tipo salvaje como FVIIa (Aledort
35 2004. J Thromb Haemost 2:1700-1708) y que podría ser mucho más relevante si el factor activado tuviera una vida media funcional aumentada. Por tanto, es otro objetivo de la presente invención proporcionar moléculas del Factor VIII de la coagulación de vida larga, que después de activación endógena in vivo o después de disponibilidad de un cofactor tengan de hecho una vida media funcional comparable a la del FVIII no modificado. Esto puede lograrse, a modo de ejemplo no limitante, mediante mantenimiento de los sitios de escisión por trombina en la posición del aminoácido 740 de la secuencia
40 de FVIII (SEQ ID NO: 2) y para la proteasa que escinde entre el dominio B y el dominio A3 durante el proceso de secreción. Con tales secuencias de conexión FVIII-HLEP, la activación de la proteína quimérica FVIII de la invención dará lugar a una separación concomitante completa de FVIIIa del resto de HLEP.

En otra realización adicional de la invención, sin embargo, uno o más de los sitios de escisión proteolítica, preferiblemente
45 sitios de escisión por trombina en Arg740 (v.g. figura 2i) y/o Arg372, se mutan o se delecionan con el fin de prevenir la escisión y dan lugar a una proteína de inserción que exhibe propiedades mejoradas como vida media funcional aumentada incluso como una molécula activada.

En otra realización de la invención, la delección del dominio B puede extenderse a las regiones ácidas flanqueantes a2 y a3 (figura 2 k y l). Con respecto a a2, esta región puede ser delecionada en parte (figura 2 k) o totalmente. Por tanto, la molécula HLEP no se desprenderá después de la activación de FVIII, sino que, en lugar de ello, permanecerá unida al dominio A2. Tal proteína de inserción activada tendrá una vida media funcional aumentada. La región ácida a3 puede ser
50 delecionada en parte (figura 2l), con tal que las propiedades de unión a vWF de a3 se mantengan inafectadas.

Como se representa en la figura 2a – d, se da a conocer un sitio de integración dentro de la molécula FVIII representado por la región entre el término C de la región ácida 1 (a1) y el término N del dominio A2 (no de acuerdo con la invención). La figura 2a describe un esquema de integración en el que se ha introducido un sitio adicional de escisión por trombina en el término C de la albúmina. En tal proteína de inserción, el resto HLEP se escindirá durante la activación endógena de FVIII in vivo y la molécula FVIII activada tendrá una vida media funcional comparable al FVIII tipo salvaje. En el caso
60 de una proteína de inserción como la representada en la figura 2b, el sitio de escisión adicional por trombina en el término C de HLEP está ausente. Por tanto, el HLEP no se desprenderá después de la activación de FVIII, sino que, en lugar de ello, permanecerá unido al dominio A2. Tal proteína de inserción activada tendrá una vida media funcional aumentada. En el caso de una proteína de inserción como se muestra en la figura 2c, el sitio de escisión por trombina en Arg372 está ausente. Por tanto, el HLEP no se desprenderá después de la activación del FVIII, sino que, en su lugar, permanecerá unida al dominio A1. Tal proteína de inserción activada tendrá una vida media aumentada. Una proteína de inserción
65

como se representa en la figura 2d mantendrá los dominios A1 y A2 enlazados covalentemente y generará una proteína de inserción con prolongación también de la vida media funcional de la forma activada.

Un sitio de integración dentro de la molécula FVIII representado por la región entre el término C del dominio A3 y el término N del dominio C1 se expone en la figura 2m, que no está de acuerdo con la invención. En tal proteína de inserción, el resto HLEP será un componente integral de la cadena ligera de FVIII y ambas proteínas de inserción desactivada y activada tendrán vidas medias funcionales aumentadas.

Un sitio de integración dentro de la molécula FVIII está representado por la región entre el término C del dominio C1 y el término N del dominio C2 como se describe en esta memoria, y tal como se representa en la figura 2n, sitio de integración que no está de acuerdo con la invención. En tal proteína de inserción, el resto HLEP será un componente integral de la cadena ligera de FVIII y tanto la proteína de inserción desactivada como la activada tendrán vidas medias funcionales aumentadas.

En otra realización de la invención, las proteínas FVIII de la invención pueden expresarse como dos cadenas separadas (véase más adelante).

El Factor VIII de la coagulación modificado conforme a esta invención puede ser un polipéptido monocatenario, o puede estar compuesto por dos o tres cadenas de polipéptidos que están asociadas por enlaces no covalentes, debido al procesamiento proteolítico.

En otra realización de la invención, los aminoácidos en o cerca del sitio de escisión PACE/Furina (Arg1648, por ejemplo, figura 1a) están mutados o delecionados a fin de prevenir la escisión por PACE/Furina. Se cree que esto da como resultado una molécula de fusión Factor VIII/HLEP monocatenaria con vida media aumentada.

En una realización de la invención, el FVIII modificado de la invención exhibe una vida media funcional aumentada comparado con la forma FVIII correspondiente, que no contiene HLEP integrado y/o la forma FVIII tipo salvaje. La vida media funcional puede determinarse, por ejemplo, in vivo en modelos animales de hemofilia A, como los ratones FVIII knockout, en los cuales cabría esperar un efecto hemostático de mayor duración comparado con el FVIII tipo salvaje. El efecto hemostático podría ensayarse por ejemplo por determinación del tiempo de detención de la hemorragia después de un corte en la cola.

La vida media funcional se incrementa preferiblemente al menos un 25%, más preferiblemente al menos 50% y todavía más preferiblemente al menos 100% en comparación con la forma sin inclusión de un HLEP y/o con la forma tipo salvaje de FVIII.

En otra realización de la invención, el FVIII modificado de la invención exhibe una recuperación in vivo mejorada comparado con la forma FVIII correspondiente, que no contiene HLEP integrado alguno y/o con la forma de FVIII tipo salvaje. La recuperación in vivo puede ser determinada in vivo en animales normales o en modelos animales de hemofilia A, como los ratones FVIII knockout, en los cuales podría esperarse encontrar un aumento del porcentaje de FVIII modificado de la invención por ensayos de antígeno o actividad en la circulación poco después (5 a 10 min.) de la administración i.v. en comparación con la forma FVIII correspondiente, que no contiene HLEP integrado alguno y/o con la forma de FVIII tipo salvaje.

La recuperación in vivo se incrementa preferiblemente en al menos 10%, más preferiblemente en al menos 20% y todavía más preferiblemente en al menos 40% comparada con la forma sin inclusión de un HLEP y/o con la forma de FVIII tipo salvaje.

En otra realización adicional de la invención, se utilizan como HLEPs regiones constantes de inmunoglobulina o porciones de las mismas. Preferiblemente se utiliza la región Fc que comprende un dominio CH2 y CH3 y una región bisagra de una IgG, más preferiblemente de una IgG1 o fragmentos o variantes de la misma, variantes que incluyen mutaciones que aumentan la unión al receptor Fc neonatal (FcRn). La región Fc no se utiliza para generar inserciones de Fc monómeras o dímeros como se describen en la técnica, sino que se inserta más bien en la molécula FVIII de tal manera que parte de la molécula FVIII está fusionada a su término N y otra parte está fusionada a su término C (figura 2 a-n). En una realización preferida de la invención, una región Fc no fusionada se coexpresa a partir de otro vector de expresión o incluso del mismo vector de expresión que por enlace mediante puentes disulfuro forma un heterodímero de Fc con la región Fc dentro de la molécula FVIII quimérica.

Además de la ampliación de la vida media funcional de FVIII, restos HLEP como los descritos en esta invención pueden utilizarse también para la inserción en otras proteínas de dominios múltiples para el mismo propósito de extensión de la vida media.

Por tanto, la invención abarca también otras proteínas modificadas, preferiblemente factores de coagulación modificados, con inserciones de restos HLEP dentro de su secuencia de aminoácidos.

Polinucleótidos

La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica un factor de coagulación FVIII modificado de la invención como se describe en esta solicitud. El término "polinucleótido(s)" se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido que puede ser RNA o DNA no-modificado o RNA o DNA modificado. El polinucleótido puede ser DNA mono- o bicatenario, o RNA mono- o bicatenario. Como se utiliza en esta memoria, el término "polinucleótido(s)" incluye también DNAs o RNAs que comprenden una o más bases modificadas y/o bases extrañas, tales como la inosina. Se apreciará que pueden realizarse una diversidad de modificaciones en el DNA y el RNA que sirven para muchos propósitos útiles, conocidas por quienes poseen experiencia en la técnica. El término "polinucleótido(s)" como se emplea en esta memoria abarca tales formas de polinucleótidos modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente, así como las formas químicas de DNA y RNA características de virus y células, que incluyen, por ejemplo, células simples y complejas.

El individuo experto comprenderá que, debido a la degeneración del código genético, un polipéptido dado puede ser codificado por polinucleótidos diferentes. Estas "variantes" están abarcadas por la presente invención.

Preferiblemente, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido aislado. El término polinucleótido "aislado" se refiere a un polinucleótido que está sustancialmente exento de otras secuencias de ácido nucleico, tales como y sin carácter limitante a otros DNA y RNA cromosómicos y extracromosómicos. Los polinucleótidos aislados pueden purificarse a partir de una célula hospedadora. Métodos convencionales de purificación de ácidos nucleicos conocidos por los profesionales expertos pueden utilizarse para obtener polinucleótidos aislados. El término incluye también polinucleótidos recombinantes y polinucleótidos sintetizados químicamente.

La invención se refiere además a un grupo de polinucleótidos que codifican juntos el factor de coagulación modificado de la invención. Un primer polinucleótido del grupo puede codificar la parte N-terminal del factor de la coagulación modificado, y un segundo polinucleótido puede codificar la parte C-terminal del factor de la coagulación modificado.

Otro aspecto adicional de la invención es un plásmido o vector que comprende un polinucleótido conforme a la invención. Preferiblemente, el plásmido o vector es un vector de expresión. En una realización particular, el vector es un vector de transferencia para uso en terapia génica humana.

La invención se refiere también a un grupo de plásmidos o vectores que comprenden el grupo de polinucleótidos anterior. Un primer plásmido o vector puede contener dicho primer polinucleótido, y un segundo plásmido o vector puede contener dicho segundo polinucleótido. A modo de ejemplo, y con referencia al Factor VIII de la coagulación, las secuencias codificantes del péptido señal, los dominios A1 y A2, el resto de la secuencia del dominio B y el HLEP pueden clonarse en el primer vector de expresión, y las secuencias codificantes de A3, C1 y C2 con una secuencia de péptido señal adecuada pueden clonarse en el segundo vector de expresión (figura 2o). Ambos vectores de expresión se cotransfectan en una célula hospedadora adecuada, lo que conducirá a la expresión de las cadenas ligera y pesada de la molécula FVIII de la invención y a la formación de una proteína funcional.

Alternativamente, la secuencia codificante del péptido señal FVIII, los dominios A1 y A2 se clonan en el primer vector de expresión y las secuencias codificantes del HLEP, A3, C1 y C2 de FVIII con una secuencia de péptido señal apropiada se clonan en el segundo vector de expresión (figura 2 p). Ambos vectores de expresión se cotransfectan en una célula hospedadora adecuada, lo que conducirá a la expresión de las cadenas ligera y pesada de la molécula FVIII de la invención y a la formación de una proteína funcional.

Alternativamente, ambas secuencias codificantes se clonan en un solo vector de expresión, ya sea utilizando dos secuencias de promotor separadas o un promotor y un elemento interno del sitio de entrada al ribosoma (IRES) para dirigir la expresión de ambas cadenas de FVIII.

Otro aspecto adicional de la invención es una célula hospedadora que comprende un polinucleótido, un plásmido o vector de la invención, o un grupo de polinucleótidos o un grupo de plásmidos o vectores como se describen en esta memoria.

