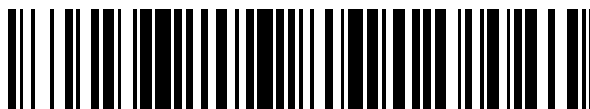


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 041**

51 Int. Cl.:

A61K 47/61 (2007.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2014** **PCT/US2014/035590**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014** **WO14179184**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2014** **E 14727380 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018** **EP 2991684**

54 Título: **Composiciones para inducir tolerancia inmunitaria a las proteínas factores de coagulación**

30 Prioridad:

28.04.2013 US 201361816790 P

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

23.11.2018

73 Titular/es:

BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
100 Bayer Boulevard, P.O. Box 915
Whippany, NJ 07981, US

72 Inventor/es:

ASWAD, FRED, JULLIEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 691 041 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

Composiciones para inducir tolerancia inmunitaria a las proteínas factores de coagulación

Referencia a solicitudes de patente relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica beneficio sobre la solicitud provisional de Estados Unidos N° 61/816.790, presentada el 28 de abril de 2013.

Incorporación por referencia del material presentado electrónicamente

- 10 En el presente documento se incorpora por referencia en su totalidad un listado de secuencias legible por ordenador presentado a la vez con el presente documento e identificado del siguiente modo: Un (90,252 Byte ASCII (Text)) archive denominado "Sequence_listing_ST25.txt," creado el 25 de marzo de 2014.

Antecedentes

- 15 El desarrollo de la terapia de sustitución del factor de coagulación ha transformado las vidas de muchos individuos con trastornos de la coagulación sanguínea, tales como la hemofilia. La hemofilia es un grupo de trastornos genéticos hereditarios que afectan a la capacidad del cuerpo para controlar la coagulación de la sangre. Los pacientes con hemofilia no producen cantidades adecuadas de las proteínas Factor VIII (FVIII) o Factor IX (FIX), que son necesarias para una coagulación sanguínea eficaz. En los hemofílicos graves, incluso una pequeña lesión puede provocar pérdida de sangre continuada durante días o semanas y puede no producirse una cicatrización completa, lo que da lugar a un potencial daño permanente y debilitante en las articulaciones y otros órganos, y la muerte prematura. La hemofilia A es el trastorno de coagulación hereditario más frecuente, con una incidencia estimada de 1 por cada 5.000 varones. Está producida por una deficiencia o defectos estructurales del FVIII, un componente crucial de la vía intrínseca de la coagulación sanguínea. El tratamiento actual de la hemofilia A implica la inyección intravenosa del FVIII humano. El FVIII humano se ha producido de forma recombinante como una molécula monocatenaria de aproximadamente 300 kDa. Consta de dos dominios estructurales A1-A2-B-A3-C1-C2 (Thompson, *Semin. Hematol.* 29:11-22 (2003)). El producto precursor se procesa para dar lugar a dos cadenas polipeptídicas de 200 kDa (pesada) y 80 kDa (ligera) en el aparato de Golgi, manteniéndose las dos cadenas unidas por iones metálicos (Kaufman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263:6352 (1988); Andersson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 2979 (1986)). El dominio B del FVIII parece ser dispensable ya que se ha demostrado que el FVIII con delección del dominio B (BDD, cadena pesada A1-A2 de 90 kDa más la cadena ligera de 80 kDa) también es eficaz como terapia de sustitución en la hemofilia A. La secuencia del FVIII sin dominio B contiene una delección de todos excepto de 14 aminoácidos del dominio B.

- 35 Los pacientes de hemofilia A actualmente son tratados mediante la administración intravenosa del FVIII a demanda o como terapia profiláctica administrada varias veces a la semana. Para el tratamiento profiláctico se administran 15 – 25 UI/kg de peso corporal de FVIII tres veces a la semana. El paciente lo necesita de forma constante. Dada su corta semivida en varones, el FVIII debe administrarse con frecuencia. A pesar de su gran tamaño de más de 300 kDa para la proteína de longitud completa, el FVIII tiene una semivida en seres humanos de únicamente aproximadamente 11 horas. (Ewenstein *et al.*, *Semin. Hematol.* 41:1-16 (2004)).

- 40 Una limitación importante de la terapia es la posibilidad de que el sistema inmunológico del paciente desarrolle anticuerpos contra el FVIII administrado de forma exógena (Saenko *et al.*, *Haemophilia* 8:1-11 (2002)). Los principales epítomos de los anticuerpos inhibidores se localizan en el dominio A2 en los residuos 484-508, el dominio A3 en los residuos 1811-1818 y el dominio C2. Por desgracia, el desarrollo de anticuerpos previene el uso del FVIII como terapia de sustitución en muchos pacientes.

- 45 Por tanto, para que la terapia de sustitución sea eficaz, es crucial prevenir cualquier respuesta inmunitaria indeseada. Existen muchos inconvenientes en las metodologías para prevenir o eliminar las respuestas inmunitarias indeseadas, en particular frente a los bioterapéuticos. El tratamiento actual de las respuestas inmunitarias indeseables suele implicar una inmunosupresión amplia, tal como inhibidores químicos o terapia de depleción de linfocitos B (REFS), que pueden aumentar la susceptibilidad a la infección. El documento US2006/040856 muestra conjugados de ácido siálico-PEG del factor IX (reivindicación 1, ejemplos 2-8). El ácido siálico es un ligando Siglec de linfocitos B. El factor de coagulación IX incluye una mutación que añade uno o más sitios de N- u O-glicosilación a la secuencia peptídica (párr. 259). El polímero se une al péptido en el sitio glicosilado (párr. 235). Así, el polímero queda unido de manera covalente al sitio mutado. El conjugado se utiliza para favorecer la coagulación de la sangre (reivindicaciones 39, 40). De acuerdo con lo anterior, en la técnica existe la necesidad de composiciones y procedimientos que puedan evitar las respuestas de anticuerpos e inducir tolerancia a los bioterapéuticos del factor de coagulación en pacientes.

Sumario

- 55 Las presentes realizaciones proporcionan composiciones y procedimientos para prevenir o reducir las respuestas

inmunológicas indeseadas e inducir tolerancia inmunitaria de los factores de coagulación sanguínea, como el FVIII que se define en las reivindicaciones. La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que se encuentre por fuera del ámbito de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos. En un aspecto, se proporciona un conjugado para inducir tolerancia de la proteína factor de coagulación, en el que el conjugado comprende una proteína factor de coagulación o un fragmento antigénico o variante del mismo y un ligando Siglec, como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el ligando Siglec es un ligando para un Siglec inhibidor. En algunas realizaciones, el ligando Siglec se une a un Siglec seleccionado de Siglec-1 (CD169), Siglec-2 (CD22), Siglec-3 (CD33), Siglec-4 (MAG), Siglec-5, Siglec-6, Siglec-7, Siglec-8, Siglec-9, Siglec-G/10, Siglec-11 y Siglec-12. En algunas realizaciones, el Siglec se expresa sobre la superficie de un linfocito B. En algunas realizaciones, el logando Siglec es un ligando Siglec-2 (CD22) de linfocitos B. En algunas realizaciones, el ligando Siglec es un ligando Siglec-G/10. En algunas realizaciones, la proteína factor de coagulación está conjugada al ligando, tal como un ligando Siglec-2, directa o indirectamente, de un modo covalente o no covalente.

En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades eficaces del conjugado para inducir tolerancia en un sujeto.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de inducir tolerancia de una proteína factor de coagulación en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un conjugado que comprende una proteína factor de coagulación o un fragmento antigénico o variante del mismo y un ligando Siglec.

En algunas realizaciones, el conjugado comprende además una partícula pequeña, tal como un liposoma, y la proteína factor de coagulación o un fragmento antigénico o variante del mismo y un ligando Siglec se expresan en la superficie del liposoma. En algunas realizaciones, la proteína factor de coagulación o un fragmento antigénico o variante del mismo y el ligando Siglec están unidos a través de la partícula pequeña. El ligando Siglec es un glicano seleccionado del grupo que consiste en 9-N-bifenilcarboxil-NeuAca2-6Gal~1-4GlcNAc (6'-BPCNeuAc), NeuAca2-6Gal~1-4GlcNAc y NeuAca2-6Gal~1-4(6-sulfo)GlcNAc y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la proteína factor de coagulación se selecciona del grupo que consiste en Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X y Factor XI y combinaciones de los mismos.

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como las reivindicaciones y la siguiente descripción detallada son ejemplos.

Breve descripción de las figuras

El experto en la técnica entenderá que las figuras, que se describen más adelante, son con fines ilustrativos únicamente.

FIG. 1. Inducción de tolerancia con liposomas que muestran antígeno y los ligandos de CD22. a, esquema de liposomas inmunogénicos y tolerogénicos. b, estructuras químicas de los ligandos de CD22 usados en este estudio. c y d, inducción dependiente de CD22 de tolerancia a un antígeno independiente de linfocitos T (NP; panel c) y dependiente de linfocitos T (HEL; panel d). Los ratones ST o CD22KO se trataron el día (flecha abierta), como se ha mostrado, y se exponen a los liposomas inmunogénicos los días 15 y 30 (flecha cerrada). Los datos representan la media $\pm$ s.e.m. (n=8-10). Titulación de ^{BPA}NeuGc y NeuGc sobre los liposomas tolerogénicos. Los títulos se determinaron después de dos exposiciones a liposomas inmunogénicos ((n=4). f, los ratones pasaron a ser tolerantes a HEL a diferentes tiempos respecto a la exposición y los títulos se determinaron dos semanas después de la exposición a liposomas inmunogénicos y son datos respecto a la inmunización de ratones no expuestos previamente (n= 4). Los datos representan la media $\pm$ s.e.m. (n=4).

FIG. 2. Los liposomas tolerogénicos inhiben fuertemente la señalización de BCR y producen apoptosis. a, flujo de calcio en linfocitos B IgM^{HEL} estimulados con los liposomas indicados. b, regulación por incremento de CD86 de linfocitos B IgM^{HEL} 24 horas después de estimular con los liposomas indicados. b, proliferación *in vitro* de linfocitos B IgM^{HEL} marcados con CTV tres días después de la estimulación con los liposomas indicados. d, Anexina V frente a tinción con PI de linfocitos B IgM^{HEL} tratados durante 24 horas con los liposomas indicados. Los datos representan la media $\pm$ s.e.m. (n=3). e, proliferación *in vivo* de linfocitos B IgM^{HEL} marcados con CFSE y sometidos a transferencia adoptiva cuatro días después de la inmunización con los liposomas indicados. f, análisis del número de linfocitos B Ly5a⁺IgM^{HEL} sometidos a transferencia adoptiva que permanecen en el bazo de ratones huésped 12 días después de la inmunización con los liposomas indicados. La cuantificación representa la media $\pm$ s.e.m. (n=4).

FIG. 3. Un circuito tolerogénico dependiente de CD22 inhibe la vía de supervivencia de Akt y dirige la importación al núcleo de FoxO1. a, análisis de transferencia de tipo Western de los componentes de la señalización de BCR en linfocitos B ST y IgM^{HEL} CD22KO 30 minutos después de la estimulación de las células con los liposomas indicados o PBS como control. Los liposomas tolerogénicos inhiben la fosforilación de los componentes de señalización de todas las principales vías de señalización de BCR e inducen hipofosforilación de Akt y FoxO1 y linfocitos B IgM^{HEL} estimulados durante 2 horas con los liposomas indicados. Las células se tiñeron con anti-FoxO1, faloidina y DAPI. Los insertos son una célula representativa a tres veces el aumento.

FIG. 4. Tolerización específica de antígeno de ratones a antígenos dependientes de linfocitos T fuertes. a-b, tolerización de HEL en ratones Balb/c a una exposición a liposomas (panel a) o solubles (panel b). c, tolerización de OVA en ratones C57BL/6J. d, tolerización de MOG en ratones Balb/c. e, Tolerización de FVIII en ratones Balb/c. f, la tolerización es específica del antígeno. Los ratones Balb/c que se han tolerizado a HEL u OVA tienen respuestas normales a otro antígeno. Se inmunizó a los ratones el día 0 con las condiciones indicadas, se expusieron el día 15 a liposomas inmunogénicos y los títulos se determinaron dos semanas después, el día 29. Todos los datos representan la media $\pm$ s.e.m. (n=4).

FIG. 5. La tolerización inmunitaria al FVIII previene las hemorragias en ratones que carecen del FVIII. a, a ratones ST o deficientes en FVIII se les administraron las dosis como se describe el día 0 y el día 15. El día 30, los ratones se reconstituyeron con FVIII recombinante humano (rhFVIII) a 50 U/kg o solución salina. Los ratones deficientes en FVIII tratados con liposomas tolerogénicos presentaron una pérdida de sangre significativamente menor en 20 minutos tras un pinzamiento de la cola que los ratones tratados inicialmente con liposomas inmunogénicos. El porcentaje de protección frente a hemorragias (línea discontinua) representa una pérdida de sangre $< 9,9 \mu\text{l/g}$, como se define con la media más 3 SD en ratones Balb/c ST. B, títulos de FVIII en los tres grupos reconstituidos demuestra que la prevención de la hemorragia se acompaña de una reducción significativa de los anticuerpos anti-FVIII. Los datos representan la media $\pm$ s.e.m. Se usó una prueba t de Student de dos colas para establecer el nivel de significación; no se define ninguna diferencia estadística (n.s.) con un valor P superior a 0,05.