Las células hospedadoras de la invención se pueden emplear en un método de producción de la molécula del factor FVIII de coagulación modificado, que forma parte de esta invención. El método comprende:

- (a) cultivar las células hospederas de la invención en condiciones tales que se expresa la proteína de inserción deseada; y
- (b) opcionalmente, recuperar la proteína de inserción deseada a partir de las células hospedadoras o del medio de cultivo.

Se prefiere purificar los factores de coagulación modificados de la presente invención hasta pureza $\geq 80\%$, más preferiblemente pureza $\geq 95\%$ y es particularmente preferido un estado farmacéuticamente puro, que tiene una pureza superior a 99,9% con respecto a contaminación por macromoléculas, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos y que está exento de agentes infecciosos y pirogénicos. Preferiblemente, un factor de coagulación modificado de la invención aislado o purificado está sustancialmente exento de otros polipéptidos no afines.

Los diversos productos de la invención son útiles como medicamentos. De acuerdo con ello, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula del factor de coagulación FVIII modificado como se describe en esta memoria, un polinucleótido de la invención, o un plásmido o vector de la invención.

La invención se refiere también al factor de coagulación modificado para uso en el tratamiento de un individuo que sufre un trastorno de la coagulación de la sangre tal como hemofilia A. El tratamiento comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del factor FVIII de coagulación modificado como se describe en esta memoria. En otra realización, el tratamiento comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un polinucleótido de la invención o de un plásmido o vector de la invención. Alternativamente, el tratamiento puede comprender la administración al individuo de una cantidad eficaz de las células hospedadoras de la invención descritas en esta memoria.

Expresión de los mutantes propuestos

La producción de proteínas mutantes recombinantes a niveles altos en células hospedadoras adecuadas requiere el ensamblaje de los cDNAs modificados arriba mencionados en unidades transcripcionales eficaces junto con elementos reguladores adecuados en un vector de expresión recombinante que puede propagarse en diversos sistemas de expresión conforme a métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los elementos reguladores transcripcionales eficaces podrían derivarse de virus que tienen células animales como sus hospedadores naturales o del DNA cromosómico de células animales. Preferiblemente, pueden utilizarse combinaciones promotor-intensificador derivadas del Virus 40 de los Simios, adenovirus, virus BK de polioma, citomegalovirus humano, o la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous o combinaciones promotor-intensificador que incluyen genes de transcripción constitutiva fuerte en células animales como beta-actina o GRP78. Para lograr niveles altos estables de mRNA transcrito a partir de los cDNAs, la unidad transcripcional debería contener en su parte 3'-proximal una región de DNA que codifique una secuencia transcripcional de terminación-poliadenilación. Preferiblemente, esta secuencia se deriva de la región transcripcional temprana del Virus 40 de los Simios, el gen de beta-globina del conejo, o el gen activador del plasminógeno tisular humano.

Los cDNAs se integran luego en el genoma de una línea de células hospedadoras adecuada para la expresión de las proteínas del Factor VIII. Preferiblemente, esta línea celular debería ser una línea de células animales procedente de vertebrados a fin de asegurar plegamiento correcto, formación de enlaces disulfuro, glicosilación ligada a asparagina y otras modificaciones post-traduccionales, así como secreción en el medio de cultivo. Ejemplos de otras modificaciones post-traduccionales son O-sulfatación de la tirosina y procesamiento proteolítico de la cadena polipeptídica naciente. Ejemplos de líneas de células que se pueden utilizar son células COS de mono, células L de ratón, células C127 de ratón, células BHK 21 de hámster, células 293 de riñón embrionario humano y células CHO de hámster.

El vector de expresión recombinante que codifica los cDNAs respectivos puede introducirse en una línea de células animales en diversas formas diferentes. Por ejemplo, pueden crearse vectores de expresión recombinantes a partir de vectores basados en virus animales diferentes. Ejemplos de éstos son vectores basados en baculovirus, virus vaccinia, adenovirus y preferiblemente el virus del papiloma bovino.

Las unidades de transcripción que codifican los DNA correspondientes pueden introducirse también en células animales junto con otro gen recombinante que puede funcionar como un marcador seleccionable dominante en estas células con el fin de facilitar el aislamiento de clones de células específicas que tienen el DNA recombinante integrado en su genoma. Ejemplos de este tipo de genes marcadores seleccionables dominante son amino-glucosido-fosfotransferasa Tn5, que confiere resistencia a la geneticina (G418), higromicina-fosfotransferasa, que confiere resistencia a higromicina, y puromicina-acetil-transferasa, que confiere resistencia a puromicina. El vector de expresión recombinante que codifica un marcador seleccionable de este tipo puede residir en el mismo vector, como el que codifica el cDNA de la proteína deseada, o puede estar codificado en un vector separado que se introduce y se integra simultáneamente en el genoma de la célula hospedadora, dando frecuentemente como resultado un enlace físico fuerte entre las diferentes unidades de transcripción.

Otros tipos de genes marcadores seleccionables que se pueden utilizar junto con el cDNA de la proteína deseada se basan en diversas unidades de transcripción que codifican dihidrofolato-reductasa (dhfr). Después de la introducción de este tipo de gen en células que carecen de actividad dhfr endógena, preferiblemente células CHO (DUKX-B11, DG-44), ello hará posible que éstas crezcan en medios que carecen de nucleósidos. Un ejemplo de un medio de este tipo es F12 de Ham sin hipoxantina, timidina y glicina. Estos genes de dhfr pueden introducirse junto con las unidades transcripcionales del cDNA del Factor VIII en células CHO del tipo anterior, sea unidos al mismo vector o a vectores diferentes, creando con ello líneas celulares dhfr-positivas productoras de proteína recombinante.

Si las líneas de células anteriores se cultivan en presencia del metotrexato citotóxico inhibidor de dhfr, surgirán nuevas líneas celulares resistentes a metotrexato. Estas líneas celulares pueden producir proteína recombinante a una tasa creciente debido al número aumentado de dhfr enlazada y las unidades transcripcionales de la proteína deseada. Cuando

estas líneas de células se propagan en concentraciones crecientes de metotrexato (1-10000 nM), se pueden obtener nuevas líneas de células que producen la proteína deseada a tasa muy alta.

Las líneas celulares anteriores que producen la proteína deseada se pueden cultivar en gran escala, en cultivo de suspensión o sobre distintos soportes sólidos. Ejemplos de estos soportes son micro-portadores basados en matrices de dextrano o colágeno, o soportes sólidos en forma de fibras huecas o diversos materiales cerámicos. Cuando se desarrolla en cultivo de suspensión celular o sobre micro-portadores, el cultivo de las líneas celulares anteriores puede realizarse como un cultivo de baño o como un cultivo de perfusión con producción continua de medio acondicionado durante periodos de tiempo prolongados. Así, conforme a la presente invención, las líneas de células anteriores son muy adecuadas para el desarrollo de un proceso industrial orientado a la producción de las proteínas mutantes recombinantes deseadas.

Purificación y Formulación

La proteína recombinante mutante, que se acumula en el medio de secreción de las células de los tipos anteriores, puede concentrarse y purificarse por una diversidad de métodos bioquímicos y cromatográficos, incluyendo métodos que utilizan diferencias en tamaño, carga, hidrofobicidad, solubilidad, afinidad específica, etc. entre la proteína deseada y otras sustancias en el medio de cultivo de las células.

Un ejemplo de tal purificación es la adsorción de la proteína recombinante mutante en un anticuerpo monoclonal, dirigido a, por ejemplo, un HLEP, preferiblemente albúmina humana, o dirigido al factor de coagulación respectivo, que está inmovilizado sobre un soporte sólido. Después de adsorción del FVIII mutante en el soporte, lavado y desorción, la proteína se puede purificar ulteriormente por una diversidad de técnicas cromatográficas basadas en las propiedades anteriores. El orden de los pasos de purificación se elige por ejemplo conforme a la capacidad y selectividad de los pasos, la estabilidad del soporte u otros aspectos. Pasos de purificación preferidos son, por ejemplo, pero sin carácter limitante, pasos de cromatografía de intercambio iónico, pasos de cromatografía de inmuno-afinidad, pasos de cromatografía de afinidad, pasos de cromatografía de interacción hidrófoba, pasos de cromatografía de colorantes, y pasos de cromatografía de exclusión por tamaños.

Para reducir al mínimo el riesgo teórico de contaminaciones de virus, pueden incluirse en el proceso pasos adicionales que permiten la desactivación o eliminación efectiva de los virus. Tales pasos son p. ej. tratamiento térmico en estado líquido o sólido, tratamiento con disolventes y/o detergentes, radiación en el espectro visible o UV, radiación gamma o nanofiltración.

Los polinucleótidos modificados (por ejemplo, DNA) de esta invención pueden integrarse también en un vector de transferencia para uso en terapia génica humana.

Las diversas realizaciones descritas en esta memoria pueden combinarse unas con otras. La presente invención se describirá adicionalmente con mayor detalle en los ejemplos siguientes de la misma. Esta descripción de realizaciones específicas de la invención se hará en conjunción con las figuras adjuntas.

Las proteínas de inserción que se describen en esta invención pueden formularse en preparaciones farmacéuticas para uso terapéutico. La proteína purificada puede disolverse en soluciones tampón acuosas convencionales fisiológicamente compatibles a las cuales se pueden añadir, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas.

Tales portadores y excipientes farmacéuticos, así como formulaciones farmacéuticas adecuadas son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)). En particular, la composición farmacéutica que comprende la variante del polipéptido de la invención puede formularse en forma liofilizada o líquida estable. La variante del polipéptido puede liofilizarse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes de ser utilizadas por adición de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

Las formulaciones de la composición se suministran al individuo por cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen y pueden utilizarse diversos sistemas de suministro para administrar la composición por cualquier ruta conveniente. Con preferencia, las composiciones de la invención se administran sistémicamente. Para uso sistémico, las proteínas de inserción de la invención se formulan para administración parenteral (intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmica) o enteral (por ejemplo, oral, vaginal o rectal) conforme a métodos convencionales. Las vías más preferidas de administración son la administración intravenosa y subcutánea. Las formulaciones pueden administrarse continuamente por infusión o por inyección de bolus. Algunas formulaciones abarcan sistemas de liberación lenta.

Las proteínas de inserción de la presente invención se administran a los pacientes en una dosis terapéuticamente eficaz, lo que significa una dosis que es suficiente para producir los efectos deseados, previniendo o reduciendo la gravedad o la propagación de la afección o la indicación de que se trate sin alcanzar una dosis que produzca efectos secundarios

adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores como por ejemplo la indicación, la formulación, y el modo de administración, y tiene que ser determinada en ensayos pre-clínicos y clínicos para cada indicación respectiva.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse sola o en combinación con otros agentes terapéuticos. Estos agentes pueden incorporarse como parte del mismo producto farmacéutico. Un ejemplo de un agente de este tipo es el factor von Willebrand.

La figura 1 muestra el reemplazamiento del dominio B de FVIII por albúmina. Se representan la organización del cDNA de FVIII tipo salvaje (FVIII wt) y FVIII con el reemplazamiento del dominio B por albúmina (FVIII-HA). Se muestran secuencias de transición y los restantes aminoácidos del dominio B en los constructos de FVIII-HA. La numeración de los aminoácidos se refiere a la secuencia de FVIII tipo salvaje como se indica en SEQ ID NO: 2. Se indican el cambio del aminoácido C1636S en DNA pF8-1211 y la delección de R740 en pF8-1413.

La figura 2 muestra esquemáticamente diversas realizaciones del cDNA que codifican los polipéptidos del Factor VIII modificado de la presente invención. El HLEP puede insertarse en diversas posiciones dentro de la secuencia de FVIII, como se ha descrito arriba. Las inserciones de HLEP que se representan en las Figs. 2a - 2d, 2m y 2n no están de acuerdo con la invención.

La figura 3 muestra el perfil farmacocinético de dos moléculas de FVIII modificado con albúmina integrada y delección parcial del dominio B (DNA pF8-1211 y pF8-1413, véase figura 1) comparados con el FVIII tipo salvaje (véase ejemplo 5).

Ejemplos:

Ejemplo 1: Generación de vectores de expresión para moléculas FVIII con reemplazamiento del dominio B de FVIII por albúmina

Se utilizó en primer lugar un plásmido de expresión basado en pIRESpuo3 (BD Biosciences) que contenía la secuencia de cDNA de FVIII de longitud total en su sitio de clonación múltiple (pF8-FL) para deleccionar la mayor parte de la secuencia del dominio B y crear un sitio de restricción para la inserción de secuencias extrañas. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos We1356 y We1357 (SEQ ID NO: 5 y 6) en una reacción PCR utilizando pF8-FL como plantilla para ampliar una parte del dominio A2 y el término N del dominio B (fragmento 1) y se utilizaron los oligonucleótidos We1358 y We1359 (SEQ ID NO: 7 y 8) en otra reacción PCR utilizando pF8-FL como plantilla para amplificar el término C del dominio B, el dominio A3 y parte del dominio C1 (fragmento 2). Ambos fragmentos se purificaron en gel. El fragmento 1 fue digerido posteriormente con las endonucleasas de restricción PinAI y BamH1, y el fragmento 2 fue digerido con las endonucleasas de restricción PinAI y BspEI; ambos fragmentos se purificaron luego y se ligaron a pF8-FL, donde el fragmento BamH1/BspEI que abarcaba parte del dominio A2, los dominios B y A3 y parte del dominio C1 habían sido eliminados. El plásmido resultante, pF8-DB, contenía ahora básicamente una delección mayor del dominio B con un resto de secuencias N- y C- terminales del dominio B unidas por un sitio PinAI. En este sitio se insertó un fragmento de albúmina humana, que había sido generado por amplificación PCR en cDNA de albúmina utilizando los cebadores We2502 y We2503 (SEQ ID NO: 9 y 10), digestión con PinAI y purificación. Para retirar los sitios PinAI, el plásmido resultante fue sometido a dos tandas de mutagénesis orientada conforme a protocolos estándar (QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene). Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos We2504 y We2505 (SEQ ID NO: 11 y 12) como cebadores de mutagénesis en la primera tanda, y se emplearon los oligonucleótidos We2506 y We2507 (SEQ ID NO: 13 y 14) en la segunda tanda de mutagénesis. El plásmido de expresión final se designó pF8-1210. Para retirar un residuo cisteína libre se aplicó mutagénesis orientada (aminoácido 1636, SEQ ID NO: 2 y Fig. 1) utilizando los oligonucleótidos We2508 y We2509 (SEQ ID NO: 15 y 16), obteniéndose el plásmido pF8-1211.

La mutagénesis orientada se aplicó conforme a protocolos estándar (QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) a fin de deleccionar la arginina en la posición 740 del plásmido pF8-1211. Para esto, se utilizaron los oligonucleótidos We2768 y We2769 (SEQ ID NO: 17 y 18) como cebadores mutagénicos. El plásmido de expresión resultante fue designado pF8-1413.

Una molécula de FVIII en la que el dominio B había sido reemplazado por la secuencia de aminoácidos RRGR se utilizó como el control de FVIII tipo salvaje, y el plásmido codificante se designó pF8-457.

Utilizando los protocolos y plásmidos descritos anteriormente y mediante la aplicación de métodos de biología molecular conocidos por los expertos en la técnica (y como se describe por ejemplo en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel FM et al (eds.), con inclusión del suplemento 80, de octubre 2007, John Wiley & Sons, Inc., <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>) pueden ser producidos otros constructos por los expertos con inserciones de una molécula HLEP en las posiciones descritas en la figura 2 y secuencias enlazadoras como se muestra ilustrativamente en las figuras 1b - e.

Ejemplo 2: Generación de vectores de expresión para moléculas FVIII con una región constante de inmunoglobulina reemplazando el dominio B de FVIII.

Se realizó la inserción de un dominio Fc de IgG en la molécula FVIII reemplazando la mayor parte del dominio B por analogía a los protocolos y referencias descritos anteriormente. El plásmido resultante se designó pF8-1518 y la proteína madura traducida a partir de éste se muestra en SEQ ID NO.19.

Dado que el reciclaje de IgG por el receptor Fc neonatal funciona sólo con el Fc dímero, se cotransfectó pF8-1518 en células HEK-293 con un plásmido codificante de una región de cadena pesada de inmunoglobulina G humana (p1335, SEQ ID NO. 20). La coexpresión de los plásmidos pF8-1518 y p1335 condujo a la expresión de una molécula FVIII funcional (tabla 1).

En otra serie de constructos, se expresaron por separado las cadenas pesada y ligera de FVIII. Para ello, se mutó pF8-1518 introduciendo un codón de parada en el propio extremo 3' de la secuencia de la cadena pesada de IgG. La expresión de dicho constructo (pF8-1515) condujo a una cadena pesada de FVIII (dominio A1 y A2) con unos pocos aminoácidos del dominio B seguidos por la cadena pesada de IgG (SEQ ID NO. 21). El constructo de la cadena ligera de FVIII estaba basado también en el plásmido pF8-1518 en el que las secuencias codificantes del dominio A1 y A2 fueron reemplazadas por un péptido señal. La expresión de dicho constructo (pF8-1517) condujo a una cadena ligera de FVIII con una cadena pesada de IgG unida a su término N (SEQ ID NO. 22). La coexpresión de los plásmidos pF8-1515 y pF8-1517 condujo a la expresión de una molécula de FVIII funcional (tabla 1).

Ejemplo 3: Transfección y expresión de mutantes de FVIII

Se cultivaron plásmidos de expresión en E. coli TOP10 (Invitrogen) y se purificaron mediante protocolos estándar (Qiagen). Se transfectaron células HEK-293 utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se cultivaron en medio exento de suero (Invitrogen 293 Express) en presencia de 4 µg/ml de puomicina y opcionalmente 0,5 UI/ml de vWF. Las poblaciones de células transfectadas se propagaron mediante matraces T en botellas rodantes o fermentadores de pequeña escala, a partir de los cuales se cosecharon los sobrenadantes para su purificación.

La Tabla 1 contiene los datos de expresión de varios constructos reseñados en las figuras 1 y 2 y descritos en los ejemplos 1 y 2. Salvo indicación en contrario, el HLEP utilizado es albúmina.

Tabla 1.

Constructo	Actividad [U/mL]	Antígeno [U/mL]	Ratio actividad/antígeno
Fig. 2 c*	1,0	7,3	0,14
Fig. 2d*	0,4	4,7	0,09
Fig. 2f	0,44	1,09	0,40
Fig. 2h	1,04	0,94	1,11
Fig. 2i	0,33	0,47	0,70
Fig. 2i (HLEP = Afamina)	0,31	1,01	0,31
Fig. 2i (HLEP = alfa-fetoproteína)	0,53	1,16	0,46
Fig. 2o	0,22	0,75	0,30
pF8-1518 + p1335 (HLEP = Fc)	1,19	1,78	0,67
pF8-1515 + pF8-1517 (HLEP = Fc)	1,75	6,68	0,26
* Los constructos que se representan en Fig. 2c y 2d no están de acuerdo con la invención.			

Ejemplo 4: Purificación de mutantes de Factor VIII

Al sobrenadante de expresión que contenía la molécula quimérica de Factor VIII se añadió una cantidad suficiente de una resina de inmuo-afinidad para fijar la actividad de FVIII casi por completo. La resina de inmuo-afinidad se había preparado por unión covalente de un MAb anti-FVIII apropiado a resina Sephacryl S1000 utilizada como soporte. Después del lavado de la resina, se utilizó la misma como relleno en una columna de cromatografía y se lavó una vez más. La elución se realizó utilizando un tampón que contenía CaCl₂ 250 mM y 50% de etilenglicol.

Se agruparon las fracciones de cromatografía de inmuo-afinidad (IAC) que contenían actividad de FVIII:C, se dializaron contra tampón de formulación (excipientes: cloruro de sodio, sacarosa, histidina, cloruro de calcio y Tween 80), y se concentraron. Las muestras se guardan congeladas o se liofilizan utilizando un ciclo de liofilización adecuado. La Tabla 2 muestra los resultados de una operación de purificación utilizando un mutante de FVIII (pF8-1211 de HEK-293) e IAC como paso de purificación principal.

Tabla 2

Muestra	Volumen (mL)	FVIII:C (UI/mL)	FVIII:Ag (UI/mL)	Proteína total* (mg/mL)	Actividad específica (UI/mg)	FVIII:C/VIII:Ag (UI/UI)
Sobrenadante	890	3,3	1,92	1,72	1,9	1,72
Eluato IAC	26	52,2	30,6	0,036	1450	1,71

* determinada por medición de la densidad óptica (OD) a 280 nm ($OD_{280, 1\%} = 10,0$)

Alternativamente, el sobrenadante de cultivo de células que contiene el FVIII se concentra/purifica por una primera cromatografía de intercambio iónico seguida de purificación ulterior por cromatografía de inmuno-afinidad (IAC). En este caso, el eluato de la cromatografía de intercambio iónico se carga en una columna IAC utilizando la resina arriba mencionada.

Ejemplo 5: Análisis de la actividad de Factor VIII quimérico y antígeno

Para determinación de la actividad de FVIII:C in vitro se utilizaron un ensayo de coagulación (v.g. reactivo Pathromtin SL y plasma deficiente en FVIII, suministrado por Dade Behring, Alemania) o un ensayo cromógeno (por ejemplo, el ensayo Coamatic FVIII:C suministrado por Haemochrom). Los ensayos se realizaron conforme a las instrucciones de los fabricantes.

El antígeno de FVIII (FVIII: Ag) se determinó por un ELISA cuya eficiencia es conocida por los expertos en la técnica. Resumidamente, se incubaron placas con 100 µl por pocillo del anticuerpo de captura (anti-IgG FVIII humana de oveja, Cedarlane CL20035K-C, diluida en ratio 1: 200 con Tampón A [Sigma C3041]) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces las placas con tampón B (Sigma P3563), diluciones seriadas de la muestra de test en tampón diluyente de muestras (Cedarlane) así como diluciones seriadas de una preparación de FVIII (ZLB Behring; 200-2 mU/mL) en tampón diluyente de muestras (volúmenes por pocillo: 100 µL) se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado con tampón B, se añadieron a cada pocillo 100 µl de una dilución 1:2 en tampón B del anticuerpo de detección (anti-IgG FVIII humana de oveja, Cedarlane CL20035K-D, marcada con peroxidasa) y se incubó una hora a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado con tampón B, se añadieron 100 µl de solución sustrato (1:10 (v/v) TMB OUVF: TMB tampón OUVG, Dade Behring) a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µl de solución de parada (Dade Behring, OSFA) preparó las muestras para la lectura en un lector de placas de microtitulación adecuado a una longitud de onda de 450 nm. Las concentraciones de las muestras de test se calcularon luego utilizando la curva estándar con la preparación de FVIII como referencia.

Ejemplo 6: Farmacocinética de los mutantes de Factor VIII en las ratas

Los mutantes de FVIII se administraron por vía intravenosa a ratas CD/Lewis narcotizadas (6 ratas por sustancia) con una dosis de 100 UI/kg de peso corporal. Se extrajeron muestras de sangre a intervalos apropiados a partir de 5 minutos después de la aplicación de las sustancias de test. El contenido de antígeno de FVIII se cuantificó posteriormente por un ensayo ELISA específico para Factor VIII humano o por un ELISA mixto específico para albúmina y FVIII, respectivamente (véase arriba). Los valores medios de los grupos de tratamiento se utilizaron para calcular la recuperación in vivo después de 5 minutos. Las vidas medias para cada proteína se calcularon utilizando los puntos temporales de la fase beta de eliminación conforme a la fórmula $t_{1/2} = \ln 2 / k$, en donde k es la pendiente de la línea de regresión. El resultado se representa en la Figura 3.