FIG. 6. Un circuito tolerogénico mediado por CD22 operativo en linfocitos B humanos tanto no expuestos previamente como de memoria. a, tinción de linfocitos B humanos no expuestos previamente (CD19⁺IgM⁺IgD⁺CD27⁻; rojo) y de memoria (CD19⁺IgM⁺IgD⁺CD27⁺; azul) con anticuerpos anti-CD22 o de isotipo control (gris). b, estructura de ligando de CD22^{BPC} NeuAc de alta afinidad. c-e, la activación de los linfocitos B humanos no expuestos previamente y de memoria se inhibe mediante la copresentación de ^{BPC} NeuAc con antígeno afín (anti-IgM o anti-IgG, respectivamente) en liposomas, según el flujo de calcio (panel c), análisis de transferencia de tipo Western de los componentes de señalización de BCR (panel d) y regulación por aumento de CD86 (panel e). f, los liposomas que expresan el antígeno afín y los ligandos de CD22 disminuyen la viabilidad de los linfocitos B humanos tanto no expuestos previamente como de memoria. Los datos representan la media $\pm$ s.e.m. (n= 3). Se usó una prueba t de Student de dos colas para establecer el nivel de significación.

Descripción de varias realizaciones

Los tratamientos con éxito que usan compuestos bioterapéuticos, en particular fármacos polipeptídicos, requieren que el sistema inmunológico del sujeto no interfiera ni inhiba la actividad del fármaco bioterapéutico. Los anticuerpos antifármacos (ADA) se reconocen como un problema importante con los compuestos bioterapéuticos y pueden seguir siendo un problema, incluso después de haber tomado medidas para minimizar la inmunogenicidad de los propios fármacos. Este problema puede ser particularmente amenazante para los factores de coagulación bioterapéuticos proporcionados a los pacientes con trastornos de la coagulación sanguínea, en los que la bioterapéutica es crucial para detener la pérdida de sangre tras una lesión. En el presente documento se describen composiciones y procedimientos para inducir tolerancia específica del antígeno a los bioterapéuticos de factores de coagulación. Las composiciones comprenden una o más proteínas de factor de coagulación o fragmentos antigénicos o variantes de los mismos conjugados con uno o más ligandos Siglec. Sin desear quedar ligado a teoría alguna en cuanto a cómo funcionan las reivindicaciones, los linfocitos B inducen un circuito tolerogénico cuando el receptor de Siglec y de los linfocitos B están yuxtapuestos en una sinapsis inmunológica con el conjugado que comprende la proteína factor de coagulación y el ligando Siglec.

En el presente documento se demuestra la inducción de tolerancia al factor de coagulación VIII (FVIII) en un modelo de ratón con hemofilia, lo que previene la formación de anticuerpos inhibidores y permite la administración de FVIII para evitar hemorragias en una exposición posterior. En el presente documento, también se demuestra que la unión estimulada del receptor de linfocitos B y CD22 apaga la señalización del receptor de linfocitos B e induce apoptosis en linfocitos B tanto de ratón como humanos. También se demuestra que el circuito tolerogénico es operativo en linfocitos B primarios humanos dentro de los compartimentos tanto no expuestos previamente como de memoria, lo que indica que el abordaje de unión de CD22 y el receptor de los linfocitos B para inducir tolerancia específica del antígeno a los antígenos polipeptídicos dependientes de linfocitos T es aplicable no solo a la prevención sino también a la eliminación de afecciones preexistentes en seres humanos.

Con el fin de interpretar esta memoria descriptiva, se aplicarán las definiciones siguientes y, siempre que sea adecuado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa. En el caso de que cualquier definición expuesta más adelante entra en conflicto con el uso de la palabra en cualquier otro documento, incluyendo cualquier documento incorporado en el presente documento por referencia, la definición que se expone más adelante deberá estar dirigida siempre a los fines de interpretar esta memoria descriptiva y sus reivindicaciones asociadas a menos que claramente se pretenda un significado contrario (por ejemplo, en el documento en el que originalmente se usa el término). El uso de "o" significa "y/o", a menos que se indique lo contrario. El uso de "uno" en el presente documento significa "uno o más" a menos que se indique lo contrario o cuando el uso de "uno o más" sea claramente inadecuado. El uso de "comprende", "comprende", "que comprende", "incluyen", "incluye" y "que incluye" es intercambiable y no se pretende que sean limitantes. Además, cuando la descripción de una o más

realizaciones usa el término “que comprende”, los expertos en la técnica entenderán que, en algunos casos específicos, la realización o realizaciones puede describirse de forma alternativa usando el lenguaje “que consiste esencialmente en” y/o “que consiste en”.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que pertenecen estas realizaciones entiende habitualmente. Las referencias siguientes proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos usados. *Academic Press Dictionary of Science and Technology*, Morris (Ed.), Academic Press (1^a ed., 1992); *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, Smith et al. (Eds.), Oxford University Press (ed. revisada 2000); *Encyclopaedic Dictionary of Chemistry*, Kumar (Ed.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, Singleton et al. (Eds.), John Wiley & Sons (3^a ed., 2002); *Dictionary of Chemistry*, Hunt (Ed.), Routledge (1^a ed., 1999); *Dictionary of Pharmaceutical Medicine*, Nahler (Ed.), Springer-Verlag Telos (1994); *Dictionary of Organic Chemistry*, Kumar and Anandand (Eds.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); y *A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference)*, Martin y Hine (Eds.), Oxford University Press (4^a ed., 2000). En el presente documento se proporcionan aclaraciones adicionales de algunos de estos términos tal como se aplican específicamente a las realizaciones.

Las presentes realizaciones proporcionan composiciones y procedimientos para prevenir o reducir las respuestas inmunológicas indeseadas e inducir tolerancia inmunitaria de las proteínas factores de coagulación sanguínea, tales como el FVIII.

En algunas realizaciones, se proporciona un conjugado para inducir tolerancia de un factor de coagulación, en el que el conjugado comprende una proteína factor de coagulación o un fragmento antigénico o variante del mismo y un ligando Siglec. En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades eficaces del conjugado para inducir tolerancia en un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un trastorno de coagulación sanguínea y se le administra terapia de sustitución con factor de coagulación.

En algunas realizaciones, se proporcionan además procedimientos de inducir tolerancia de una proteína factor de coagulación en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un conjugado que comprende una proteína factor de coagulación o un fragmento antigénico o variante del mismo y un ligando Siglec.

En algunas formas de realización, el sujeto tiene un trastorno hemorrágico. En algunas realizaciones, el sujeto está recibiendo terapia de sustitución del factor de coagulación. En algunas realizaciones, el trastorno hemorrágico se selecciona del grupo que consiste en hemofilia A, hemofilia B, deficiencia del factor X y síndrome de Rosenthal (también conocido como hemofilia C).

En algunas realizaciones, la distancia que separa el resto de factor de coagulación y el resto ligando Siglec del conjugado permite la presentación eficiente a un linfocito B que tiene como resultado la unión obligada y la yuxtaposición del receptor de Siglec y de linfocitos B en una sinapsis inmunológica.

Como se usa en el presente documento, tolerancia inmunológica (o simplemente “tolerancia” es el proceso por el cual el sistema inmunitario no ataca a un antígeno. Se produce en tres formas: tolerancia central, tolerancia periférica y tolerancia adquirida. La tolerancia puede ser “natural” o “autotolerancia”, cuando el cuerpo no genera una respuesta inmunitaria a los autoantígenos o “tolerancia inducida”, cuando la tolerancia a los antígenos se puede crear manipulando el sistema inmunológico. Cuando se induce tolerancia, el cuerpo no puede producir una respuesta inmunológica al antígeno. Los mecanismos de tolerancia y la inducción de tolerancia son complejos y están poco entendidos. Como se conoce bien en la técnica (véase, *Basten et al.*, 30 *Curr. Opin. Immunol.* 22:566-574, 2010), variables conocidas en la generación de tolerancia incluyen la etapa de diferenciación de los linfocitos B cuando se presenta el antígeno, el tipo de antígeno y la participación de linfocitos T y otros leucocitos en la producción de citocinas y cofactores. Por tanto, la supresión de la activación de los linfocitos B no se puede equivaler a la tolerancia inmunológica. Por ejemplo, aunque la activación de los linfocitos B se puede inhibir mediante entrecruzamiento de CD22 al BCR, la silenciación selectiva de los linfocitos B no indica inducción de tolerancia. Véase, por ejemplo, *Nikolova et al.*, *Autoimmunity Rev.* 9:775-779 (2010); *Mihaylova et al.*, *Mol. Immunol.* 47:123-130 (2009); y *Courtney et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106:2500-2505 (2009).

Conjugados

El término “conjugado”, como se usa en el presente documento, hace referencia a un complejo en el que uno o más ligandos Siglec se acoplan a una o más proteínas factor de coagulación o un fragmento antigénico o variante de las mismas. La proteína factor de coagulación y el ligando Siglec puede acoplarse directa o indirectamente mediante interacciones covalentes o no covalentes. En algunas realizaciones, el ligando Siglec se acopla directamente al factor de coagulación mediante una química de unión adecuada.

La conjugación de ligando Siglec y la proteína factor de coagulación puede realizarse de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*, Shan Wong, CRC Press (Boca Raton, FL, 1991); y *Bioconjugate techniques*, 2^a ed., Greg T. Hermanson, Academic Press (Londres, Reino Unido, 2008). En algunas realizaciones, el ligando Siglec se conjuga directamente a la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante del mismo. En algunas realizaciones, la proteína

factor de coagulación o fragmento antigénico o variante del mismo se conjuga con un ligando Siglec directamente, mediante conjugación a uno o más hidratos de carbono preexistentes sobre la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante

En algunas realizaciones, uno o más residuos de ácido siálico se eliminan de la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante antes de la conjugación con el ligando Siglec. En algunas realizaciones, el ligando Siglec se puede conjugar con el polipéptido de factor de coagulación o fragmento antigénico o variante del mismo en proporciones molares iguales. En algunas realizaciones, la proporción entre el ligando Siglec y la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante de la misma es 1:1, 2:1, 5:1, 10:1, 15:1, 25:1, 35:1, 50:1, 75:1, 100:1, 200:1, 250:1, 500:1 o 1000:1. En una realización, la proporción entre el ligando Siglec y la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante de la misma es de 50:1 a 100:1.

En algunas realizaciones, el ligando Siglec se conjuga directamente a cualquier cisteína disponible o modificada por ingeniería sobre cualquier dominio de la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante, por ejemplo el FVIII.

En algunas realizaciones, la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante de la misma y el ligando Siglec están unidos a través de una molécula ligadora fisiológicamente aceptable. Una molécula ligadora fisiológicamente aceptable puede incluir, por ejemplo polímeros que son solubles en una solución o suspensión acuosa y que no tienen un impacto negativo, tales como efectos secundarios, en mamíferos tras la administración del conjugado proteína factor de coagulación-ligando Siglec en una cantidad farmacéuticamente aceptable. No existe una limitación concreta al ligador fisiológicamente aceptable de acuerdo con las presentes realizaciones. En algunas realizaciones, los ligadores se caracterizan típicamente por tener de 1 a aproximadamente 500 unidades de repetición. Ejemplos de dichos polímeros incluyen, entre otros, poli(alquilenglicoles) tales como polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) (PPG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(ácido- α -hidroxi), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acrilomorfolina) y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

El ligador fisiológicamente aceptable no está limitado a una estructura concreta y puede ser lineal (p. ej., alcoxi PEG o PEG bifuncional), ramificada o de múltiples ramas (p. ej., PEG en horquilla o PEG unido a un núcleo de polioliol), dendrítica o con enlaces degradables. Además, la estructura interna del ligador se puede organizar en cualquier número de patrones diferentes y se puede seleccionar del grupo que consiste en homopolímero, copolímero alternante, copolímero aleatorio, copolímero de bloque, tripolímero alternante, tripolímero aleatorio y tripolímero de bloque. Estos ligadores también pueden incluir polímeros de poli(óxido de alquileo), poli(ácido maleico), poli(DL-alanina), tales como carboximetilcelulosa, dextrano, ácido hialurónico y quitina, y poli(met)acrilatos.

En algunas realizaciones, el ligando Siglec se conjuga con un ligador fisiológicamente aceptable, por ejemplo PEG y/o PEG ramificado, y el ligador fisiológicamente está conjugado directamente a la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante, por ejemplo el FVIII. En algunas realizaciones, el ligador fisiológicamente aceptable puede estar conjugado con la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante directamente con uno o más hidratos de carbono preexistentes sobre cualquier dominio. En algunas realizaciones, el ligador fisiológicamente aceptable puede estar conjugado con la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante directamente con cualquier cisteína disponible o modificada mediante ingeniería sobre cualquier dominio. En algunas realizaciones, el ligador fisiológicamente aceptable puede estar conjugado con la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante directamente con cualquier aminoácido sobre cualquier dominio.