La vida media terminal calculada para los constructos FVIII-HA quiméricos entre 2 y 24 h era 4,97 h para 1413 y 6,86 h para 1211, y la vida media terminal calculada para FVIII tipo salvaje entre 2 y 8 h era 2,17 h. Por tanto, se demuestra un claro aumento de la vida media terminal para las moléculas FVIII-HA quiméricas, prolongando 2-3 veces la vida media de FVIII.

Las biodisponibilidades de los constructos quiméricos FVIII-HA y FVIII tipo salvaje se muestran en la tabla 3 que visualiza las biodisponibilidades superiores de las proteínas FVIII-HA de la invención.

Tabla 3: Recuperación in vivo aumentada de las proteínas FVIII-HA comparada con el FVIII tipo salvaje (Helixate)

	Recuperación in vivo [% de la proteína inyectada 5 minutos después de la aplicación i.v.]	Aumento de la recuperación in vivo comparada con Helixate® (FVIII tipo salvaje) [%]
1211	73,5	123,5
1413	87,7	147,8
Helixate	59,4	

Ejemplo 7: Vida media funcional de un mutante de Factor VIII en las ratas

El mutante de FVIII pF8-1211 (expresado en células HEK-293 y purificado por IAC), así como una preparación de control (FVIII tipo salvaje Helixate NexGen) se administraron por vía intravenosa a ratas CD / Lewis narcotizadas (6 ratas por sustancia) con una dosis de 100 UI/kg de peso corporal. Se extrajeron muestras de sangre a intervalos apropiados a partir de 5 minutos después de la aplicación de las sustancias de test. El contenido de antígeno de FVIII se cuantificó posteriormente para el grupo de control utilizando un ensayo ELISA específico para Factor VIII humano (véase ejemplo 4). Para medir la actividad FVIII:C del mutante de FVIII en plasma de rata se estableció un ensayo que determinaba específicamente la actividad del FVIII mutante. En principio, el FVIII mutante se unió desde la muestra de plasma de rata a una placa de microtitulación mediante un anticuerpo dirigido contra albúmina humana y la actividad de FVIII se determinó luego por un ensayo cromógeno de FVIII:C (Coatest VIII:C/4). Resumidamente, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con el anticuerpo de captura (Mab 3E8 anti-albúmina humana de ratón, diluido a 5 µg/mL en tampón carbonato/bicarbonato) durante una noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas con tampón de lavado (PBST = solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,05% Tween 20, Sigma P3563), se bloquearon las placas utilizando leche desnatada en PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se lavaron nuevamente con tampón de lavado seguido por tampón de dilución (Tris x HCl 50 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,2). Las muestras se aplicaron en un volumen de 40 µl por pocillo y se incubaron durante 1 h a 37°C. El lavado se realizó utilizando tampón de dilución que contenía CaCl₂ 300 mM seguido por tampón de dilución. La determinación de la actividad de FVIII:C se realizó utilizando reactivos Coatest VIII:C/4.

Se aplicaron a los pocillos 10 µl de tampón de dilución y 50 µl de reactivo de Coatest FIXa y FX y se incubaron durante 5 min a 37°C. Se añadieron luego 25 µl de solución de CaCl₂ y se incubó de nuevo durante 10 min a 37°C. Se añadieron 50 µl de solución sustrato y se incubaron ulteriormente durante 10 min a 37°C. Este paso fue seguido por la adición de 25 µl de solución de parada (ácido acético al 20%). Se utilizó un lector de placas de microtitulación para leer la absorbancia a 405 nm. Las concentraciones de FVIII:C de las muestras se calcularon utilizando una curva estándar preparada con el FVIII mutante pF8-1211 como referencia.

Los resultados del antígeno de FVIII:C o respectivamente FVIII de los grupos de tratamiento se utilizaron para calcular las vidas medias terminales de las proteínas correspondientes. La vida media funcional terminal calculada para el constructo quimérico de FVIII-HSA pF8-1211 entre 2 y 24 h era 4,44 h, y la vida media terminal del antígeno de FVIII calculada para el FVIII tipo salvaje entre 2 y 8 h era 2,75 h. Por tanto, se demostró un aumento claro de la vida media funcional de la actividad de FVIII:C para la molécula quimérica FVIII-HSA (aumento de 61% comparado con la vida media terminal de FVIII: Ag de FVIII tipo salvaje).

Ejemplo 8: Estabilidad in vitro de la proteína de inserción de albúmina FVIII

La Tabla 4 resume los resultados de un estudio de la expresión de una proteína de inserción de albúmina FVIII en cultivo de células exento de suero. Se transfectaron células HEK-293 por triplicado con pF8-1439 (inserción de albúmina FVIII) y pF8-457 (FVIII tipo salvaje), respectivamente, se sembraron en matraces T80 con números iguales de células y se cultivaron en ausencia de vWF estabilizador. El sobrenadante de cultivo se cosechó luego después de 96, 120 y 144 horas, y se ensayó respecto a actividad y contenido de antígeno de FVIII.

Tabla 4:

	Tiempo de cultivo [horas]	Antígeno de FVIII* [mU/mL]	SD**	Actividad de FVIII* [mU/mL]	SD**	Ratio actividad/antígeno
pF8-457 (FVIII tipo salvaje)	96	679,0	48,9	1056,7	135,8	1,6
pF8-1439 (albúmina de FVIII)	96	386,7	44,2	1060,0	115,3	2,7
pF8-457 (FVIII tipo salvaje)	120	819,3	23,2	1720,0	65,6	2,1
pF8-1439 (albúmina de FVIII)	120	389,3	74,9	1420,0	196,7	3,6
pF8-457 (FVIII tipo salvaje)	144	595,7	59,9	1236,7	388,0	2,1
pF8-1439 (albúmina de FVIII)	144	381,3	50,1	1583,3	226,8	4,2
* valor medio de experimentos triplicados; ** SD, desviación estándar						

Los resultados demuestran un efecto estabilizador de la albúmina cuando está presente como parte integral de la molécula FVIII en cultivo de células. La productividad no es necesariamente mayor en el caso de la proteína de inserción, pero la actividad específica de la proteína FVIII (expresada en la ratio actividad/antígeno) es significativamente mayor cuando la albúmina es una parte integral de la molécula FVIII (figura 3) comparada con el FVIII tipo salvaje.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> CSL Behring GmbH	
	<120> Factores de coagulación modificados con vida media in vivo prolongada	
5	<130> 2006_M007_A122	
	<150> EP 06026747.3	
	<151> 2006-12-22	
10	<150> US 60/879334	
	<151> 2007-01-09	
	<160> 49	
15	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 7056	
	<212> DNA	
20	<213> Homo Sapiens	
	<400> 1	
	atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
	accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
	ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180
	acctcagtcg tgtacaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240
	gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggctccta ccatccaggc tgaggtttat	300
	gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctgtt	360
	ggtgtatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg	420
	gagaaagaag atgataaagt ctccctcctg ggaagccata catatgtctg gcaggctcctg	480
	aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat	540
	gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa	600
	gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta	660
	tttgatgaag ggaaaagtg gcactcagaa acaaagaact ctttgatgca ggatagggat	720
	gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggctc	780
	ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgtgat tggaatgggc	840
	accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat	900
	cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
	gaccttggaac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa	1020
	gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
	gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggc caggtttgat	1140
	gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact	1200
	tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
25	cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320

ES 2 637 996 T3

aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cttttaagac tcgtgaagct	1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaggttg agacacactg	1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggatcact	1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
actaaatcag atcctcgggtg cctgaccctgc tattactcta gtttcgttaa tatggagaga	1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc ttagatcaa	1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag	1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg	1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt	1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc	1980
attggagcac agactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa	2040
atgggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc	2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagtgtg gacaagaaca ctgggtgatta ttacgaggac	2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc	2280
ttctcccaga attcaagaca ccctagcact aggcaaaagc aatttaatgc caccacaatt	2340
ccagaaaaatg acatagagaa gactgaccct tggtttgac acagaacacc tatgcctaaa	2400
atacaaaatg tctcctctag tgatttgttg atgctctgc gacagagtcc tactccacat	2460
gggctatcct tatctgatct ccaagaagcc aaatatgaga ctttttctga tgatccatca	2520
cctggagcaa tagacagtaa taacagcctg tctgaaatga cacacttcag gccacagctc	2580
catcacagtg gggacatggt atttaccctt gagtcaggcc tccaattaag attaaatgag	2640
aaactgggga caactgcagc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttctagtaca	2700
tcaaataatc tgatttcaac aattccatca gacaatttg cagcaggtac tgataataca	2760
agttccttag gacccccaag tatgccagtt cattatgata gtcaattaga taccactcta	2820
tttggaacaa agtcatctcc ctttactgag tctgggtggc ctctgagctt gagtgaagaa	2880
aataatgatt caaagttggt agaatcaggt ttaatgaata gccaaagaaag ttcattggga	2940
aaaaatgtat cgtcaacaga gagtggtagg ttattttaaag ggaaaagagc tcatggacct	3000
gctttgttga ctaaagataa tgccttattc aaagtttaga tctctttggt aaagacaaac	3060
aaaacttcca ataattcagc aactaataga aagactcaca ttgatggccc atcattatta	3120
attgagaata gtccatcagt ctggcaaaat atattagaaa gtgacactga gtttaaaaaa	3180
gtgacacctt tgattcatga cagaatgctt atggacaaaa atgctacagc tttgaggcta	3240
aatcatatgt caaataaaac tacttcatca aaaaacatgg aaatggtcca acagaaaaaa	3300
gagggcccca ttccaccaga tgcacaaaat ccagatatgt cgttctttta gatgctattc	3360

ES 2 637 996 T3

ttgccagaat cagcaaggtg gatacaaagg actcatggaa agaactctct gaactctggg	3420
caaggcccca gtccaaagca attagtatcc ttaggaccag aaaaatctgt ggaaggtcag	3480
aatttcttgt ctgagaaaaa caaagtggta gtaggaaagg gtgaatttac aaaggacgta	3540
ggactcaaag agatggtttt tccaagcagc agaaacctat ttcttactaa cttggataat	3600
ttacatgaaa ataatacaca caatcaagaa aaaaaaattc aggaagaaat agaaaagaag	3660
gaaacattaa tccaagagaa tgtagttttg cctcagatac atacagtgcac tggcactaag	3720
aatttcatga agaacccttt cttactgagc actaggcaaa atgtagaagg ttcatatgac	3780
ggggcatatg ctccagtact tcaagatttt aggtcattaa atgattcaac aaatagaaca	3840
aagaaacaca cagctcattt ctcaaaaaa ggggaggaag aaaacttgga aggccttgga	3900
aatcaaacca agcaaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatatt tcctaataca	3960
agccagcaga attttgtcac gcaacgtagt aagagagctt tgaacaatt cagactccca	4020
ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acacctcaac ccagtgggcc	4080
aaaaacatga aacatttgac cccgagcacc ctcacacaga tagactacaa tgagaaggag	4140
aaaggggcca ttactcagtc tcccttatca gattgcctta cgaggagtca tagcatccct	4200
caagcaaaata gatctccatt acccattgca aaggtatcat catttccatc tattagacct	4260
atatatctga ccagggtcct attccaagac aactcttctc atcttcagc agcatcttat	4320
agaaagaaag attctggggt ccaagaaagc agtcatttct tacaaggagc caaaaaaat	4380
aacctttctt tagccattct aaccttgag atgactggtg atcaaagaga ggttggtcc	4440
ctggggacaa gtgccacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctccc	4500
aaaccagact tgcccaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaaagt tcacatttat	4560
cagaaggacc tattccctac ggaactagc aatgggtctc ctggccatct ggatctctgt	4620
gaaggagacc ttcttcaggg aacagaggga gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct	4680
ggaaaagttc ctttctgag agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta	4740
ttggatcttc ttgcttggga taaccactat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa	4800
tccaagaga agtcaccaga aaaaacagct ttaagaaaa aggataccat tttgtccctg	4860
aacgcttggtg aaagcaatca tgcaatagca gcaataaatg agggacaaaa taagcccga	4920
atagaagtca cctgggcaaa gcaaggtagg actgaaaggc tgtgctctca aaaccacca	4980
gtcttgaac gccatcaacg ggaataaact cgtactactc ttcagtcaga tcaagaggaa	5040
attgactatg atgataccat atcagttgaa atgaagaagg aagattttga catttatgat	5100
gaggatgaaa atcagagccc ccgagcttt caaaagaaaa cacgacacta ttttattgct	5160
gcagtggaga ggctctggga ttatgggatg agtagctccc cacatgttct aagaaacagg	5220
gctcagagtg gcagtgtccc tcagttcaag aaagttgttt tccaggaatt tactgatggc	5280
tcctttactc agcccttata ccgtggagaa ctaaataaac atttgggact cctggggcca	5340
tatataagag cagaagttga agataatatc atggtaactt tcagaaatca ggctctctgt	5400