En una realización, el ligador fisiológicamente aceptable es PEG y derivados del mismo. La cadena lateral de PEG puede ser lineal, ramificada, en horquilla o puede consistir en múltiples ramas. No existe una limitación específica del PEG usado de acuerdo con las presentes reivindicaciones. En algunas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 1.000-20.000. En algunas realizaciones, las moléculas de PEG útiles se divulgan en el documento WO 03/040211, la patente de EE.UU. Nº 6.566.506, la patente de EE.UU. Nº 6.864.350 y la patente de EE.UU. Nº 6.455.639, por ejemplo. En otra realización, el ligador fisiológicamente aceptable es ácido polisialico (PSA) y/o derivados del mismo. El PSA se pueden unir a la proteína factor de coagulación usando procedimientos y técnicas conocidos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.356.170. En una realización, el ligador fisiológicamente aceptable es un polisacárido de origen natural, un derivado de un polisacárido de origen natural o un derivado de polisacárido de origen natural. En algunas realizaciones, la porción polisacárida del compuesto tiene más de 5, normalmente al menos 10, y en otra realización al menos de 20 a 50 residuos de ácido siálico en la cadena polimérica. En algunas realizaciones, los compuestos polisacáridos pueden tener hasta 500 residuos de sacáridos en total. En algunas realizaciones, todos los residuos de sacáridos en el compuesto son residuos de ácido siálico. La unidad de sacárido puede contener otros grupos funcionales, tales como grupos amina, hidroxilo o sulfato, o combinaciones de los mismos. Estos grupos pueden estar presentes en compuestos sacáridos de origen natural o introducirse en compuestos polisacáridos derivados.

La proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante del mismo puede unirse de forma covalente a los compuestos polisacáridos mediante cualquiera de las diversas técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Entre los ejemplos se incluyen la unión mediante un enlace peptídico entre un grupo carboxilo sobre la proteína factor de coagulación o el polisacárido y un grupo amina del otro o un enlace éster entre un grupo carboxilo de uno y

un grupo hidroxilo del otro. Como alternativa se puede formar una base de Schiff entre un grupo amino de uno y un grupo aldehído del otro. Otros mecanismos de unión están dentro de la experiencia habitual en la técnica. En la patente de EE.UU. N° 5.846.951 se identifican varios ejemplos.

Como se usa en el presente documento, la referencia a una proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante del mismo unida a una o más moléculas ligadoras fisiológicamente aceptables incluye cualquier unión química, tal como unión covalente o unión no covalente, tales como interacciones iónicas, hidrofóbicas, de afinidad o de bioafinidad. El ligador también se puede acoplar a la proteína mediante el uso de reactivos bifuncionales y mediante una rama espaciadora. Además, la molécula ligadora se puede acoplar a la proteína factor de coagulación mediante interacción de afinidad. Por ejemplo, la proteína factor de coagulación puede estar biotinilada y los polímeros conjugados con avidina o estreptavidina se pueden unir a la proteína factor de coagulación.

Los ligadores pueden unirse a la proteína factor de coagulación, fragmento antigénico o variante de la misma mediante procedimientos enzimáticos tales como, por ejemplo, la transferencia de sacáridos con poliglicosiltransferasa, como se indica en la patente de EE.UU. N° 6.379.933, o mediante glicopegilación, como se indica en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. N° 20040132640 A1.

De acuerdo con una realización, el ligador fisiológicamente aceptable es PEG o un derivado de PEG, que está unido covalentemente a la proteína factor de coagulación mediante cualquier estrategia y procedimiento conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las estrategias de modificación son la unión de al menos una molécula ligadora a través de grupos amino de residuos de lisina, la unión de al menos una molécula ligadora a través de las cadenas laterales de hidratos de carbono, la unión de al menos una molécula ligadora a través de grupos sulfhidrilo, la unión de al menos una molécula ligadora a través de grupos carboxilo de ácidos aspárticos y ácidos glutámicos, así como la unión de al menos una molécula ligadora de grupos hidroxilo y la unión de al menos una molécula ligadora del extremo N.

En otra realización, la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante de la misma también se puede unir a al menos una molécula ligadora a través de sus residuos de hidratos de carbono. En algunas realizaciones, esto se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, oxidación moderada de las cadenas de hidratos de carbono, tal como con NaIO_4 , formando una función aldehído y el posterior acoplamiento a un PEG, tal como PEG-hidrazida.

Otra realización proporciona la unión de al menos una molécula ligadora a la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante de la misma a través de grupos sulfhidrilo. Estos grupos SH libres se pueden modificar mediante, por ejemplo, PEG maleimida, formando un sulfuro estable. La PEGilación de los residuos de cisteína también se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, PEG-vinilsulfona, PEG-yodoacetamida o PEG-disulfuro de ortopiridilo.

En algunas realizaciones, la conjugación de una cisteína (incluyendo mutantes de cisteína) de la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante del mismo con un ligador fisiológicamente aceptable, por ejemplo PEG o un ligado Siglec puede llevarse a cabo del siguiente modo. Por ejemplo, una molécula de FVIII puede tener una cisteína introducida en localizaciones específicas (p. ej., en el residuo 1804) y este FVIII se reduce con TCEP añadiendo 120 μl de solución madre de TCEP (25 mM) preparada recientemente en MOPS 20 mM / CaCl_2 10 mM / 100 ppm de Tween 80, pH 7,0 en 12 ml del factor VIII (0,15 mg/ml), dando una concentración final de 0,25 mM. La muestra se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente sin mezclar y el TCEP se elimina usando cromatografía de intercambio catiónico. Antes de la conjugación, la muestra de FVIII se incuba a 4 °C durante la noche para permitir la reformación de enlaces disulfuro en las proteínas que se pueden haber reducido con TCEP. Una forma activada en maleimida del ligando se mezcla con el FVIII y se incuba a 4 °C en un agitador de balanceo durante 5 horas (mezclado lento). El FVIII conjugado se purifica a partir del ligando sin reaccionar. Por ejemplo, usando cromatografía de intercambio catiónico en la que el conjugado se puede eluir con un gradiente en 30 minutos a tampón E al 40% (MOPS 20 mM / CaCl_2 10 mM / 100 ppm de Tween 80, a pH 7,0) sobre 60% de tampón F (tampón E más NaCl 600 mM) a un caudal de 0,5 ml/min. Cristales de sacarosa se disuelven en el conjunto de elución, dando una concentración final del 1% y la proteína se puede almacenar a -80 °C.

En algunas realizaciones, la glicoconjugación enzimática de un ligador (tal como PEG) o ligando Siglec con la proteína factor de coagulación o fragmento antigénico o variante (tal como FVIII) puede llevarse a cabo del siguiente modo. La conjugación enzimática de una molécula de ácido siálico-ligando con N-glicanos nativos sobre una glicoproteína tal como FVIII se puede llevar a cabo en un proceso de tres etapas. En la primera, la glicoproteína se desialila mediante incubación con sialidasa en tampón de His 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl_2 3 mM a pH 6,0. Después, se añade CMP-ácido siálico-Gly-ligando, a una proporción adecuada para la reacción (p. ej., un exceso molar de 1-20) junto con ST3GalIII para catalizar la transferencia de ácido siálico-ligando. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 18-24 horas, en los extremos de las galactosas restantes se introduce ácido siálico mediante la adición de un exceso molar de CMP-ácido siálico. El glicoconjugado se puede purificar después de reagentes sin reaccionar o se puede fraccionar de acuerdo con el nivel de conjugación (p. ej., mediante cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de afinidad o cromatografía de exclusión por tamaño). Las fracciones que contienen conjugados adecuadamente activos se pueden combinar, intercambiar con tampón en MOPS 20 mM / CaCl_2 10 mM / 100 ppm de Tween80, 1% de sacarosa a pH 7,0 y se almacenan a -80°C.

En algunas realizaciones, el conjugado comprende una partícula pequeña, tal como una nanopartícula basada en metales, nanopartícula polimérica, nanopartícula basada en lípidos, nanopartícula lipídica sólida o en liposomas. En algunas realizaciones, la partícula pequeña sirve para acoplar el ligando Siglec y la proteína factor de coagulación indirectamente y facilita su yuxtaposición y unión de Siglec y el receptor de linfocitos B en una sinapsis inmunológica sobre los linfocitos B. En algunas realizaciones, el ligando Siglec presente en la partícula pequeña es un ligando de glicano que reconoce específicamente un Siglec expresado sobre la superficie de los linfocitos B. En algunas realizaciones, el Siglec expresado sobre la superficie de los linfocitos B es CD22 y/o Siglec G/10. La conjugación con una partícula pequeña, tal como un liposoma, puede ser directa o indirecta y puede ser de naturaleza covalente o no covalente. En algunas realizaciones, el ligando Siglec y la proteína factor de coagulación se conjugan con la partícula pequeña de modo que se expresan sobre la superficie externa de la partícula pequeña. En algunas realizaciones, el ligando Siglec y la proteína factor de coagulación se unen a la misma molécula de un liposoma. En otra realización, el ligando Siglec y la proteína factor de coagulación se unen a diferentes moléculas sobre n liposoma.

En algunas realizaciones, la partícula pequeña tiene un tamaño medio de partícula de entre 1 y 600 nm. En algunas realizaciones, la partícula pequeña tiene un tamaño medio de partícula de entre 1 y 50 nm, entre 1 y 400 nm, entre 1 y 300 nm, entre 1 y 200 nm, entre 1 y 150 nm o entre 10 y 100 nm. En algunas realizaciones, aproximadamente el 90% de las partículas pequeñas tienen un tamaño de partícula que entra dentro de los intervalos mencionados anteriormente. En algunas realizaciones, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o aproximadamente el 99% de las partículas pequeñas tienen un tamaño de partícula que entra dentro de los intervalos mencionados anteriormente. Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" significa $\pm 10\%$.

En algunas realizaciones, el liposoma normalmente es una estructura vesicular de una partícula hidrosoluble obtenida mediante agregación de moléculas antipáticas, incluyendo una región hidrófila y una región hidrófoba. Aunque el componente del liposoma es una micela cerrada formada por cualquier molécula antipática, en algunas realizaciones incluye lípidos y formas de una estructura de bicapa. En algunas realizaciones, la composición liposómica es una vesícula ultrafina semisólida de tamaño entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200 nanómetros. La estructura del liposoma o está particularmente limitada y puede ser cualquier liposoma, tal como unilamelas y multilamelas. Como solución encapsulada dentro del liposoma, es posible usar tampón y solución salina y otras además de agua.

En algunas realizaciones, los liposomas comprenden fosfolípidos tales como diestearoil fosfatidilcolina (DSPC) y polietilenglicol-diestearoil fosfoetanolamina (PEG-DSPE). Otros fosfolípidos también se pueden usar en la preparación de los liposomas de las realizaciones, incluyendo dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleilfosfatidilcolina (DOPC) y dioleilfosfatidil etanolamina (DOPE), esfingoglicolípido y gliceroglicolípido. Estos fosfolípidos se pueden usar al fabricar el liposoma, solos o en combinación de dos o más o en combinación con un derivado lipídico en el que una sustancia no polar, tal como colesterol, o un polímero hidrosoluble, tal como polietilenglicol, se ha unido al lípido.

Los liposomas se pueden preparar de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, incorporación de un ligando Siglec y un factor de coagulación sobre la superficie de un liposoma se puede realizar mediante cualquiera de los procedimientos puestos en práctica de forma rutinaria. Procedimientos detallados para producir una nanopartícula de liposoma portadora de un ligando Siglec y una proteína factor de coagulación también se ilustran en los Ejemplos del presente documento. En algunas realizaciones, el conjugado comprende un liposoma y un ligando de glicano incorporado (p. ej., ^{BPA}NeuGc) y una proteína factor coagulante específica, tal como el Factor VIII. Además de los procedimientos y métodos ilustrados en el presente documento, en las presentes realizaciones también se pueden usar varios procedimientos usados de forma rutinaria por los expertos en la materia para preparar liposomas. Por ejemplo, se pueden usar los procedimientos descritos en Chen *et al.*, *Blood* 115:4778-86, 2010; y *Liposome Technology*, vol. 1, 2^a edición (de Gregory Gregoriadis (CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo), Capítulo 4, pág. 67-80, Capítulo 10, pág. 167-184 y Capítulo 17, pág. 261-276 (1993)). Más específicamente, procedimientos adecuados incluyen, a título enunciativo, un procedimiento de sonicación, un procedimiento de inyección de etanol, un procedimiento de prensa francesa, un procedimiento de inyección de éter, un procedimiento de ácido cólico, un procedimiento de fusión de calcio, un procedimiento de liofilización y un procedimiento de evaporación en fase inversa.

Proteínas factores de coagulación

Como se usa en el presente documento, "proteína factor de coagulación" hace referencia a una proteína que está implicada en la cascada de coagulación y tiene, predominantemente, actividad procoagulante. Los factores de coagulación son bien conocidos en la técnica e incluyen, a título enunciativo, los factores de coagulación I, II, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII y XIII. En algunas realizaciones, los factores de coagulación se pueden concentrar a partir de plasma o se pueden producir de forma recombinante. En algunas realizaciones, los factores de coagulación tienen una estructura de aminoácidos que varía de la estructura natural. En algunas realizaciones, el factor de coagulación tiene suficiente actividad procoagulante de modo que será terapéuticamente útil si se administra para terapia de sustitución. En una realización, el factor de coagulación es un polipéptido FVIII funcional, tal como, sin limitaciones, un concentrado de FVIII de plasma o de FVIII producido de forma recombinante o Factor IX (FIX).

El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí en una cadena lineal mediante enlaces peptídicos. El término hace referencia a cadenas cortas, que también se denominan habitualmente en la técnica péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas largas, que generalmente se denominan en la técnica proteínas, de las cuales hay muchos tipos. Las proteínas pueden comprender una o más cadenas polipeptídicas. Se apreciará que los polipéptidos pueden contener aminoácidos aparte de los 20 aminoácidos habitualmente denominados 20 aminoácidos de origen natural y dichos muchos aminoácidos, incluyendo los aminoácidos terminales, se pueden modificar en un polipéptido dado, bien mediante procesos naturales, tales como procesamiento y otras modificaciones postraduccionales, y también mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, acetilación, acilación, ADP ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puentes disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas, tal como arginilación y ubiquitinación. Dichas modificaciones son bien conocidas por los expertos en la técnica. Varias modificaciones particularmente frecuentes, por ejemplo glicosilación, unión a lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación, por ejemplo, se describen en la mayoría de los textos, tales como *PROTEINS--STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES*, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman y Company, New York (1993). Las modificaciones se pueden producir en cualquier punto en un polipéptido, incluida la estructura peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. De hecho, el bloqueo del grupo amino o carboxilo en un polipéptido, o ambos, mediante una modificación covalente, es frecuente en polipéptidos de origen natural y sintético, y dichas modificaciones también pueden estar presentes en los polipéptidos de las presentes realizaciones. Durante la modificación postraduccional del péptido se puede eliminar un residuo de metionina en el extremo NH₂. De acuerdo con esto, estas realizaciones contemplan el uso de variantes que contienen metionina y sin metionina en el extremo amino de la proteína de las realizaciones. Las modificaciones que se producen en un polipéptido a menudo estarán en función de cómo se hacen. Para los polipéptidos formados expresando un gen clonado en un huésped, por ejemplo, la naturaleza y extensión de las modificaciones en gran parte se determinarán mediante la capacidad de modificación postraduccional de la célula huésped y las señales de modificación presentes en la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Por ejemplo, como se sabe bien, la glicosilación a menudo no se produce en huéspedes bacterianos tales como, por ejemplo, *E. coli*. De acuerdo con esto, cuando se desea glicosilación, un polipéptido se expresará en un huésped de glicosilación, generalmente una célula eucariota. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o varios grados en varios sitios en un polipéptido dado. Asimismo, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. En general, como se usa en el presente documento, el término polipéptido abarca todas estas modificaciones, en particular las que están presentes en polipéptidos sintetizados mediante la expresión de un polinucleótido en una célula huésped.

En algunas realizaciones, la proteína factor de coagulación puede ser una proteína recombinante, una proteína natural o una proteína sintética. En determinadas realizaciones, es una proteína recombinante. En algunas realizaciones, se administra al sujeto un conjugado que comprende una proteína factor de coagulación, variante fragmento antigénico que tiene la misma secuencia de aminoácidos como la proteína factor de coagulación usada en terapia de sustitución en el sujeto.

En algunas realizaciones, los factores de coagulación son de origen mamífero. En algunas realizaciones, las proteínas factores de coagulación tienen un origen seleccionado del grupo que consiste en seres humanos, primates no humanos, ratones, ratas, cerdos, gatos, perros, vacas, caballos, conejos y monos. En una realización, la proteína factor de coagulación es una proteína humana.

En una realización, la proteína factor de coagulación es el FVIII humano recombinante o un fragmento antigénico o variante del mismo.

En otra realización, la proteína factor de coagulación es el FVIII recombinante de longitud completa basado en la secuencia de aminoácidos del producto KOGENATE. En algunas realizaciones, la proteína factor de coagulación se selecciona del grupo que consiste en la SEC ID N° 1, la SEC ID N° 2 y una combinación de las mismas.

En otra realización, la proteína factor de coagulación es un FVIII recombinante con delección del dominio B. En algunas realizaciones, el FVIII recombinante con delección del dominio B se selecciona del grupo que consiste en la SEC ID N° 5, la SEC ID N° 6 y una combinación de las mismas.

En otra realización, la proteína factor de coagulación es el FVIII recombinante de longitud completa basado en cualquier secuencia de aminoácidos del FVIII humano hallada en la naturaleza.

En otra realización, la proteína factor de coagulación es cualquier producto de FVIII usado en terapia de sustitución.

En otra realización, la proteína factor de coagulación es un FVIII recombinante con delección del dominio B basado en cualquier secuencia de aminoácidos de FVIII humano en el que el dominio B se ha delecionado completamente o en parte. Los conjugados también pueden comprender variantes de una proteína factor de coagulación. El término "variante", aplicado a proteínas como se usa en el presente documento, es una proteína que difiere de una proteína de referencia. Ejemplos de variantes en este sentido se describen a continuación y en otros lugares de la presente divulgación con mayor detalle. Con referencia a las proteínas, generalmente, las diferencias se pueden limitar de manera que las secuencias de la referencia y la variante sean estrechamente similares en conjunto y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y proteína de referencia se puede diferenciar en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, delecciones, fusiones y truncamientos, que pueden estar presentes en cualquier combinación. Las variantes también pueden abarcar proteínas que tengan la misma secuencia de aminoácidos como secuencia de referencia pero que exhiban diferencias con respecto a una o más modificaciones postraduccionales, tales como glicosilación o pegilación.

En algunas realizaciones, la proteína factor de coagulación es una variante que se ha modificado mediante unión con uno o más polímeros compatibles para mejorar, por ejemplo, la semivida o la estabilidad. Polímeros biocompatibles adecuados incluyen óxidos de polialquileno tales como, sin limitaciones, polietilenglicol (PEG), dextranos, ácidos colomínicos u otros polímeros basados en hidratos de carbono, polímeros de aminoácidos, derivados de biotina, alcohol polivinílico (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, polietileno-co-ácido maleico anhídrido, poliestireno-co-ácido málico anhídrido, polioxazolina, poliacriloil morfolina, heparina, albúmina, celulosas, hidrolizados de quitosano, almidones tales como almidones-hidroxietilo y almidones-hidroxipropilo, glucógeno, agarosas y derivados de las mismas, goma guar, pululara, inulina, goma xantana, carragenina, pectina, hidrolizados de ácido algínico, otros biopolímeros y equivalentes de los mismos. En una realización, el polímero es polietilenglicol (PEG). En otra realización, el polímero es metoxipolietilenglicol (mPEG). Otros compuestos de polialquilenglicol útiles son polipropilenglicoles (PPG), polibutilenglicoles (PBG), PEG-éteres de glicidilo (Epoxy-PEG), PEG-oxycarbonilimidazol (CDI-PEG), polietilenglicoles ramificados, polietilenglicoles lineales, polietilenglicoles en horquilla y polietilenglicoles de múltiples ramas o "súper ramificados" (PEG en estrella).

"PEG" y "polietilenglicol" como se usan en el presente documento son intercambiables e incluyen cualquier poli(óxido de etileno) hidrosoluble. Normalmente, los PEG para usar de acuerdo con las realizaciones comprenden la estructura siguiente $--(OCH_2CH_2)_n--$ donde (n) es de 2 a 4.000. Como se usa en el presente documento, PEG también incluye $--CH_2CH_2--O(CH_2CH_2O)_n--CH_2CH_2--$ y $--(OCH_2CH_2)_nO--$. A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, debe recordarse que el término "PEG" incluye estructuras que tienen varios grupos terminales o de "recubrimiento del extremo", tales como, sin limitaciones, un grupo hidroxilo o alcoxi C₁₋₂₀. El término "PEG" también significa un polímero que contiene una mayoría, es decir, superior al 50% de subunidades de repetición de $--OCH_2CH_2--$. Con respecto a formas específicas, el PEG puede tomar un número cualquiera de varios pesos moleculares, así como estructuras o geometrías, tales como ramificadas, lineales, en horquilla y multifuncionales. La pegilación es un proceso por el cual un polietilenglicol (PEG) está unido covalentemente a una molécula, tal como una proteína. En algunas realizaciones, la pegilación puede potenciar la semivida de la proteína tras la administración. En algunas realizaciones, el factor de coagulación está conjugado a PEG. En una realización, el factor de coagulación es FVIII y está conjugado a PEG 1) directamente con 1 o más hidratos de carbono preexistentes sobre cualquier dominio del FVIII; 2) directamente con cualquier cisteína disponible o modificada mediante ingeniería sobre cualquier dominio de FVIII; 3) con cualquier otro aminoácidos en el FVIII; o 4) cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la proteína factor de coagulación o variante o fragmento antigénico de la misma puede estar mutada en un sitio predeterminado y, después, unida covalentemente en dicho sitio a un polímero biocompatible. En, por ejemplo, la publicación de solicitud de EE.UU. N° 2006/0115876 se pueden encontrar procedimientos de unir polímeros biocompatibles a factores de coagulación. El polímero biocompatible que se puede usar en los conjugados de las realizaciones puede ser cualquiera de los polímeros tratados en lo que antecede. El polímero biocompatible se puede seleccionar para proporcionar la mejora deseada en la farmacocinética. Por ejemplo, en algunas realizaciones se seleccionan la identidad, el tamaño y la estructura del polímero con objeto de mejorar la semivida en circulación del polipéptido o disminuir la antigenicidad del polipéptido sin una disminución inaceptable de la actividad. En algunas realizaciones, el polímero comprende PEEG y en algunas realizaciones tiene al menos un 50% de su peso molecular como PEG. En una realización, el polímero es un polietileno recubierto terminalmente con glicol con un resto de recubrimiento terminal, tal como hidroxilo, alcoxi, alcoxi sustituido, alquenoxi, alquenoxi sustituido, alquinox, alquinox sustituido, ariloxi y ariloxi sustituido. En una realización, el polímero comprende metoxipolietilenglicol. En otras realizaciones, los polímeros comprenden metoxipolietilenglicol que tiene un tamaño en el intervalo de 3 kDa a 100 kDa, de 5 kDa a 64 kDa o de 5 kDa a 43 kDa.

En algunas realizaciones, el polímero biocompatible tiene un resto reactivo. Por ejemplo, en una realización, el polímero tiene un resto reactivo de sulfhidrilo que puede reaccionar con una cisteína libre sobre un polipéptido para formar un enlace covalente. Dichos restos reactivos de sulfhidrilo incluyen restos de tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, S-piridilo o maleimida. En algunas realizaciones, el resto reactivo es un resto de maleimida. En una realización, el polímero es lineal y tiene un "capuchón" en un extremo que no es fuertemente reactivo con los sulfhidrilos (tal como metoxi) y un resto reactivo de sulfhidrilo en el otro extremo. En una realización, el conjugado comprende PEG-maleimida y tiene un tamaño en el intervalo de 5 kDa a 64 kD.

La mutación dirigida a sitio de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido factor de coagulación o fragmento antigénico o variante del mismo se puede producir por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Algunos procedimientos incluyen mutagénesis para introducir un codón de cisteína en el sitio elegido para la unión covalente del polímero. Esto se puede conseguir usando un kit de mutagénesis dirigida a sitio disponible comercialmente, tal como Stratagene cQuickChange™. El kit de mutagénesis dirigida a sitio II, el kit de mutagénesis dirigida a sitio de Clontech Transformer N° K1600-1, el sistema de mutagénesis dirigida a sitio de Invitrogen GenTaylor N° 12397014, el kit del sistema de mutagénesis *in vitro* de Promega Altered Sites II N° Q6210, o el kit de mutagénesis por PCR de Takara Mirus Bio LA PCR N° TAK RR016.

En algunas realizaciones, las variantes que comprenden un polímero biocompatible se pueden preparar sustituyendo primero el codón para uno o más aminoácidos en la superficie del polipéptido por un codón para cisteína, produciendo la variante de cisteína en un sistema de expresión recombinante, haciendo reaccionar la variante con un reactivo polimérico específico de cisteína y purificando la variante. En este sistema, la adición de un polímero en el sitio de la cisteína se puede conseguir mediante una funcionalidad activa de maleimida en el polímero. La cantidad del polímero reactivo de sulfhidrilo usada puede ser al menos equimolar con la cantidad molar de cisteínas que se van a derivar y en algunas realizaciones está presente en exceso. En algunas realizaciones se usa a menos un exceso molar de 5 veces del polímero reactivo de sulfhidrilo o se usa un exceso de al menos diez veces de dicho polímero. Otras condiciones útiles para la unión covalente están dentro de la experiencia de los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, la variante comprende una proteína en la que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado y dicho residuo de aminoácido sustituido puede o no ser uno codificado por el código genérico. Las sustituciones conservadoras son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en una proteína por otro aminoácido de características similares. En algunas realizaciones, la variante es una variante conservadora que tiene una identidad de al menos aproximadamente un 80% con el antígeno original y las sustituciones entre la secuencia de la variante antigénica y el antígeno original son sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las siguientes sustituciones se consideran sustituciones de aminoácidos conservadoras: la valina, la isoleucina o la leucina están sustituidas por alanina; la lisina, la glutamina o la asparagina están sustituidas por arginina; la glutamina, la histidina, la lisina o la arginina están sustituidas por asparagina; el ácido glutámico está sustituido por ácido aspártico; la serina está sustituida por cisteína; la asparagina está sustituida por glutamina; el ácido aspártico está sustituido por ácido glutámico; la prolina o la alanina están sustituidas por glicina; la asparagina, la glutamina, la lisina o la arginina están sustituidas por histidina; la leucina, la valina, la metionina, la alanina, la fenilalanina o la norleucina están sustituidas por isoleucina; la norleucina, la isoleucina, la valina, la metionina, la alanina o la fenilalanina están sustituidas por leucina; la arginina, la glutamina o la asparagina están sustituidas por lisina; la leucina, la fenilalanina o la isoleucina están sustituidas por metionina; la leucina, la valina, la isoleucina, la alanina o la tirosina están sustituidas por fenilalanina; la alanina está sustituida por prolina; la treonina está sustituida por serina; la serina está sustituida por treonina; la tirosina o la fenilalanina están sustituidas por triptófano; el triptófano, la fenilalanina, la fenilalanina, la treonina o la serina están sustituidas por tirosina; la isoleucina, la leucina, la metionina, la fenilalanina, la alanina o la norleucina están sustituidas por valina. En algunas realizaciones, la variante es una variante conservadora que tiene una identidad de al menos aproximadamente un 90% con el antígeno original.