ES 2 637 996 T3

```

ccctattcct tctattctag ccttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa 5460
cctagaaaaa accttgtaa gcctaataaa accaaaactt acctttggaa agtgcaacat 5520
catatggcac cactaaaga tgagtttgac tgcaaaagcct gggcttattt ctctgatgtt 5580
gacctggaaa aagatgtgca ctcaggcctg attggacccc ttctgggtctg ccacactaac 5640
aactgaacc ctgctcatgg gagacaagtg acagtacagg aatttgctct gtttttcacc 5700
atctttgatg agacaaaaa ctggtacttc actgaaaata tggaaagaaa ctgcagggtt 5760
ccctgcaata tccagatgga agatccact tttaaagaga attatcgctt ccatgcaatc 5820
aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctcaggatca aaggattcga 5880
tggtatctgc tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat 5940
gtgttcactg tacgaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccaggt 6000
gtttttgaga cagtggaaat gttaccatcc aaagctggaa tttggcgggt ggaatgcctt 6060
attggcgagc atctacatgc tgggatgagc acactttttc tgggttacag caataagtgt 6120
cagactcccc tgggaatggc ttctggacac attagagatt ttcagattac agcttcagga 6180
caatatggac agtgggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc 6240
tggagcacca aggagccctt ttcttgatc aaggtggatc tgttggcacc aatgattatt 6300
cacggcatca agaccaggg tgcccgtagc aagtcttcca gcctctacat ctctcagttt 6360
atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt atcagagaaa ttccactgga 6420
accttaatgg tcttctttgg caatgtggat tcatctggga taaaacacaa tatttttaac 6480
cctccaatta ttgctcgata catccgtttg caccacaactc attatagcat tcgcagcact 6540
cttcgcatgg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaatggag 6600
agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcacatc actttaccaa tatgtttgcc 6660
acctggtctc ctcaaaaagc tcgacttcac ctccaaggga ggagtaatgc ctggagacct 6720
caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca 6780
ggagtaacta ctcaggaggt aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttcctc 6840
atctccagca gtcaagatgg ccatcagtgg actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag 6900
gtttttcagg gaaatcaaga ctcttcaca cctgtggtga actctctaga cccaccgtta 6960
ctgactcgct accttcgaat tcacccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg 7020
gaggttctgg gctgcgaggc acaggacctc tactga 7056

```

<210> 2

<211> 2332

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

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

ES 2 637 996 T3

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

ES 2 637 996 T3

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

ES 2 637 996 T3

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 Arg Ser Thr Arg
 740 745 750
 Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
 755 760 765
 Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
 770 775 780
 Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
 785 790 795 800
 His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
 805 810 815
 Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
 820 825 830

ES 2 637 996 T3

Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
 835 840 845
 Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
 850 855 860
 Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
 865 870 875 880
 Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
 885 890 895
 Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
 900 905 910
 Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
 915 920 925
 Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
 930 935 940
 Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
 945 950 955 960
 Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys
 965 970 975
 Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
 980 985 990
 Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
 995 1000 1005
 Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
 1010 1015 1020
 Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
 1025 1030 1035
 Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
 1040 1045 1050
 Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
 1055 1060 1065
 Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
 1070 1075 1080
 Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
 1085 1090 1095

ES 2 637 996 T3

Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His
1100 1105 1110

Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
1115 1120 1125

Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe
1130 1135 1140

Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr
1145 1150 1155

Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn
1160 1165 1170

Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His
1175 1180 1185

Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr
1190 1195 1200

Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr
1205 1210 1215

Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg
1220 1225 1230

Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu
1235 1240 1245

Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys
1250 1255 1260

His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu
1265 1270 1275

Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys
1280 1285 1290

Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr
1295 1300 1305

Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu
1310 1315 1320

Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr
1325 1330 1335

Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr
1340 1345 1350

ES 2 637 996 T3

Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser
 1355 1360 1365
 Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala
 1370 1375 1380
 Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser
 1385 1390 1395
 Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser
 1400 1405 1410
 Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val
 1415 1420 1425
 Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu
 1430 1435 1440
 Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu
 1445 1450 1455
 Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys
 1460 1465 1470
 Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr
 1475 1480 1485
 Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys
 1490 1495 1500
 Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu
 1505 1510 1515
 Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile
 1520 1525 1530
 Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg
 1535 1540 1545
 Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp
 1550 1555 1560
 Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu
 1565 1570 1575
 Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys
 1580 1585 1590
 Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His
 1595 1600 1605

ES 2 637 996 T3

Ala Ile 1610 Ala Ala Ile Asn Glu 1615 Gly Gln Asn Lys Pro 1620 Glu Ile Glu
 Val Thr 1625 Trp Ala Lys Gln Gly 1630 Arg Thr Glu Arg Leu 1635 Cys Ser Gln
 Asn Pro 1640 Pro Val Leu Lys Arg 1645 His Gln Arg Glu Ile 1650 Thr Arg Thr
 Thr Leu 1655 Gln Ser Asp Gln Glu 1660 Glu Ile Asp Tyr Asp 1665 Asp Thr Ile
 Ser Val 1670 Glu Met Lys Lys Glu 1675 Asp Phe Asp Ile Tyr 1680 Asp Glu Asp
 Glu Asn 1685 Gln Ser Pro Arg Ser 1690 Phe Gln Lys Lys Thr 1695 Arg His Tyr
 Phe Ile 1700 Ala Ala Val Glu Arg 1705 Leu Trp Asp Tyr Gly 1710 Met Ser Ser
 Ser Pro 1715 His Val Leu Arg Asn 1720 Arg Ala Gln Ser Gly 1725 Ser Val Pro
 Gln Phe 1730 Lys Lys Val Val Phe 1735 Gln Glu Phe Thr Asp 1740 Gly Ser Phe
 Thr Gln 1745 Pro Leu Tyr Arg Gly 1750 Glu Leu Asn Glu His 1755 Leu Gly Leu
 Leu Gly 1760 Pro Tyr Ile Arg Ala 1765 Glu Val Glu Asp Asn 1770 Ile Met Val
 Thr Phe 1775 Arg Asn Gln Ala Ser 1780 Arg Pro Tyr Ser Phe 1785 Tyr Ser Ser
 Leu Ile 1790 Ser Tyr Glu Glu Asp 1795 Gln Arg Gln Gly Ala 1800 Glu Pro Arg
 Lys Asn 1805 Phe Val Lys Pro Asn 1810 Glu Thr Lys Thr Tyr 1815 Phe Trp Lys
 Val Gln 1820 His His Met Ala Pro 1825 Thr Lys Asp Glu Phe 1830 Asp Cys Lys
 Ala Trp 1835 Ala Tyr Phe Ser Asp 1840 Val Asp Leu Glu Lys 1845 Asp Val His
 Ser Gly 1850 Leu Ile Gly Pro Leu 1855 Leu Val Cys His Thr 1860 Asn Thr Leu

ES 2 637 996 T3

Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu
 1865 1870 1875
 Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
 1880 1885 1890
 Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu
 1895 1900 1905
 Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly
 1910 1915 1920
 Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln
 1925 1930 1935
 Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile
 1940 1945 1950
 His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys
 1955 1960 1965
 Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe
 1970 1975 1980
 Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val
 1985 1990 1995
 Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu
 2000 2005 2010
 Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala
 2015 2020 2025
 Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr
 2030 2035 2040
 Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser
 2045 2050 2055
 Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val
 2060 2065 2070
 Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly
 2075 2080 2085
 Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile
 2090 2095 2100
 Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn
 2105 2110 2115

ES 2 637 996 T3

Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser
 2120 2125 2130

Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr
 2135 2140 2145

Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
 2150 2155 2160

Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu
 2165 2170 2175

Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser
 2180 2185 2190

Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala
 2195 2200 2205

Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val
 2210 2215 2220

Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met
 2225 2230 2235

Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
 2240 2245 2250

Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly
 2255 2260 2265

His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
 2270 2275 2280

Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp
 2285 2290 2295

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
 2300 2305 2310

Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
 2315 2320 2325

Gln Asp Leu Tyr
 2330

<210> 3
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 3

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu

ES 2 637 996 T3

1	5	10	15
Glu Asn Phe	Lys Ala Leu Val	Leu Ile Ala Phe Ala Gln	Tyr Leu Gln
	20	25	30
Gln Cys Pro	Phe Glu Asp His	Val Lys Leu Val	Asn Glu Val Thr Glu
	35	40	45
Phe Ala Lys	Thr Cys Val	Ala Asp Glu Ser Ala	Glu Asn Cys Asp Lys
	50	55	60
Ser Leu His	Thr Leu Phe	Gly Asp Lys Leu	Cys Thr Val Ala Thr Leu
	65	70	75
Arg Glu Thr	Tyr Gly Glu Met	Ala Asp Cys Cys Ala	Lys Gln Glu Pro
	85	90	95
Glu Arg Asn	Glu Cys Phe Leu	Gln His Lys Asp Asp	Asn Pro Asn Leu
	100	105	110
Pro Arg Leu	Val Arg Pro Glu	Val Asp Val Met Cys	Thr Ala Phe His
	115	120	125
Asp Asn Glu	Glu Thr Phe Leu	Lys Lys Tyr Leu	Tyr Glu Ile Ala Arg
	130	135	140
Arg His Pro	Tyr Phe Tyr Ala	Pro Glu Leu Leu	Phe Phe Ala Lys Arg
	145	150	155
Tyr Lys Ala	Ala Phe Thr Glu	Cys Cys Gln Ala	Ala Asp Lys Ala Ala
	165	170	175
Cys Leu Leu	Pro Lys Leu Asp	Glu Leu Arg Asp	Glu Gly Lys Ala Ser
	180	185	190
Ser Ala Lys	Gln Arg Leu Lys	Cys Ala Ser Leu	Gln Lys Phe Gly Glu
	195	200	205
Arg Ala Phe	Lys Ala Trp Ala	Val Ala Arg Leu	Ser Gln Arg Phe Pro
	210	215	220
Lys Ala Glu	Phe Ala Glu Val	Ser Lys Leu Val	Thr Asp Leu Thr Lys
	225	230	235
Val His Thr	Glu Cys Cys His	Gly Asp Leu Leu	Glu Cys Ala Asp Asp
	245	250	255
Arg Ala Asp	Leu Ala Lys Tyr	Ile Cys Glu Asn	Gln Asp Ser Ile Ser
	260	265	270
Ser Lys Leu	Lys Glu Cys Cys	Glu Lys Pro Leu	Leu Glu Lys Ser His

ES 2 637 996 T3

275	280	285
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser 290 295 300		
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala 305 310 315 320		
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg 325 330 335		
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr 340 345 350		
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu 355 360 365		
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro 370 375 380		
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu 385 390 395 400		
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro 405 410 415		
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys 420 425 430		
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys 435 440 445		
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His 450 455 460		
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser 465 470 475 480		
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr 485 490 495		
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp 500 505 510		
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala 515 520 525		
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu 530 535 540		
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		

545 550 555 560

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

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 4
5 <211> 2043
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos de FVIII humano maduro con reemplazamiento del dominio B por albúmina humana

<400> 4

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

15

ES 2 637 996 T3

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
 225 230 240
 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

ES 2 637 996 T3

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

ES 2 637 996 T3

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Arg Ser Thr Arg
 740 745 750
 Gln Lys Gln Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp
 755 760 765
 Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln
 770 775 780
 Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu
 785 790 795 800
 Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn
 805 810 815
 Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val
 820 825 830
 Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys
 835 840 845
 Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn
 850 855 860
 Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr
 865 870 875 880
 Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu
 885 890 895
 Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe
 900 905 910
 Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp
 915 920 925
 Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly
 930 935 940
 Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys
 945 950 955 960
 Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln
 965 970 975
 Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp
 980 985 990
 Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys
 995 1000 1005

ES 2 637 996 T3

Ala Asp 1010 Asp Arg Ala Asp Leu 1015 Ala Lys Tyr Ile Cys 1020 Glu Asn Gln
 Asp Ser 1025 Ile Ser Ser Lys Leu 1030 Lys Glu Cys Cys Glu 1035 Lys Pro Leu
 Leu Glu 1040 Lys Ser His Cys Ile 1045 Ala Glu Val Glu Asn 1050 Asp Glu Met
 Pro Ala 1055 Asp Leu Pro Ser Leu 1060 Ala Ala Asp Phe Val 1065 Glu Ser Lys
 Asp Val 1070 Cys Lys Asn Tyr Ala 1075 Glu Ala Lys Asp Val 1080 Phe Leu Gly
 Met Phe 1085 Leu Tyr Glu Tyr Ala 1090 Arg Arg His Pro Asp 1095 Tyr Ser Val
 Val Leu 1100 Leu Leu Arg Leu Ala 1105 Lys Thr Tyr Glu Thr 1110 Thr Leu Glu
 Lys Cys 1115 Cys Ala Ala Ala Asp 1120 Pro His Glu Cys Tyr 1125 Ala Lys Val
 Phe Asp 1130 Glu Phe Lys Pro Leu 1135 Val Glu Glu Pro Gln 1140 Asn Leu Ile
 Lys Gln 1145 Asn Cys Glu Leu Phe 1150 Glu Gln Leu Gly Glu 1155 Tyr Lys Phe
 Gln Asn 1160 Ala Leu Leu Val Arg 1165 Tyr Thr Lys Lys Val 1170 Pro Gln Val
 Ser Thr 1175 Pro Thr Leu Val Glu 1180 Val Ser Arg Asn Leu 1185 Gly Lys Val
 Gly Ser 1190 Lys Cys Cys Lys His 1195 Pro Glu Ala Lys Arg 1200 Met Pro Cys
 Ala Glu 1205 Asp Tyr Leu Ser Val 1210 Val Leu Asn Gln Leu 1215 Cys Val Leu
 His Glu 1220 Lys Thr Pro Val Ser 1225 Asp Arg Val Thr Lys 1230 Cys Cys Thr
 Glu Ser 1235 Leu Val Asn Arg Arg 1240 Pro Cys Phe Ser Ala 1245 Leu Glu Val
 Asp Glu 1250 Thr Tyr Val Pro Lys 1255 Glu Phe Asn Ala Glu 1260 Thr Phe Thr

ES 2 637 996 T3

Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
 1265 1270 1275
 Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
 1280 1285 1290
 Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
 1295 1300 1305
 Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 1310 1315 1320
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu
 1325 1330 1335
 Gly Leu Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val
 1340 1345 1350
 Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser
 1355 1360 1365
 Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met
 1370 1375 1380
 Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser
 1385 1390 1395
 Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala
 1400 1405 1410
 Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val
 1415 1420 1425
 Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys
 1430 1435 1440
 Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu
 1445 1450 1455
 Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr
 1460 1465 1470
 Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn
 1475 1480 1485
 Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr
 1490 1495 1500
 Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val
 1505 1510 1515

ES 2 637 996 T3

Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His
 1520 1525 1530
 Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr
 1535 1540 1545
 Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile
 1550 1555 1560
 Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His
 1565 1570 1575
 Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile
 1580 1585 1590
 Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg
 1595 1600 1605
 Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe
 1610 1615 1620
 Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp
 1625 1630 1635
 Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp
 1640 1645 1650
 Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His
 1655 1660 1665
 Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys
 1670 1675 1680
 Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu
 1685 1690 1695
 Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile
 1700 1705 1710
 Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr
 1715 1720 1725
 Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile
 1730 1735 1740
 Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala
 1745 1750 1755
 Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp
 1760 1765 1770

ES 2 637 996 T3

Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala
 1775 1780 1785
 Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys
 1790 1795 1800
 Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu
 1805 1810 1815
 Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr
 1820 1825 1830
 Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His
 1835 1840 1845
 Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His
 1850 1855 1860
 Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met
 1865 1870 1875
 Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser
 1880 1885 1890
 Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr
 1895 1900 1905
 Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu
 1910 1915 1920
 Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys
 1925 1930 1935
 Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly
 1940 1945 1950
 Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val
 1955 1960 1965
 Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr
 1970 1975 1980
 Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln
 1985 1990 1995
 Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu
 2000 2005 2010
 Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile
 2015 2020 2025
 Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 2030 2035 2040

5 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 5
 10 cagcttgagg atccagagtt c 21
 <210> 6
 <211> 30
 15 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 6
 gtgaccggtc tttgcctag tgctagggtg 30
 <210> 7
 25 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador
 <400> 7
 gtgaccggta ggactgaaag gctgtg 26
 35 <210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador
 <400> 8
 45 gattgatccg gaataatgaa gtc 23
 <210> 9
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 9
 55 gcgaaccggt caggatgcac acaagagtga gggt 34
 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 60

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5
 <400> 10
 cgcaccggtt aagcctaagg cagcttgact 30
 <210> 11
 10 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 11
 ctagcactag gcaaaagcag gatgcacac 29
 20 <210> 12
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 12
 30 gtgtgcatcc tgctttgcc tagtgctag 29
 <210> 13
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 13
 40 ctgccttagg ctaggtagg actgaaagg 29
 <210> 14
 <211> 29
 <212> DNA
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 14
 cctttcagtc ctacctaagc ctaaggcag 29
 <210> 15
 <211> 33
 55 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 60

<223> Cebador
 <400> 15
 5 ggactgaaag gctgtcctct caaaaccac cag 33
 <210> 16
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 16
 15 ctggtgggtt ttgagaggac agccttcag tcc 33
 <210> 17
 <211> 36
 <212> DNA
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 17
 25 caatgccatt gaaccaagct tctcccagaa ttcaag 36
 <210> 18
 <211> 36
 30 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 35 <400> 18
 ctggaattct gggagaagct tggttcaatg gcattg 36
 <210> 19
 40 <211> 1671
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> FVIII con albúmina humana reemplazando parte del dominio B
 <400> 19
 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
 50

ES 2 637 996 T3

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

ES 2 637 996 T3

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

ES 2 637 996 T3

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 Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg Gln
 740 745 750
 Lys Gln Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 755 760 765
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 770 775 780
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 785 790 795 800
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 805 810 815
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 820 825 830
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 835 840 845
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 850 855 860
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 865 870 875 880
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Val Thr Lys Asn Gln Val
 885 890 895

ES 2 637 996 T3

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 900 905 910
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 915 920 925
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 930 935 940
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 945 950 955 960
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Ser
 965 970 975
 Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr
 980 985 990
 Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser
 995 1000 1005
 Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu
 1010 1015 1020
 Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe
 1025 1030 1035
 Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser
 1040 1045 1050
 Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln
 1055 1060 1065
 Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr
 1070 1075 1080
 Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu
 1085 1090 1095
 Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr
 1100 1105 1110
 Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu
 1115 1120 1125
 Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys
 1130 1135 1140
 Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
 1145 1150 1155

ES 2 637 996 T3

Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala
 1160 1165 1170
 Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser
 1175 1180 1185
 Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn
 1190 1195 1200
 Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe
 1205 1210 1215
 Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn
 1220 1225 1230
 Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp
 1235 1240 1245
 Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr
 1250 1255 1260
 Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg
 1265 1270 1275
 Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His
 1280 1285 1290
 Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu
 1295 1300 1305
 Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu
 1310 1315 1320
 Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu
 1325 1330 1335
 Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe
 1340 1345 1350
 Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser
 1355 1360 1365
 Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly
 1370 1375 1380
 Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile
 1385 1390 1395
 Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp
 1400 1405 1410

ES 2 637 996 T3

Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala
 1415 1420 1425
 Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met
 1430 1435 1440
 Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser
 1445 1450 1455
 Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly
 1460 1465 1470
 Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile
 1475 1480 1485
 Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met
 1490 1495 1500
 Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly
 1505 1510 1515
 Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser
 1520 1525 1530
 Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg
 1535 1540 1545
 Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn
 1550 1555 1560
 Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys
 1565 1570 1575
 Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser
 1580 1585 1590
 Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His
 1595 1600 1605
 Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln
 1610 1615 1620
 Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro
 1625 1630 1635
 Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val
 1640 1645 1650
 His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln
 1655 1660 1665

ES 2 637 996 T3

Asp Leu Tyr
1670

<210> 20
<211> 240
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de una región de cadena pesada de inmunoglobulina G humana (240 aminoácidos: 1-19 péptido señal de IgG humana, 20-35 región bisagra de IgG humana y 36-240 cadena pesada de IgG humana)

<400> 20

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
20 25 30

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
35 40 45

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
50 55 60

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
65 70 75 80

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
85 90 95

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
100 105 110

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
115 120 125

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
130 135 140

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Val Thr Lys Asn Gln
145 150 155 160

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
165 170 175

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
180 185 190

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
195 200 205

ES 2 637 996 T3

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
210 215 220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
225 230 235 240

<210> 21

5 <211> 975

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cadena pesada de FVIII humana madura con reemplazamiento parcial del dominio B por región de cadena pesada de inmunoglobulina G humana

<400> 21

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

15

ES 2 637 996 T3

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

ES 2 637 996 T3

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

ES 2 637 996 T3

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

Lys Gln Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
755 760 765

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
770 775 780

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
785 790 795 800

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
805 810 815

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
820 825 830

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
835 840 845

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
850 855 860

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
865 870 875 880

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Val Thr Lys Asn Gln Val
885 890 895

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
900 905 910

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
915 920 925

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
930 935 940

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
945 950 955 960

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
965 970 975

<210> 22

<211> 917

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de FVIII humano maduro unida a la región de cadena pesada de inmunoglobulina G humana

10

ES 2 637 996 T3

<400> 22

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
1 5 10 15

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
20 25 30

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
35 40 45

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
50 55 60

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
65 70 75 80

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
85 90 95

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
100 105 110

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
115 120 125

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Val Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
130 135 140

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
145 150 155 160

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
165 170 175

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
180 185 190

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
195 200 205

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Ser Gln Asn
210 215 220

Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
225 230 235 240

Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu
245 250 255

ES 2 637 996 T3

Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser
 260 265 270
 Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val
 275 280 285
 Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg
 290 295 300
 Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe
 305 310 315 320
 Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu
 325 330 335
 Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val
 340 345 350
 Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr
 355 360 365
 Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly
 370 375 380
 Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr
 385 390 395 400
 Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp
 405 410 415
 Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val
 420 425 430
 His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu
 435 440 445
 Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe
 450 455 460
 Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met
 465 470 475 480
 Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr
 485 490 495
 Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp
 500 505 510
 Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
 515 520 525