En algunas realizaciones, la variante comprende una proteína en la que uno o más residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente. En algunas realizaciones, la variante comprende una proteína que está fusionada con uno o más de otros compuestos. En algunas realizaciones, la variante comprende una proteína en la cual aminoácidos adicionales están fusionados con la proteína madura, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se usa para la purificación de la proteína madura o una secuencia de la proproteína. Se cree que los expertos en la técnica obtienen dichas variantes a partir de las enseñanzas del presente documento.

En algunas realizaciones, la variante tiene al menos un 100% de la actividad de la proteína nativa. En algunas realizaciones, la variante tiene al menos un 50% de la actividad de la proteína factor de coagulación nativa. En algunas realizaciones, la variante tiene al menos un 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más de la actividad de la proteína factor de coagulación nativa.

En algunas realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o ningún residuo de aminoácidos están sustituidos, delecionados o añadidos, en ninguna combinación. En algunas realizaciones, la proteína factor de coagulación comprende sustituciones, adiciones y deleciones silenciosas, que no alteran las propiedades y las actividades de la proteína factor de coagulación.

En algunas realizaciones, las variantes incluyen porciones de una secuencia de referencia que generalmente contiene al menos 30 aminoácidos contiguos o al menos 50-100 aminoácidos contiguos que son idénticos a los de la secuencia de referencia.

En algunas realizaciones, las proteínas se proporcionan en forma aislada y en algunas realizaciones están purificadas hasta una homogeneidad sustancial usando procedimientos y técnicas conocidos de asilamiento y purificación de proteínas.

Los conjugados de las realizaciones también pueden comprender un fragmento antigénico de las proteínas factor de coagulación. A este respecto, un fragmento antigénico es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es enteramente igual a parte, pero no a toda, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de referencia mencionados anteriormente y variantes de los mismos y que es capaz de generar una respuesta de anticuerpo. Un

El fragmento antigénico puede tener cualquier longitud, pero, más típicamente, tiene al menos aproximadamente 6 aminoácidos, al menos aproximadamente 9 aminoácidos, al menos aproximadamente 12 aminoácidos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos, al menos aproximadamente 50 aminoácidos o al menos aproximadamente 100 aminoácidos. También se contemplan fragmentos antigénicos más grandes.

Dichos fragmentos antigénicos pueden estar "libres", es decir sin formar parte o estar fusionados con otros aminoácidos o polipéptidos, o pueden estar comprendidos dentro de un polipéptido más grande del que forman parte o son una región. Cuando están comprendidos dentro de un polipéptido más grande, los fragmentos tratados en el presente documento en algunas realizaciones forman una única región continua. No obstante, varios fragmentos pueden estar comprendidos dentro de un único polipéptido más grande. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un fragmento antigénico de un polipéptido de las presentes realizaciones puede estar comprendido dentro de un polipéptido precursor diseñado para su expresión en un huésped y que tiene regiones pre y/o propolipeptídicas heterólogas fusionadas con el extremo amino del fragmento antigénico y/o una región adicional fusionada con el extremo carboxilo del fragmento. Por tanto, fragmentos en un aspecto del significado pretendido en el presente documento, hacen referencia a la porción o porciones de un polipéptido de fusión o proteína de fusión derivados de una proteína de factor de coagulación.

Ejemplos representativos de fragmentos polipeptídicos antigénicos de las realizaciones incluyen, por ejemplo, aquellos que tienen de aproximadamente 5-15, 10-20, 15-40, 30-55, 41-75, 41-80, 41-90, 50-100, 75-100, 90-115, 100-125, y 110-140 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones, el polipéptido forma parte de una proteína de fusión codificada por una molécula de ácido nucleico recombinante, casete de expresión o vector de expresión y es heterólogo del péptido señal de la proteína de fusión.

En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica el polipéptido está optimizado por codones para su expresión en la célula huésped. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de un fragmento antigénico tiene una identidad de al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 98% con la proteína original.

Factor VII (FVII)

El FVII es una proteína plasmática dependiente de vitamina K sintetizada en el hígado y secretada en la sangre como una glicoproteína monocaténaria con un peso molecular de 53 kDa (Broze & Majerus, *J. Biol. Chem* 1980; 255:1242-1247 (1980)). El zimógeno del FVIII se convierte en una forma activada (FVIIa) mediante escisión proteolítica en un único sitio, R152-I153, que tiene como resultado dos cadenas unidas por un único puente disulfuro. El FVIIa en complejo con el factor tisular (complejo FVIIa) es capaz de convertir tanto el factor IX como el factor X en sus formas activadas, seguido de reacciones que conducen a una rápida producción de trombina y formación de fibrina (Osterud & Rapaport, *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:5260-5264 (1977)).

El gen que codifica para el FVII humano (hFVII) se ha mapeado hasta el cromosoma 13 en el q34-qter 9 (de Grouchy *et al.*, *Hum Genet* 66:230-233 (1984)). Contiene nueve exones y abarca 12,9 Kb (O'Hara *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5158-5162 (1987)). La organización génica y la estructura proteica de FVII son similares a las de las proteína procoagulantes dependiente de la vitamina K, con los exones 1a y 1b que codifican la secuencia señal; el exón 2 el propéptido y el dominio Gla; el exón 3 una región hidrófoba corta; los exones 4 y 5 los dominios similares del factor de crecimiento epidérmico; y el exón 6 al 8, el dominio catalítico de la serina proteasa (Yoshitake *et al.*, *Biochemistry* 1985; 24: 3736-3750). Las preparaciones comerciales del FVIIa recombinante humano se comercializan como NOVOSEVEN. NOVOSEVEN está indicado para el tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A o B.

Las moléculas del FVII útiles para las presentes realizaciones incluyen la proteína de longitud completa, los precursores de la proteína, subunidad es y fragmentos de la proteína y variantes y fragmentos antigénicos de los mismos. Con las referencias al FVII se pretende incluir todas las formas potenciales de dichas proteínas.

En algunas realizaciones, el polipéptido FVII comprende la SEC ID N° 9, aunque son posibles todas las variantes alélicas. El factor VII, variantes, fragmentos y/o procedimientos de realización de los mismos también útiles en las realizaciones se describen en, por ejemplo, las siguientes publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. y patentes de EE.UU. N° 20130084274; 20130017184; 20120321607; 20120263701; 20120208860; 20120178693; 20120171765; 20120115204; 20120087908; 20120064075; 20120004176; 20120003206; 20110250702;

20110097754; 20110064719; 20110059894; 20110059510; 20110046061; 20110045535; 20110040073;
 20110003363; 20100330059; 20100303786; 20100294677; 20100260741; 20100197597; 20100166730;
 20100166729; 20100158891; 20100145009; 20100124547; 20100120093; 20100113743; 20100056453;
 20100015684; 20100009396; 20090311239; 20090305967; 20090291890; 20090281022; 20090264511;
 5 20090263866; 20090239788; 20090227504; 20090221484; 20090181895; 20090162871; 20090130085;
 20090104661; 20090098103; 20090093616; 20090093410; 20090087864; 20090075895; 20090055942;
 20090047723; 20090043080; 20090042784; 20090041747; 20090023635; 20090017007; 20090011992;
 20080318276; 20080312161; 20080286259; 20080274534; 20080268521; 20080227715; 20080206227;
 20080206225; 20080175878; 20080145914; 20080102064; 20080076702; 20080075711; 20080075709;
 10 20080069810; 20080058266; 20080058255; 20080057059; 20080039373; 20080010693; 20070243588;
 20070219135; 20070207960; 20070207956; 20070190574; 20070142625; 20070142280; 20070129298;
 20070122884; 20070099229; 20070049523; 20070037966; 20070027077; 20070021338; 20060293241;
 20060276398; 20060276377; 20060270002; 20060270001; 20060270000; 20060258585; 20060252690;
 20060252689; 20060252129; 20060252127; 20060252039; 20060240525; 20060240524; 20060234935;
 15 20060228782; 20060211621; 20060205648; 20060205036; 20060183683; 20060166915; 20060166882;
 20060111282; 20060063714; 20060052286; 20060045879; 20060030531; 20060025336; 20060019336;
 20060013812; 20050267014; 20050266006; 20050204411; 20050204406; 20050202002; 20050113565;
 20050075289; 20050032690; 20050032109; 20040258690; 20040248793; 20040197370; 20040192602;
 20040186277; 20040117862; 20040087498; 20040063187; 20040043933; 20040037893; 20040009918;
 20 20040009543; 20040006020; 20030215447; 20030203845; 20030170863; 20030152567; 20030130191;
 20030125256; 20030124622; 20030124118; 20030119743; 20030119741; 20030119723; 20030118582;
 20030118580; 20030118574; 20030109446; 20030104978; 20030100740; 20030100075; 20030096338;
 20030077271; 20030044908; 20030040480; 20030003096; 20020151471; 20020142316; 20020137673;
 20020110552; 20010007901; 8.334.273; 8.318.904; 8.299.029; 8.084.591; 8.053.410; 8.026.214; 8.022.031;
 25 8.008.252; 7.951.910; 7.943.333; 7.892.842; 7.879.803; 7.871.985; 7.863.009; 7.829.095; 7.803.569; 7.790.852;
 7.786.070; 7.754.682; 7.732.405; 7.700.733; 7.622.558; 7.598.056; 7.517.974; 7.511.024; 7.442.524; 7.442.514;
 7.427.592; 7.419.803; 7.416.861; 7.416.860; 7.414.022; 7.371.543; 7.291.587; 7.235.638; 7.202.065; 7.176.288;
 7.153.679; 7.125.846; 7.078.479; 7.052.868; 7.026.524; 6.960.657; 6.919.311; 6.911.334; 6.911.323; 6.905.683;
 6.903.069; 6.835.817; 6.831.167; 6.806.063; 6.777.390; 6.677.440; 6.573.056; 6.528.299; 6.479.245; 6.329.176;
 30 6.268.163; 6.183.743; 6.168.789; 6.039.944; 5.997.864; 5.968.759; 5.962.418; 5.948.759; 5.874.408; 5.861.374;
 5.859.010; 5.833.982; 5.824.639; 5.817.788; 5.788.965; 5.750.358; 5.741.658; 5.700.914; 5.472.850; 5.344.918;
 5.288.629; 5.190.919; 4.784.950; 4.456.591; y 3.962.427.

Factor VIII (FVIII)

El FVIII de coagulación sanguínea es una glicoproteína sintetizada y liberada en la corriente sanguínea por el
 35 hígado. Como proteína secretada, el FVIII contiene una secuencia señal que se escinde proteolíticamente durante el
 proceso de traducción. Tras la eliminación de la secuencia señal de 19 aminoácidos, el primer aminoácido del
 producto FVIII secretado es una alanina. En la circulación sanguínea, está unido al factor de von Willebrand (vWF,
 también conocido como antígeno relacionado con el factor VIII) para formar un complejo estable. Tras la activación
 por trombina, se disocia del complejo para interactuar con otros factores de coagulación en la cascada de
 40 coagulación que, en última instancia, conduce a la formación de un trombo,

El propio FVIII no produce coagulación pero desempeña un papel esencial en la cascada de coagulación. El papel
 del FVIII en la coagulación se va a activar a FIBA, que es un cofactor catalítico para la activación intrínseca del FX
 (Thompson, *Semin. Thromb. Hemost.* 29:11-22 (2003)). El FVIII se activa proteolíticamente por acción de la
 45 trombina o el FXa, que lo disocia del factor de von Willebrand (vWf) y activa su función procoagulación en la
 cascada. En su forma activa, el FVIIIa funciona como cofactor para la activación del complejo enzimático del FX en
 la vía intrínseca de la coagulación sanguínea y disminuye o es no funcional en pacientes con hemofilia A.

En algunas realizaciones, el FVIII útil con las presentes realizaciones incluye las formas que son biológicamente
 activas, incluyendo la FVIII de longitud completa o cualquier capacidad derivada de acción como cofactor en la
 activación del FIX de coagulación y la capacidad de formar un complejo con VWF. En algunas realizaciones, el FVIII
 50 usado de acuerdo con las presentes realizaciones puede ser un FVIII derivado de plasma (pdFVIII) o un FVIII
 recombinante (rFVIII) o derivados biológicamente activos de los mismos. El pdFVIII y el rFVIII se pueden producir
 por cualquier procedimiento conocido en la técnica. El PdFVIII se puede purificar por cualquier medio adecuado. Un
 procedimiento útil se describe en la patente de EE.UU. N° 5.470.954. Las proteínas de rFVIII se pueden preparar por
 cualquier medio adecuado. Ejemplos de dichos rFVIII incluyen Recombinate™ y Advate®, ambos fabricados y
 55 comercializados por Baxter Healthcare Corporation; ReFacto®, una forma con delección del dominio B del FVIII
 fabricado y comercializado por Wyeth Corporation; y KOGENATE, fabricado y comercializado por Bayer Corporation.
 Procedimientos y ejemplos de rFVIII se describen en las patentes de EE.UU. N° 4.757.006, 4.965.199 y 5.618.788.
 Otras preparaciones comerciales del FVIII que se pueden usar para inducir tolerancia incluyen Alphanate®,
 Bioclata®, Helixate® FS, Hemofil® M, Humate-P®, Hyate C®, Koate®-DVI, Kogenate® FS, Monarc-M™, Monarc-M™,
 60 Monarc-M® y Monoclate-P®.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de FVIII incluyen variaciones alélicas, versiones glicosiladas,
 modificaciones y fragmentos que tienen como resultado derivados del FVIII siempre que contengan el segmento

funcional del FVIII humano y la actividad funcional del FVIII humano característica esencial.