ES 2 637 996 T3

Leu 530 Leu Ser Met Gly Ser Asn 535 Glu Asn Ile His Ser 540 Ile His Phe Ser
 Gly 545 His Val Phe Thr Val 550 Arg Lys Lys Glu 555 Glu Tyr Lys Met Ala Leu 560
 Tyr Asn Leu Tyr Pro 565 Gly Val Phe Glu 570 Thr Val Glu Met Leu Pro 575 Ser
 Lys Ala Gly Ile 580 Trp Arg Val Glu 585 Cys Leu Ile Gly Glu 590 His Leu His
 Ala Gly Met 595 Ser Thr Leu Phe Leu 600 Val Tyr Ser Asn Lys 605 Cys Gln Thr
 Pro Leu 610 Gly Met Ala Ser Gly 615 His Ile Arg Asp Phe 620 Gln Ile Thr Ala
 Ser 625 Gly Gln Tyr Gly 630 Gln Trp Ala Pro Lys Leu 635 Ala Arg Leu His Tyr 640
 Ser Gly Ser Ile Asn 645 Ala Trp Ser Thr Lys 650 Glu Pro Phe Ser Trp 655 Ile
 Lys Val Asp Leu 660 Leu Ala Pro Met Ile 665 Ile His Gly Ile Lys 670 Thr Gln
 Gly Ala Arg 675 Gln Lys Phe Ser Ser 680 Leu Tyr Ile Ser Gln 685 Phe Ile Ile
 Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys 695 Lys Trp Gln Thr Tyr 700 Arg Gly Asn Ser
 Thr 705 Gly Thr Leu Met Val 710 Phe Phe Gly Asn Val 715 Asp Ser Ser Gly Ile 720
 Lys His Asn Ile Phe 725 Asn Pro Pro Ile 730 Ala Arg Tyr Ile Arg 735 Leu
 His Pro Thr His 740 Tyr Ser Ile Arg Ser 745 Thr Leu Arg Met Glu 750 Leu Met
 Gly Cys Asp 755 Leu Asn Ser Cys Ser 760 Met Pro Leu Gly Met 765 Glu Ser Lys
 Ala Ile 770 Ser Asp Ala Gln Ile 775 Thr Ala Ser Ser Tyr 780 Phe Thr Asn Met
 Phe 785 Ala Thr Trp Ser Pro 790 Ser Lys Ala Arg Leu 795 His Leu Gln Gly Arg 800

ES 2 637 996 T3

Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln
805 810 815

Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly
820 825 830

Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser
835 840 845

Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys
850 855 860

Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn
865 870 875 880

Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln
885 890 895

Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu
900 905 910

Ala Gln Asp Leu Tyr
915

5 <210> 23
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Enlazador

<400> 23

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

Thr Arg Gln Lys Gln Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

15 <210> 24
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Enlazador

<400> 24

ES 2 637 996 T3

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

Ser Thr Arg Gln Lys Gln Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

5 <210> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Enlazador

<400> 25

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

Ser Thr Arg Gln Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

15 <210> 26
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Enlazador

25 <400> 26

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

Ser Thr Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25

<210> 27
<211> 25
30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

35 <400> 27

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

Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25

ES 2 637 996 T3

<210> 28
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 28
 10
 Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Asp Ala His
 1 5 10 15
 Lys Ser Glu Val Ala His Arg
 20
 15
 <210> 29
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 29
 Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Asp Ala His Lys Ser Glu
 1 5 10 15
 Val Ala His Arg
 20
 25
 <210> 30
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 30
 35
 Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
 20 25 30
 40
 <210> 31
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 45

ES 2 637 996 T3

<400> 31

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
1 5 10 15

Trp Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25

5 <210> 32
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Enlazador

<400> 32

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr
1 5 10 15

Phe Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25

15 <210> 33
<211> 21
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

25 <400> 33

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ala Val Gly Gly Asp Ala His Lys Ser
1 5 10 15

Glu Val Ala His Arg
20

30 <210> 34
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Enlazador
<400> 34

ES 2 637 996 T3

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

Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr
20 25 30

Arg Thr Thr Leu
35

5 <210> 35
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Enlazador

<400> 35

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

Ser Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr
20 25 30

Arg Thr Thr Leu
35

15 <210> 36
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Enlazador

<400> 36

25

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

Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr
20 25 30

Thr Leu

30 <210> 37
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

35 <400> 37

ES 2 637 996 T3

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

Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr
20 25 30

Thr Leu

5 <210> 38
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Enlazador

<400> 38

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

Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
20 25 30

15 <210> 39
<211> 31
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

25 <400> 39

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

Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
20 25 30

30 <210> 40
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> Enlazador

<400> 40

ES 2 637 996 T3

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

Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
20 25

5 <210> 41
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Enlazador

<400> 41

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

Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
20

15 <210> 42
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Enlazador

<400> 42

Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Arg His Gln Arg Glu Ile
1 5 10 15

Thr Arg Thr Thr Leu
20

30 <210> 43
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

35 <400> 43

ES 2 637 996 T3

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

Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Arg Arg Glu Ile Thr
20 25 30

Arg Thr Thr Leu
35

- 5 <210> 44
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Enlazador
- <400> 44

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

Leu Lys Arg His Arg Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
20 25

- 15 <210> 45
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial
- 20 <220>
<223> Enlazador
- 25 <400> 45

Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Arg His Arg Arg Glu Ile
1 5 10 15

Thr Arg Thr Thr Leu
20

- 30 <210> 46
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial
- 35 <220>
<223> Enlazador
- <400> 46

ES 2 637 996 T3

val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg His Arg Arg Glu Ile Thr
20 25 30

Arg Thr Thr Leu
35

5 <210> 47
<211> 33
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Enlazador

<400> 47

val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg His Arg Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr
20 25 30

Leu

15 <210> 48
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Enlazador

<400> 48

25 val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5 10 15

Arg His Arg Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
20 25

30 <210> 49
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Enlazador

<400> 49

ES 2 637 996 T3

Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5 10 15

Arg His Arg Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
20 25

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un factor de coagulación modificado que tiene, en una región interna entre el aminoácido N-terminal y el aminoácido C-terminal del polipéptido de traducción primario del factor de coagulación una inserción de un polipéptido aumentador de la vida media (HLEP), en donde el factor de coagulación es FVIII, y en donde la inserción del HLEP está dentro del dominio B de FVIII, y en donde el HLEP se selecciona del grupo constituido por las proteínas de la familia de las albúminas, albúmina, afamina, alfa-fetoproteína y la proteína de unión de la vitamina D, y porciones de una región constante de inmunoglobulina de las inmunoglobulinas.
- 10 2. El factor de coagulación modificado de la reivindicación 1, **caracterizado por que** el factor de coagulación modificado tiene una vida media funcional prolongada comparada con la vida media funcional del factor de la coagulación que carece de dicha inserción.
- 15 3. El factor de coagulación modificado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado por que** el factor de coagulación modificado tiene una vida media prolongada del antígeno del factor de coagulación comparada con la vida media del antígeno del factor de coagulación que carece de dicha inserción.
- 20 4. El factor de coagulación modificado conforme a las reivindicaciones 1 y 2, que tiene una vida media funcional aumentada en al menos 25% comparada con la vida media funcional de dicho factor de coagulación que carece de dicha inserción de un HLEP.
- 25 5. El factor de coagulación modificado conforme a la reivindicación 3, que tiene una vida media del antígeno del factor de coagulación aumentada en al menos 25% comparada con la vida media funcional de dicho factor de la coagulación que carece de dicha inserción de un HLEP.
- 30 6. El factor de coagulación modificado conforme a las reivindicaciones 1 a 5 en donde el factor de coagulación se separa del HLEP durante la activación endógena in vivo por escisión proteolítica.
- 35 7. El factor de coagulación modificado de la reivindicación 1, **caracterizado por que** el factor de coagulación modificado tiene una recuperación in vivo mejorada comparada con la recuperación in vivo del factor de la coagulación que carece de dicha inserción.
- 40 8. El factor de coagulación modificado conforme a la reivindicación 7, que tiene una recuperación in vivo del factor de la coagulación aumentada en al menos 10% comparada con la recuperación in vivo de dicho factor de la coagulación que carece de dicha inserción de un HLEP.
- 45 9. El factor de coagulación modificado conforme a las reivindicaciones 1 a 8, que tiene una estabilidad aumentada en medios de cultivo exentos de suero y/o en medios de cultivo exentos de proteínas animales, comparado con el factor de coagulación que carece de dicha inserción.
- 50 10. El factor de coagulación modificado conforme a cualquier reivindicación anterior, en donde más del 75% del dominio B está delecionado o reemplazado por péptidos enlazadores.
- 55 11. El factor de coagulación modificado conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene al menos 10% de la actividad biológica del factor de la coagulación que carece de dicha inserción.
- 60 12. El factor de coagulación modificado conforme a la reivindicación 11, en donde el polipéptido aumentador de la vida media es albúmina o un fragmento de la misma.
13. El factor de coagulación modificado conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dominio B ha sido reemplazado parcial o totalmente con albúmina humana.
14. Un polinucleótido o un grupo de polinucleótidos, que codifica(n) un factor de coagulación modificado conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. Un plásmido o vector que comprende el polinucleótido conforme a la reivindicación 14, o un grupo de plásmidos o vectores, comprendiendo dicho grupo el grupo de polinucleótidos conforme a la reivindicación 14.
16. El plásmido o vector o grupo de plásmidos o vectores conforme a la reivindicación 15, donde dicho(s) plásmido(s) o vector(es) son uno o más vector(es) de expresión.
17. Un vector o grupo de vectores conforme a la reivindicación 16, que es/son uno o más vectores de transferencia para uso en terapia génica humana.

18. Una célula hospedadora que comprende un polinucleótido o un grupo de polinucleótidos conforme a la reivindicación 14 o un plásmido o vector o un grupo de plásmidos o vectores conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17.
- 5 19. Un método de producción de un factor de coagulación modificado, que comprende:
 - (a) cultivar células hospedadoras conforme a la reivindicación 18 en condiciones tales que se expresa el factor de coagulación modificado; y
 - (b) opcionalmente, recuperar el factor de coagulación modificado de las células hospedadoras o del medio de cultivo.
- 10 20. Una composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación modificado conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, un polinucleótido o grupo de polinucleótidos conforme a la reivindicación 14, o un plásmido o vector o un grupo de plásmidos o vectores conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17.
- 15 21. El uso de un factor de coagulación modificado conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, un polinucleótido o grupo de polinucleótidos conforme a la reivindicación 14, o un plásmido o vector o grupo de plásmidos o vectores conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, o de una célula anfitrión conforme a la reivindicación 18 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno de la coagulación de la sangre.
- 20 22. El uso conforme a la reivindicación 21, en donde el trastorno de la coagulación de la sangre es hemofilia A.
23. El uso conforme a la reivindicación 21 ó 22, en donde el tratamiento comprende terapia génica humana.
- 25 24. Un método de preparación de un FVIII modificado que tiene vida media funcional aumentada, que comprende insertar un polipéptido aumentador de la vida media dentro del dominio B de la secuencia de aminoácidos de dicho FVIII, en donde el HLEP se selecciona del grupo constituido por las proteínas de la familia de las albúminas albúmina, afamina, alfa-fetoproteína y la proteína de unión de la vitamina D, y porciones de una región constante de inmunoglobulina de las inmunoglobulinas.
- 30 25. Un método para aumentar la vida media funcional de FVIII, que comprende insertar un polipéptido aumentador de la vida media dentro del dominio B de dicho FVIII, en donde el HLEP se selecciona del grupo constituido por las proteínas de la familia de las albúminas albúmina, afamina, alfa-fetoproteína y la proteína de unión de la vitamina D, y porciones de una región constante de inmunoglobulina de las inmunoglobulinas.
- 35 26. Un método para aumentar la estabilidad en medios de cultivo de FVIII exentos de suero y de proteínas animales, que comprende insertar un polipéptido aumentador de la vida media dentro del dominio B de la secuencia de aminoácidos de FVIII, en donde el HLEP se selecciona del grupo constituido por las proteínas de la familia de las albúminas albúmina, afamina, alfa-fetoproteína y la proteína de unión de la vitamina D, y porciones de una región constante de inmunoglobulina de las inmunoglobulinas.
- 40 27. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, que comprende reemplazar el dominio B de FVIII o una parte del mismo con el polipéptido aumentador de la vida.

Figura 1a: Reemplazamientos de la secuencia del dominio B en las proteínas de inserción de albúmina de FVIII utilizadas en los ejemplos. Las secuencias de transición representadas para pF8-1210 corresponden a SEQ ID NO. 24 (A2/B/Albúmina) y 34 (Albúmina/B/A3), para pF8-1211 a SEQ ID NO. 24 y 35, para pF8-1413 a SEQ ID NO. 23 y 35 y para pF8-1439 a SEQ ID NO: 28 y 40, respectivamente.