En algunas realizaciones, las moléculas del FVIII incluyen la proteína de longitud completa, los precursores de la proteína, subunidad es y fragmentos de la proteína y variantes y fragmentos antigénicos de los mismos. Con las referencias al FVIII se pretende incluir todas las formas potenciales de dichas proteínas.

- 5 En algunas realizaciones, los polipéptidos de FVIII comprenden FVIII humano de longitud completa. En algunas realizaciones, el FVIII de longitud completa comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N° 1, la SEC ID N° 2 y una combinación de las mismas, aunque las variantes alélicas son posibles. Como proteína secretada, el FVIII contiene una secuencia señal que se escinde proteolíticamente durante el proceso de traducción. Tras la eliminación de la secuencia señal de 19 aminoácidos, el primer aminoácido del producto FVIII secretado es una alanina.

- 10 En algunas realizaciones, el FVIII humano es FVIII con delección del dominio B (BDD). Como se usa en el presente documento, el BDD se caracteriza por tener la secuencia de aminoácidos que contiene una delección de todos a excepción de 14 aminoácidos del dominio B del FVIII. Los primeros 4 aminoácidos del dominio B (SE CID N° 3) están unidos a los últimos 10 residuos del dominio B (NPPVLKRHQR, SEC ID N° 4). En algunas realizaciones, el FVIII BDD comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N° 5 y la SEC ID N° 6 y una combinación de las mismas.

- El factor VIII, variantes, fragmentos y/o procedimientos de realización de los mismos también útiles en las realizaciones se describen en, por ejemplo, las siguientes publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. y patentes de EE.UU. N° 20130085110; 20130072434; 20130040889; 20130040888; 20130017997; 20130012442; 20130005656; 20130004462; 20120322737; 20120308641; 20120270266; 20120245289; 20120244597; 20120232252; 20120225819; 20120190623; 20120178692; 20120178691; 20120142594; 20120142593; 20120093840; 20120083446; 20120065136; 20120045819; 20120028900; 20110286988; 20110262424; 20110206651; 20110183907; 20110178019; 20110160435; 20110124565; 20110118188; 20110112028; 20110112027; 20110112026; 20110112025; 20110112024; 20110112023; 20110112022; 20110077203; 20110039302; 20100305305; 20100292440; 20100284971; 20100261872; 20100256062; 20100233119; 20100204452; 20100197578; 20100183556; 20100173831; 20100173830; 20100172891; 20100168391; 20100168018; 20100167392; 20100130427; 20100125049; 20100120689; 20100120094; 20100113365; 20100113364; 20100112641; 20100099113; 20100003254; 20090325881; 20090305349; 20090297503; 20090297498; 20090275141; 20090271163; 20090263380; 20090247459; 20090215070; 20090215025; 20090208512; 20090203077; 20090130094; 20090118185; 20090118184; 20090076237; 20090041714; 20080312143; 20080300174; 20080234193; 20080219983; 20080206254; 20080176791; 20080160015; 20080076702; 20080070275; 20080070251; 20080058504; 20080044430; 20070275880; 20070265199; 20070244301; 20070232789; 20070232788; 20070215475; 20070135342; 20070065425; 20060293505; 20060293238; 20060276398; 20060239998; 20060233786; 20060205661; 20060193829; 20060160994; 20060099685; 20060051367; 20060014683; 20050276787; 20050256304; 20050256038; 20050229261; 20050165221; 20050118684; 20050100990; 20050079584; 20050074836; 20050060775; 20050009148; 20040249134; 20040248785; 20040235734; 20040197875; 20040197390; 20040166150; 20040147436; 20040126774; 20040120951; 20040116345; 20040092442; 20040087776; 20040062752; 20040038396; 20030199444; 20030166536; 20030165822; 20030148953; 20030147900; 20030134778; 20030129174; 20030106798; 20030099618; 20030083257; 20030077752; 20030068785; 20020182684; 20020182670; 20020159977; 20020146729; 20020132306; 20020115832; 20020115152; 20020102730; 20020068303; 20010010815; 8.399.620; 8.372.800; 8.349.800; 8.338.571; 8.329.871; 8.309.086; 8.293.234; 8.282.923; 8.252.287; 8.247.536; 8.236.518; 8.198.421; 8.188.246; 8.183.345; 8.183.344; 8.173.597; 8.143.378; 8.133.977; 8.133.865; 8.110.190; 8.076.292; 8.071.728; 8.071.727; 8.071.726; 8.071.725; 8.071.724; 8.071.094; 8.067.543; 8.058.226; 8.058.017; 8.053.561; 8.038.993; 8.003.760; 7.985.839; 7.985.838; 7.982.010; 7.981.865; 7.960.182; 7.932.355; 7.884.075; 7.867.974; 7.863.421; 7.858.749; 7.855.274; 7.829.085; 7.820.796; 7.790.680; 7.785.594; 7.691.565; 7.683.158; 7.678.761; 7.645.860; 7.635.763; 7.615.622; 7.582.296; 7.560.107; 7.544.660; 7.507.540; 7.459.534; 7.459.525; 7.351.577; 7.247.707; 7.214.785; 7.211.559; 7.199.223; 7.157.277; 7.144.487; 7.122.634; 7.112.438; 7.087.723; 7.041.635; 7.033.791; 7.012.132; 6.967.239; 6.930.087; 6.887.852; 6.866.848; 6.838.437; 6.800.461; 6.780.614; 6.770.744; 6.759.216; 6.683.159; 6.599.724; 6.593.294; 6.586.573; 6.518.482; 6.517.830; 6.492.105; 6.458.563; 6.376.463; 6.358.703; 6.355.422; 6.346.513; 6.316.226; 6.307.032; 6.284.871; 6.271.025; 6.255.554; 6.251.632; 6.221.349; 6.200.560; 6.197.526; 6.191.256; 6.180.371; 6.171.825; 6.143.179; 6.057.164; 6.037.452; 6.005.082; 5.998.589; 5.994.310; 5.972.885; 5.962.650; 5.952.198; 5.925.739; 5.919.908; 5.919.766; 5.888.974; 5.880.327; 5.859.204; 5.831.026; 5.824.780; 5.804.420; 5.763.401; 5.747.337; 5.744.446; 5.733.873; 5.714.590; 5.707.832; 5.693.499; 5.681.746; 5.679.776; 5.679.549; 5.668.108; 5.663.060; 5.661.008; 5.659.017; 5.633.150; 5.618.789; 5.618.788; 5.610.278; 5.605.884; 5.597.711; 5.583.209; 5.576.291; 5.565.427; 5.543.502; 5.543.145; 5.506.112; 5.470.954; 5.424.401; 5.422.250; 5.410.022; 5.399.670; 5.371.195; 5.364.771; 5.362.854; 5.356.878; 5.328.694; 5.288.853; 5.260.274; 5.259.951; 5.214.033; 5.177.191; 5.171.844; 5.112.950; 5.110.907; 5.101.016; 5.091.363; 5.043.429; 5.043.428; 4.981.951; 4.970.300; 4.965.199; 4.886.876; 4.857.635; 4.845.074; 4.822.872; 4.814.435; 4.789.733; 4.769.336; 4.675.385; 4.657.894; 4.650.858; 4.649.132; 4.578.218; 4.556.558; RE32.011; 4.522.751; 4.456.590; 4.446.134; 4.406.886; 4.404.131; 4.387.092; 4.383.989; 4.370.264; 4.361.509; 4.359.463; 4.348.384; 4.348.315; 4.302.445; 4.289.691; 4.250.008; 4.235.881; 4.221.780; 4.203.891; 4.188.318; 4.093.608; 4.085.095; 4.069.216; y 4.027.013.

En algunas realizaciones, el FVIII se puede modificar con un polímero biocompatible, tal como PEG. Las formas pegiladas del factor VIII se divulgan en el documento WO 2006/053299 y en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. N° 20060115876.

En los ejemplos del FVIII siguientes, las muteínas del FVIII se nombran de un modo convencional en la técnica. Como se usa en el presente documento, una "muteína" es una proteína modificada genéticamente que aparece como resultado de una mutación inducida en laboratorio en una proteína o polipéptido. La convención para nombrar los mutantes se basa en la secuencia de aminoácidos del Factor VIII de longitud completa maduro tal como se proporciona en la SEC ID N° 2.

Como es convencional y se usa en el presente documento, al hacer referencia a aminoácidos mutados en el FVIII BDD, el aminoácido mutado se designa por su posición en la secuencia del FVIII de longitud completa. Por ejemplo, la muteína PEG6 que de trata más adelante se designa K1808C porque cambia la lisina (K) en la posición análoga a 1808 en la secuencia de longitud completa a cisteína (C). En algunas realizaciones, para los mutantes que se tratan a continuación, una cisteína reemplaza el aminoácido natural en la localización designada del FVIII de longitud completa o el FVIII con delección del dominio B, y un polímero biocompatible, tal como PEG, está unido al residuo de cisteína.

El sitio predefinido para la unión covalente de un polímero biocompatible, tal como PEG, se selecciona mejor de sitios expuestos sobre la superficie del polipéptido que no están implicados en la actividad del FVIII o implicados en otros mecanismos que estabilizan el FVIII in vivo, tal como la unión a vWF. Dichos sitios también se seleccionan mejor de los sitios que se sabe que están implicados en mecanismos por los cuales el FVIII se desactiva o elimina de la circulación. La selección de estos sitios se trata con detalle a continuación. En algunas realizaciones, los sitios incluyen un residuo de aminoácidos en o cerca de un sitio de unión para (a) la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad, (b) un proteoglicano de heparina sulfato, (c) el receptor de lipoproteínas de baja densidad y/o (d) anticuerpos inhibidores del factor VIII. Por "en o cerca de un sitio de unión" se quiere decir un residuo que está suficientemente cerca de un sitio de unión de un modo tal que la unión covalente de un polímero biocompatible al sitio tendría como resultado hidrancia estérica del sitio de unión. Cabe esperar que un sitio de este tipo esté, por ejemplo, a 20 Angstroms de un sitio de unión.

En una realización, el polímero biocompatible está unido de forma covalente al polipéptido del factor VIII funcional en un residuo de aminoácidos en o cerca de (a) un receptor de aclaramiento del factor VIII como se ha definido anteriormente, (b) un sitio de unión para una proteasa capaz de degradar el factor VIII y/o (c) un sitio de unión para los anticuerpos inhibidores del factor VIII. La proteasa puede ser la proteína C activada (APC). En otra realización, el polímero biocompatible está unido covalentemente en el sitio predefinido en el polipéptido del factor VIII funcional de forma que la unión de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad al polipéptido es menor que al polipéptido cuando no está conjugado, y, en algunas realizaciones, más de dos veces menor. En una realización, el polímero biocompatible está unido covalentemente en el sitio predefinido en el polipéptido del factor VIII funcional de forma que la unión de los proteoglicanos de heparina sulfato al polipéptido es menor que al polipéptido cuando no está conjugado, y, en algunas realizaciones, es más de dos veces menor. En una realización adicional, el polímero biocompatible está unido covalentemente en el sitio predefinido en el polipéptido del factor VIII funcional de forma que la unión de los anticuerpos inhibidores del factor VIII al polipéptido es menor que al polipéptido cuando no está conjugado, en algunas realizaciones, es más de dos veces menor que la unión al polipéptido cuando no está conjugado. En otra realización, el polímero biocompatible está unido covalentemente en el sitio predefinido en el polipéptido del factor VIII funcional de forma que la unión del receptor de lipoproteínas de baja densidad al polipéptido es menor que al polipéptido cuando no está conjugado, en algunas realizaciones, más de dos veces menor. En otra realización, el polímero biocompatible está unido covalentemente en el sitio predefinido en el polipéptido del factor VIII funcional de forma que la proteasa plasmática degrada el polipéptido menos que cuando el polipéptido no está conjugado. En una realización adicional, la degradación del polipéptido por la proteasa plasmática es más de os veces menor que la degradación del polipéptido cuando no está conjugado medida en las mismas condiciones durante el mismo periodo de tiempo.

La afinidad de unión a LRP, al receptor de LDL o a HSPG para FVIII se puede determinar usando tecnología de resonancia en plasmón superficial (Biacore). Por ejemplo, el FVIII se puede recubrir directa o indirectamente a través de un anticuerpo del FVIII en un chip Biacore y se pueden pasar varias concentraciones de LRP sobre el chip para medir la constante de disociación y de asociación de la interacción (Bovenschen N. *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.* 278(11), pág. 9370-7). La proporción de las dos constantes da una medida de la afinidad. En algunas realizaciones sería deseable una disminución por dos, cinco, diez o 30 de la afinidad tras la PEGilación.

La degradación de un FVIII por la proteasa APC se puede medir por cualquiera de los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización, el polímero biocompatible está unido covalentemente al polipéptido en una o más de las posiciones de aminoácidos 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 y 2284 del FVIII (SEC ID N° 2). En otra realización, el polímero biocompatible está unido covalentemente al polipéptido en una o más de las posiciones de aminoácidos 377, 378, 468, 491, 504, 556, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911 y 2284 del factor VIII (SEC ID N° 2) y (1)

la unión del conjugado a la proteína relacionada con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad es menor que la unión del polipéptido no conjugado a la proteína relacionada con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad, (2) la unión del conjugado al receptor de las lipoproteínas de baja densidad es menor que la unión del polipéptido no conjugado al receptor de las lipoproteínas de baja densidad o (3) la unión del conjugado a la proteína relacionada con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad y al receptor de las lipoproteínas de baja densidad es menor que la unión del polipéptido no conjugado a la proteína relacionada con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad y al receptor de las lipoproteínas de baja densidad. En una realización, el residuo 1804 en un FVIII con delección del dominio B está mutado a cisteína y conjugado a PEG.

En una realización adicional, el polímero biocompatible está unido covalentemente al polipéptido en una o más de las posiciones de aminoácidos 377, 378, 468, 491, 504, 556 and 711 del FVIII (SEC ID N° 2) y la unión del conjugado al proteoglicano de heparina sulfato es menor que la unión del polipéptido no conjugado al proteoglicano de heparina sulfato. En una realización adicional, el polímero biocompatible está unido covalentemente al polipéptido en una o más de las posiciones de aminoácidos 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 y 2284 del FVIII (SEC ID N° 2) y el conjugado tiene menos unión a los anticuerpos inhibidores del factor VIII que el polipéptido no conjugado. En una realización adicional, el polímero biocompatible está unido covalentemente al polipéptido en una o más de las posiciones de aminoácidos 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 y 2284 del FVIII (SEC ID N° 2) y en algunas realizaciones en una o más de las posiciones 377, 378, 468, 491, 504, 556, and 711 y el conjugado tiene menos degradación de una proteasa plasmática que puede degradar el factor VIII que el polipéptido no conjugado. En algunas realizaciones, la proteasa plasmática es la proteína C activada.

En una realización adicional, el polímero biocompatible está unido covalentemente al factor VIII con delección del dominio B en la posición de aminoácido 129, 491, 1804, y/o 1808, y en algunas realizaciones en 491 o 1808. En una realización adicional el polímero biocompatible está unido al polipéptido en la posición de aminoácido 1804 del factor VIII y comprende polietilenglicol. En algunas realizaciones, el uno o más sitios predefinidos para la unión del polímero biocompatible están controlados por una mutación de cisteína específica de sitio.

Uno o más sitios, en algunas realizaciones uno o dos, sobre el polipéptido del factor VIII funcional pueden ser los sitios predefinidos para la unión del polímero. En realizaciones concretas, el polipéptido está mono-PEGilado o di-PEGilado.

Las realizaciones también se refieren a un procedimiento para la preparación del conjugado que comprende mutar una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido del factor VIII funcional para sustituir una secuencia de codificación por un residuo de cisteína en un sitio predefinido; expresar la secuencia de nucleótidos mutada para producir una muteína potenciada con cisteína; purificar la muteína; hacer reaccionar la muteína con el polímero biocompatible que se ha activado para reaccionar con polipéptidos en sustancialmente los residuos de cisteína reducidos de forma que se forma el conjugado; y purificar el conjugado. Otra realización proporciona un procedimiento para la PEGilación dirigida a sitio de una muteína del factor VIII, que comprende: (a) expresar una muteína del factor VIII dirigida a sitio en la que la muteína tiene una sustitución de cisteína por un residuo de aminoácido sobre la superficie expuesta de la muteína del factor VIII y dicha cisteína está tapada con un capuchón; (b) poner en contacto la muteína de cisteína con un reductor en condiciones para reducir moderadamente la muteína de cisteína y liberar el capuchón; (c) eliminar el capuchón y el reductor de la muteína de cisteína; y (d) al menos aproximadamente 5 minutos y, en algunas realizaciones al menos 15 minutos, en algunas realizaciones al menos 30 minutos después de la eliminación del reductor, tratar la muteína de cisteína con PEG que comprende un resto de acoplamiento de sulfhidrilo en condiciones tales que se produzca la muteína del factor VIII PEGilado. El resto de acoplamiento de sulfhidrilo del PEG se selecciona del grupo que consiste en restos de tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, S-piridilo y maleimida, en algunas realizaciones maleimida.

En una realización, el procedimiento e la invención implica sustituir uno o más aminoácidos de BDD de la superficie con una cisteína, producir la muteína de cisteína en un sistema de expresión en mamíferos, reducir una cisteína que en la que se ha introducido un capuchón durante la expresión mediante cisteína del medio de crecimiento, eliminar el reductor para permitir que se vuelvan a formar los puentes disulfuro en BDD y hacer reaccionar con un reactivo de polímero biocompatible específico de cisteína, tal como PEG-maleimida. Ejemplos de dichos reactivos son PEG-maleimida con tamaños de PEG tales como 5, 22, o 43 kDa disponibles en Nektar Therapeutics of San Carlos, Calif. con los números de catálogo de Nektar 2D2M0H01 mPEG-MAL PM 5.000 Da, 2D2M0P01 mPEG-MAL PM 20 kD, 2D3X0P01 mPEG2-MAL PM 40 kD, respectivamente, o 12 o 33 kDa disponible en NOF Corporation, Tokio, Japón con el número de catálogo de NOF Sunbright ME-120MA y Sunbright ME-300MA, respectivamente. El producto PEGilado se purifica usando cromatografía de intercambio iónico para eliminar el PEG sin reaccionar y usando cromatografía de exclusión por tamaño para eliminar el BDD sin reaccionar. Este procedimiento se puede usar para identificar y proteger de forma selectiva cualquier interacción desfavorable con el FVIII tal como eliminación mediada por receptor, unión del anticuerpo inhibidor y degradación mediante enzimas proteolíticas. Se observó que el reactivo de PEG suministrado por Nektar o NOF como 5 kDa se analizó que era de 6 kDa en su laboratorio y, de forma similar, el reactivo PEG suministrado como 20 kDa lineal se analizó que era de 22 kD, el suministrado como 40 kDa se analizó que era de 43 kDa y el suministrado como 60 kDa se analizó que era de 64 kDa en su laboratorio. Para evitar confusiones, se usó el peso molecular tal como se obtuvo en los análisis del laboratorio de los inventores

en la discusión del presente documento, a excepción del PEG de 5kD, que se notificó que era de 5 kDa como el fabricante lo había identificado.

Además de las mutaciones de cisteína en las posiciones 491 y 1808 de BDD (divulgadas anteriormente), las posiciones 487, 496, 504, 468, 1810, 1812, 1813, 1815, 1795, 1796, 1803 y 1804 habían mutado a cisteína para permitir potencialmente el bloqueo de la unión de LRP tras la PEGilación. Asimismo, las posiciones 377, 378 y 556 se mutaron a cisteína para permitir el bloqueo de la unión de LRP y HSPG tras la PEGilación. Las posiciones 81, 129, 422, 523, 570, 1864, 1911, 2091 y 2284 se seleccionaron de modo que estuvieran igualmente separadas en el BDD de forma que la PEGilación dirigida a sitio con PEG grandes (40 kD) en estas posiciones junto con PEGilación en los sitios de glicosilación nativa (41, 239 y 2118) y los sitios de unión de LRP deberán cubrir completamente la superficie de BDD e identificar un nuevo mecanismo de aclaramiento para BDD.

En una realización, el medio de cultivo celular contiene cisteínas que "tapan" los residuos de cisteína sobre la muteína formando puentes disulfuro. En la preparación del conjugado, la muteína cisteína producida en el sistema recombinante se tapa con capuchón con una cisteína del medio y este capuchón se elimina mediante reducción moderada que libera el capuchón antes de añadir el reactivo polimérico específico de cisteína. También pueden usarse otros procedimientos conocidos en la técnica para la mutación específica de sitio del FVIII, como sería evidente para un experto en la técnica.

Factor IX (FIX)

El factor IX es esencial en la cascada de la coagulación sanguínea. Una deficiencia del factor IX en el cuerpo caracteriza un tipo de hemofilia (tipo B). El tratamiento de esta enfermedad normalmente se limita a la transfusión intravenosa de concentrados proteicos de plasma humano del factor IX. El producto recombinante disponible comercialmente se comercializa con la denominación comercial BenefixTM.

Las moléculas del FIX útiles incluyen la proteína de longitud completa, los precursores de la proteína, subunidad es y fragmentos de la proteína y variantes y fragmentos antigénicos de los mismos. Con las referencias al FIX se pretende incluir todas las formas potenciales de dichas proteínas.

En algunas realizaciones, la secuencia del FIX humano comprende la SEC ID N° 8, aunque son posibles variantes alélicas. El factor IX, variantes, fragmentos y/o procedimientos de realización de los mismos también útiles se describen en, por ejemplo, las siguientes publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. y patentes de EE.UU. 20130095555; 20120308540; 20120263703; 2012/0270300; 20120177625; 20120164130; 20110244550; 20110217284; 20110183906; 20110154516; 20110137011; 20110046060; 20100330060; 20100316625; 20100284971; 20100249033; 20100137511; 20100130684; 20100130428; 20100120982; 20100081791; 20100081712; 20090280550; 20090239797; 20090221492; 20090176708; 2009008188; 20080318850; 20080305991; 20080255026; 20080207897; 20080188414; 20080176287; 20080167219; 20080153156; 20080102115; 20080075711; 20070244036; 20060287228; 20060211621; 20060052302; 20060040856; 20050100982; 20040254106; 20040133930; 20040110675; 20040106779; 20030203845; 20020166130; 20020031799; 20010031721; 8.404.809; 8.399.632; 8.383.388; 8.198.421; 8.168.425; 8.030.065; 7.888.321; 7.888.067; 7.700.734; 7.579.444; 7.575.897; 7.419.948; 7.375.084; 7.179.617; 7.125.841; 6.670.176; 6.627.737; 6.531.298; 6.372.716; 6.344.596; 6.284.871; 6.280.729; 6.063.909; 6.046.380; 6.043.215; 6.037.452; 6.034.222; 5.969.040; 5.919.909; 5.919.908; 5.770.700; 5.714.583; 5.639.857; 5.621.039; 5.614.500; 5.521.070; 5.457.181; 5.409.990; 5.286.849; 5.281.661; 5.171.569; 5.061.789; 5.055.557; 4.786.726; 4.770.999; y 4.081.432.

Factor X (FX)

El Factor X (FX) es una glicoproteína bicaatenaria dependiente de vitamina K que desempeña un papel central en la coagulación sanguínea. La deficiencia del factor X es un raro trastorno hemorrágico que afecta a entre 1 de cada 500.000 y 1 de cada 1.000.000 de la población. Se caracteriza por una tendencia a una hemorragia excesiva, similar a la causada por deficiencias del factor VIII y el factor IX en la hemofilia A y B, respectivamente.

Las moléculas del FX útiles incluyen la proteína de longitud completa, los precursores de la proteína, subunidad es y fragmentos de la proteína y variantes y fragmentos antigénicos de los mismos. Con las referencias al FX se pretende incluir todas las formas potenciales de dichas proteínas.

En algunas realizaciones, el polipéptido de FX comprende la SEC ID N° 10, aunque las variantes alélicas son posibles. El factor X, variantes, fragmentos y/o procedimientos de realización de los mismos también útiles se describen en, por ejemplo, las siguientes publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. y patentes de EE.UU. 20120231523; 20120039863; 20110275666; 20100285568; 20100233149; 20090175828; 20090053185; 20070207953; 20070032424; 20060148038; 20050153882; 20030207796; 20030181381; 20030138914; 8,293,874; 8,173,777; 8,168,753; 7,772,371; 7,220,569; 7,179,890; 6,958,322; 6,905,846; 6,783,953; 6,573,071; 6,562,598; 6,117,836; 5,798,332; and 4,501,731.

Factor XI (FXI)

El factor XI humano es una glicoproteína bicatenaria con un peso molecular de aproximadamente 160.000 Dalton. Las dos cadenas son polipéptidos idénticos unidos por puentes disulfuro con pesos moleculares de aproximadamente 80.000 Dalton. El factor XI es activado en el factor XIa por el factor XIIa. Se ha determinado la secuencia de aminoácidos del factor XI humano (véase, por ejemplo, Fujikawa *et al.*, *Biochemistry* 25:2417-2424 (1986)) y se proporciona como la SEC ID N° 7. En seres humanos, el gen para el FXI se localiza en el extremo distal del cromosoma 4 (4q35.2) y contiene 15 exones extendidos por aproximadamente 25 kb del ADN genómico (Asaki *et al.*, *Biochemistry* 26:7221-7228 (1987); Kato *et al.*, *Cytogenet. Cell Genet.* 52:77 (1989)). En algunas realizaciones, la secuencia del FXI humano comprende la SEC ID N° 7 (N° de acceso en GenBank P03951).