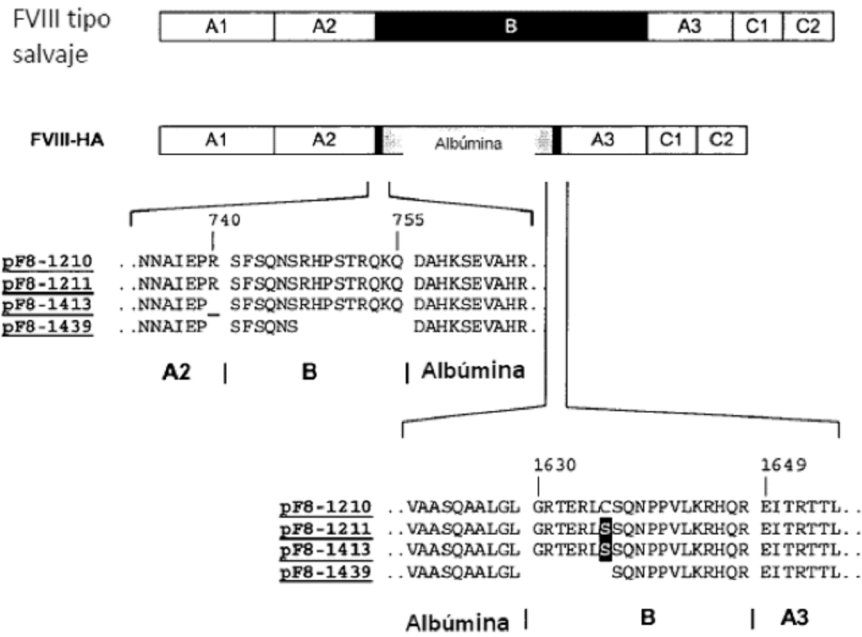


Figura 1b: Ejemplos de secuencias del dominio B utilizadas como enlazadores entre el dominio A2 de FVIII y el HLEP de reemplazamiento de dominio B (utilizando albúmina como ejemplo del resto HLEP)

A2	B	Albúmina
NNAIEP	SFSQNSRHPSTRQKQ	DAHKSEVAHR (SEQ ID NO. 23)
NNAIEPR	SFSQNSRHPSTRQKQ	DAHKSEVAHR (SEQ ID NO. 24)
NNAIEPR	SFSQNSRHPSTRQ	DAHKSEVAHR (SEQ ID NO. 25)
NNAIEPR	SFSQNSRHPST	DAHKSEVAHR (SEQ ID NO. 26)
NNAIEPR	SFSQNSRH	DAHKSEVAHR (SEQ ID NO. 27)
NNAIEPR	SFSQNS	DAHKSEVAHR (SEQ ID NO. 28)
NNAIEPR	SFS	DAHKSEVAHR (SEQ ID NO. 29)

Figura 1c: Ejemplos de otras secuencias enlazadoras escindibles entre el dominio A2 de FVIII y el HLEP de reemplazamiento del dominio B (utilizando albúmina como ejemplo)

NNAIEPR	SFSQNSGGSGGSGGS	DAHKSEVAHR (SEQ ID NO. 30)
NNAIEPR	SVAKKHPTW	DAHKSEVAHR (SEQ ID NO. 31)
NNAIEPR	SFQKKTRHYF	DAHKSEVAHR (SEQ ID NO. 32)
NNAIEPR	AVGG	DAHKSEVAHR (SEQ ID NO. 33)

Figura 1d: Ejemplos de secuencias de dominio B utilizadas como enlazadores entre el HLEP de reemplazamiento del dominio B (utilizando albúmina como ejemplo) y el dominio A3 de FVIII

Albúmina	B	A3
VAASQAALGL	GRTERLCSQNPPVLKRHR	QREITRTTL (SEQ ID NO. 34)
VAASQAALGL	GRTERLSSQNPPVLKRHR	QREITRTTL (SEQ ID NO. 35)
VAASQAALGL	TERLCSQNPPVLKRHR	QREITRTTL (SEQ ID NO. 36)
VAASQAALGL	TERLSSQNPPVLKRHR	QREITRTTL (SEQ ID NO. 37)
VAASQAALGL	LCSQNPPVLKRHR	QREITRTTL (SEQ ID NO. 38)
VAASQAALGL	LSSQNPPVLKRHR	QREITRTTL (SEQ ID NO. 39)
VAASQAALGL	SNPPVLKRHR	QREITRTTL (SEQ ID NO. 40)
VAASQAALGL	VLKRHR	QREITRTTL (SEQ ID NO. 41)
VAASQAALGL	HR	QREITRTTL (SEQ ID NO. 42)
VAASQAALGL	GRTERLCSQNPPVLKRHR	RRQREITRTTL (SEQ ID NO. 43)
VAASQAALGL	SNPPVLKRHR	RRQREITRTTL (SEQ ID NO. 44)
VAASQAALGL	HR	RRQREITRTTL (SEQ ID NO. 45)
VAASQAALGL		RRQREITRTTL (SEQ ID NO. 49)

Figura 1e: Ejemplos de otras secuencias enlazadoras entre el HLEP de reemplazamiento del dominio B (utilizando albúmina como ejemplo) y el dominio A3 de FVIII

Albúmina	B	A3
VAASQAALGL	GGSGSGSGSGSGSRHR	RRQREITRTTL (SEQ ID NO. 46)
VAASQAALGL	GGSGSGSGSGSGSRHR	RRQREITRTTL (SEQ ID NO. 47)
VAASQAALGL	GGSGSGSRHR	RRQREITRTTL (SEQ ID NO. 48)

Figura 2: Ejemplos de inserciones de HLEP en la molécula FVIII. Las flechas designan sitios de escisión.

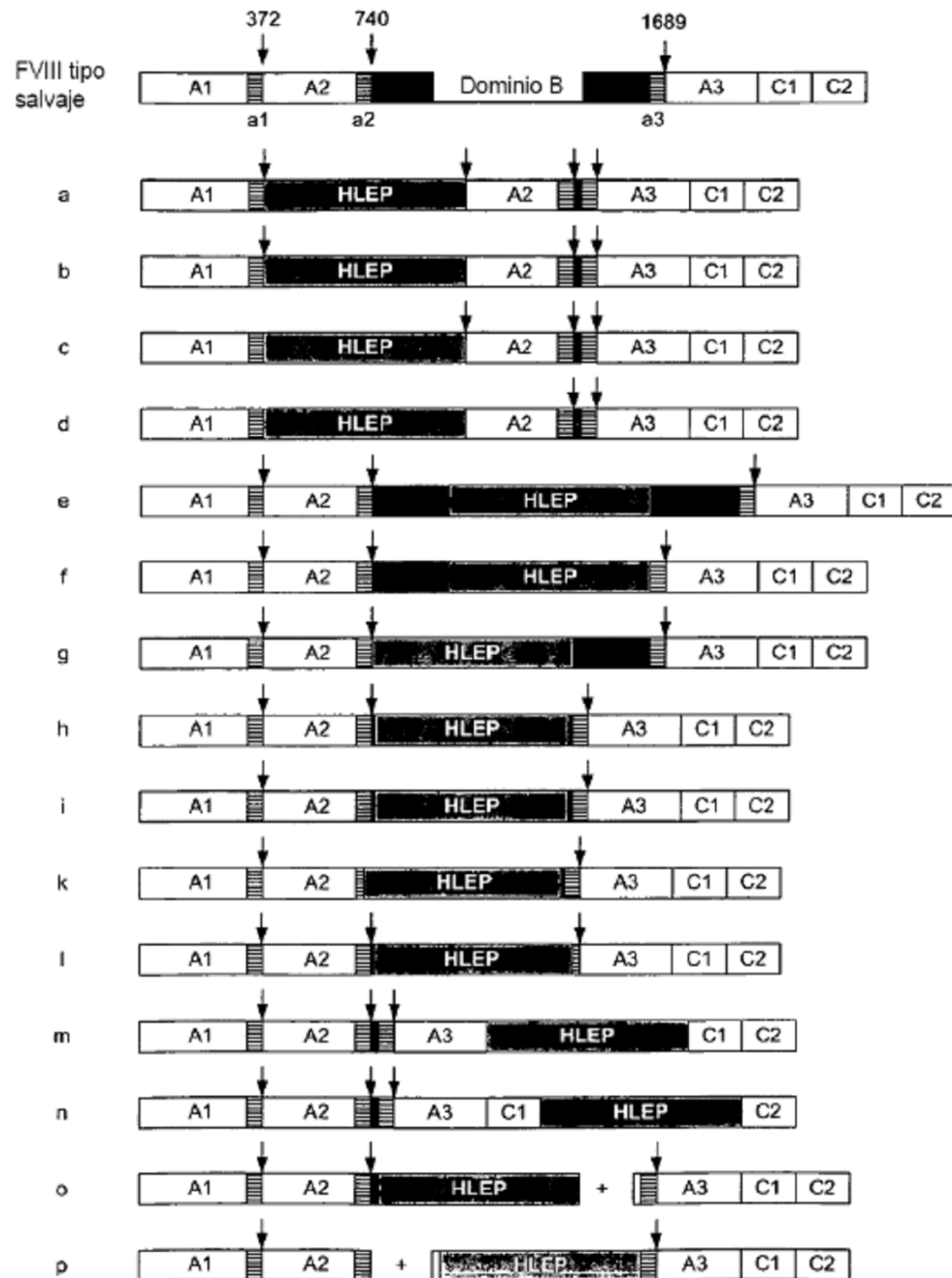


Figura 3. Análisis farmacocinético en ratas de mutantes de FVIII que tienen el dominio B reemplazado por albúmina humana en comparación con FVIII tipo salvaje (Helixate®).

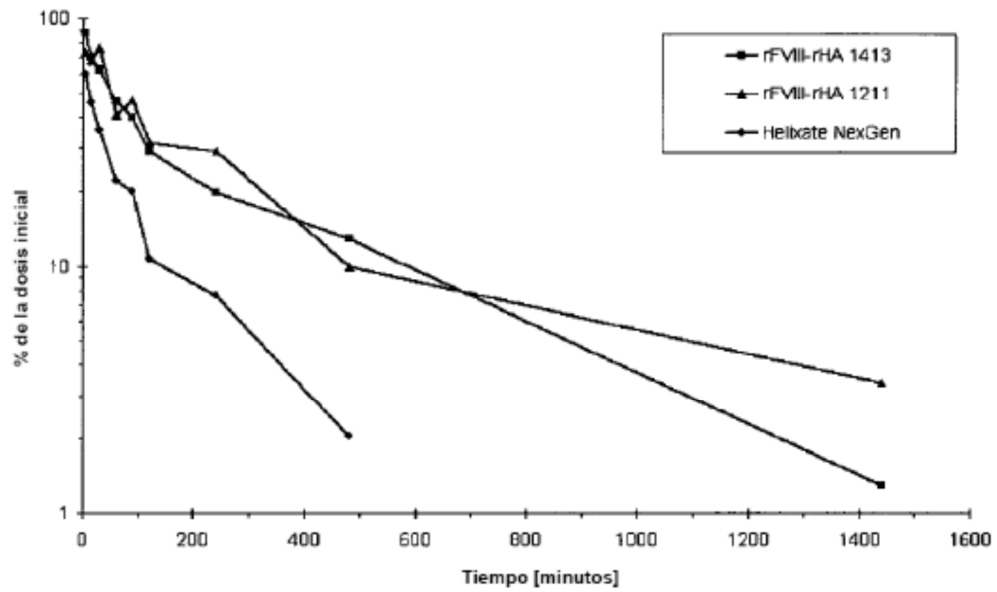


Figura 4. Análisis de los sobrenadantes de cultivo de células en 3 momentos después de la siembra de las células (96, 120 y 144 horas). Las agrupaciones de transfectantes HEK-293 se evaluaron respecto a productividad de la actividad de coagulación de FVIII y antígeno de FVIII y sus ratios de un FVIII tipo salvaje (457) y un mutante de FVIII con reemplazamiento del dominio B por albúmina humana.