Durante la activación del factor XI, el factor XIIa rompe un enlace peptídico interno en cada una de las dos cadenas, lo que tiene como resultado un factor XIa activado, una serina proteasa compuesta por dos cadenas pesadas y dos ligeras mantenidas unidas por puentes disulfuro. El factor XI activado desencadena la fase media de la vía intrínseca de la coagulación sanguínea activando el factor IX. Defectos en este factor producen el síndrome de Rosenthal (también conocido como hemofilia C), una anomalía de la coagulación sanguínea. La proteína factor XI está codificada por el gen F11. El FXI también se conoce como factor de coagulación XI o antecedente de la tromboplastina plasmática.

El sitio de escisión para la activación del factor XI por el factor XIIa es un enlace peptídico interno entre Arg-369 e Ile-370 en cada cadena polipeptídica (Fujikawa *et al.*, *Biochemistry* 25:2417-2424 (1986)). Cada cadena pesada del factor XIa (369 aminoácidos) contiene cuatro repeticiones en tándem de 90-91 aminoácidos denominados dominios apple (designados A1-A4) más un péptido de conexión corto (Fujikawa *et al.*, *Biochemistry* 25:2417-2424 (1986); Sun *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:36373-36378 (1999)). Las cadenas ligeras del factor XIa (cada uno de 238 aminoácidos) contienen la porción catalítica de la enzima con las secuencias que son típicas de la familia de la tripsina de las serina proteasas (Fujikawa *et al.*, *Biochemistry* 25:2417-2424 (1986)). XIa escinde proteolíticamente su sustrato, el factor IX, en una interacción que requiere el dominio A3 del factor XI (Sun, Y., y Gailani, D. *J. Biol. Chem.* 271, 29023-29028 (1996)).

Las moléculas del FXI útiles incluyen la proteína de longitud completa, los precursores de la proteína, subunidad es y fragmentos de la proteína y variantes y fragmentos antigénicos de los mismos. Con las referencias al FXI se pretende incluir todas las formas potenciales de dichas proteínas.

En algunas realizaciones, el polipéptido FXI comprende la SEC ID N° 7, aunque son posibles todas las variantes alélicas. El factor XI, variantes, fragmentos y/o procedimientos de realización de los mismos también útiles se describen en, por ejemplo, las siguientes publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. y patentes de EE.UU. 20120083522; 20110159006; 20110020349; 20100144620; 20100062512; 20080058266; 20070027077; 20050181978; 20030040480; y 5.252.217.

Ligandos Siglec

De acuerdo con las realizaciones, el conjugado comprende un ligando Siglec, en el que el ligando Siglec es un glicano seleccionado de 9-N-bifenilcarboxil-NeuAca2-6Gal-1-4GlcNAc (6'-BPCNeuAc), NeuAca2-6Gal-1-4GlcNAc y NeuAca2-6Gal-1-4(6-sulfo)GlcNAc y combinaciones de los mismos. Los Siglec, abreviatura para lectinas de tipo Ig que se unen a ácido siálico, son receptores de superficie celular y miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) que reconocen los azúcares. Su capacidad para reconocer los hidratos de carbono usando un dominio de inmunoglobulina los coloca en el grupo de lectinas de tipo I (de tipo Ig). Son proteínas transmembranales que contienen un dominio de inmunoglobulina (IgV) similar a V en el extremo N que se une a ácido siálico y un número variable de los dominios de Ig C2 (IgC2). El primer Siglec descrito es la sialoadhesina (Siglec-I/CD169) que es una molécula de adhesión similar a la lectina en los macrófagos. Más tarde se añadieron otros Siglec a esta familia, incluyendo CD22 (Siglec-2) y Siglec-G/10 (es decir, Siglec-10 humano y Siglec-G de ratón), que se expresa sobre los linfocitos B y tiene un papel importante en la regulación de su adhesión y activación, CD33 (Siglec-3) y la glicoproteína asociada a la mielina (MAG/Siglec-4). En seres humanos se han identificado varios Siglec adicionales (Siglec 5-12) que son altamente similares en su estructura al CD33, de modo que se denominan colectivamente "Siglec relacionados con CD33". Estos Siglec se expresan en células NK humanas, linfocitos B y/o monocitos. Los Siglec relacionados con CD33 tienen todos dos motivos similar al motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptores conservados (ITIM) en sus colas citoplasmáticas, lo que sugiere su implicación en la activación celular. Descripciones detalladas de los Siglec se proporcionan en la literatura, por ejemplo Crocker *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* 7:255-66, 2007; Crocker *et al.*, *Immunol.* 103:137-45, 2001; Angata *et al.*, *Mol. Diversity* 10:555-566, 2006; y Hoffman *et al.*, *Nat. Immunol.* 8:695-704, 2007.

Los ligandos glicano de Siglec hacen referencia a compuestos que reconocen específicamente uno o más Siglec y que comprenden homo o heteropolímeros de residuos de monosacáridos. Además de las secuencias de glicano, los ligandos de glicano Siglec también pueden contener restos lipídicos pegilados conectados al glicano a través de un ligador. Ejemplos de varios ligandos de glicano Siglec se indican en la literatura, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 8.357.671; y Blixt *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 130:6680-1 (2008).

En algunas realizaciones, el ligando Siglec es un ligando para un Siglec inhibidor. En algunas realizaciones, el ligando Siglec se une a un Siglec seleccionado de Siglec-1 (CD169), Siglec-2 (CD22), Siglec-3 (CD33), Siglec-4 (MAG), Siglec-5, Siglec-6, Siglec-7, Siglec-8, Siglec-9, Siglec-G/10, Siglec-11, y Siglec-12. En algunas realizaciones, el Siglec se expresa sobre la superficie de un linfocito B. En algunas realizaciones, el ligando Siglec es un ligando Siglec-G/10.

En algunas realizaciones, los ligandos Siglec adecuados incluyen ligandos de Siglec-2 (CD22), hallados en los linfocitos B. En algunas realizaciones, el ligando es un ligando glicano. Los ligandos pueden ser ligandos naturales o sintéticos que reconocen el CD22 (Siglec-2). El CD22 de una serie de especies se conoce en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos para el CD22 humano se divulgan en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el número de acceso NP 001762 (gi: 4502651) y también está disponible en el documento WO 2007/056525. El CD22 de ratón también está caracterizado en la técnica, por ejemplo Torres *et al.*, *J. Immunol.* 149:2641-9, 1992; y Law *et al.*, *J. Immunol.* 155:3368-76, 1995. Otro distinto al CD22, Siglec-G/10 es otro Siglec que se expresa en la superficie de los linfocitos B. El Siglec-10 humano y su Siglec-G ortólogo de ratón son ambos bien conocidos y caracterizados en la técnica. Véase, por ejemplo, Munday *et al.*, *Biochem. J.* 355:489-497, 2001; Whitney *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 268:6083-96, 2001; Hoffman *et al.*, *Nat. Immunol.* 8:695-704, 2007; y Liu *et al.*, *Trends Immunol.* 30:557-61, 2009.

Se conocen varios ligandos de Siglec. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 8.357.671; Chen *et al.*, *Blood* 115:4778-86 (2010); Blixt *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 130:6680-1 (2008); Kumari *et al.*, *Viol. J.* 4:42 (2007); y Kimura *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282:32200-7 (2007).

Por ejemplo, los ligandos naturales del CD22 humano, tal como NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc o NeuAc α 2-6Gal β 1-4(6-sulfo)GlcNAc, se pueden usar para dirigir una proteína factor de coagulación a los linfocitos B humanos. Además, también está disponible una serie de ligandos sintéticos de CD22 con mejores actividades, por ejemplo 9-N-bifenilcarboxil-NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc (6'-BPCNeuAc) y 9-N-bifenilcarboxil-NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc (3'-BPCNeuAc). Ligandos de glicano más específicos para el CD22 humano se describen en la técnica, por ejemplo Blixt *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 130:6680-1, 2008; y Paulson *et al.*, documento WO 2007/056525. De forma similar, en la literatura se han notificado muchos ligandos de glicano para el CD22 de ratón. Ejemplos incluyen NeuGc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc (NeuGc), 9-N-bifenilacetil-NeuGc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc (^{BPA}NeuGc) y NeuGc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc. También se sabe que algunos de estos ligandos de CD22 son capaces de unirse a Siglec-G/10. Aparte de los ligandos Siglec naturales y sintéticos ilustrados en el presente documento, se pueden también usar compuestos derivados o análogos de cualquiera de estos ligandos de glicano ilustraos en la práctica de las realizaciones.

El término "análogo" o "derivado" se usa en el presente documento para hacer referencia a una molécula que se asemeja a un ligando Siglec de estructura conocida pero que se ha modificado de un modo dirigido y controlado, sustituyendo un sustituyente específico de la molécula de referencia con un sustituyente alternativo. En comparación con la molécula de referencia, el experto en la técnica esperaría que un análogo exhibiera una utilidad igual, similar o mejorada. La síntesis y detección selectiva de análogos para identificar variantes de compuestos conocidos con rasgos mejorados (tales como mayor afinidad de unión por una molécula diana) es un abordaje que es bien conocido en la química farmacéutica.

Procedimientos

Las realizaciones proporcionan procedimientos y usos terapéuticos para suprimir respuestas inmunológicas indeseadas y/o inducir tolerancia inmunitaria a las proteínas factores de coagulación. Los conjugados descritos en el presente documento se pueden usar para tratar o prevenir varios trastornos que están asociados o mediados por una respuesta inmunitaria indeseada o activación inmunitaria. Dirigiendo la proteína factor de coagulación a los linfocitos B en un sujeto que necesite tratamiento, los conjugados son adecuados para inducir tolerancia,

En una realización se proporciona un procedimiento de inducir tolerancia de una proteína factor de coagulación en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un conjugado que comprende una proteína factor de coagulación o un fragmento antigénico o variante del mismo y un ligando Siglec de linfocito B.

En algunas realizaciones, una combinación de conjugados se puede administrar a un sujeto, en las que los conjugados comprenden un cóctel de proteínas factores de coagulación, fragmentos antigénicos o variantes de las mismas.

En una realización, la combinación comprende una pluralidad de proteínas FVIII, incluyendo, por ejemplo, la pluralidad de diferentes productos FVIII disponibles comercialmente.

En otra realización, la combinación comprende uno o más productos FVIII diferentes disponibles comercialmente y uno o más BDD FVIII.

En otra realización, los conjugados comprenden uno o más de FVII, FVIII, FIX, FX y FXI.

La vía de administración de los conjugados no exhibe limitaciones concretas y en una realización, el conjugado se puede administrar mediante inyección, tal como inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.

Los procedimientos de inducción de tolerancia contra las proteínas factores de coagulación como se escriben en el presente documento se pueden poner en práctica antes, durante y/o después de los procedimientos de tratamiento de trastornos hemorrágicos en los que se administra una cantidad eficaz de la proteína factor de coagulación como bioterapéutico para tratar el trastorno hemorrágico. En algunas realizaciones, el sujeto a tratar tiene un FVIII con una semivida *in vivo* acortada, propiedades de unión del FVIII alteradas, defectos genéticos del FVIII y/o menor expresión del FVIII. En una realización el trastorno hemorrágico es hemofilia.

Las realizaciones también proporcionan procedimientos de tratamiento de un trastorno hemorrágico, tal como hemofilia, que comprende administrar a un sujeto que necesite tratamiento 1) una cantidad eficaz de un conjugado de las realizaciones y 2) una cantidad eficaz de un factor de coagulación. En algunas realizaciones, el mismo factor de coagulación usado en la etapa 2) se usa para crear el conjugado usado en la etapa 1), de modo que se crea tolerancia específicamente contra el factor de coagulación que se está administrando.

En una realización, el conjugado se administra al paciente antes de la proteína factor de coagulación para inducir tolerancia y prevenir la generación de anticuerpos contra la proteína factor de coagulación cuando se administra.

En algunas realizaciones, el conjugado se administra al sujeto tras la detección de anticuerpos contra una proteína factor de coagulación en un sujeto sometido a terapia de sustitución. En algunas realizaciones, la proteína factor de coagulación se administra posteriormente tras alcanzar la tolerancia usando el conjugado.

En algunas realizaciones, el conjugado se administra aproximadamente 30 días antes de administrar la proteína factor de coagulación. En algunas realizaciones, el conjugado se administra aproximadamente 25 días, 20 días, 15 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, o un día antes de administrar la proteína factor de coagulación. En algunas realizaciones, el conjugado se administra el mismo día que la proteína factor de coagulación. En algunas realizaciones, el conjugado se administra aproximadamente 30 días, 25 días, 20 días, 15 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o un día antes de administrar la proteína factor de coagulación. El término "sujeto" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, por ejemplo mamíferos humanos y no humanos. Ejemplos de animales no humanos incluyen perros, gatos, ganado vacuno, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos etc. A menos que se indique lo contrario, los términos "paciente" o "sujeto" se usan en el presente documento de forma intercambiable. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Los sujetos que necesitan tratamiento o inducir tolerancia incluyen los que ya sufren la enfermedad o trastorno, así como los que están en riesgo de desarrollar el trastorno hemorrágico. En algunas realizaciones, el sujeto ha demostrado una respuesta positiva de anticuerpos contra la proteína factor de coagulación bioterapéutica.

Los conjugados descritos en el presente documento se pueden administrar solos o como componente de composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas de las realizaciones comprenden una cantidad eficaz de los conjugados formulados con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de las realizaciones se pueden preparar y administrar a un sujeto por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica de la farmacia. Véase, por ejemplo, *Goodman y Gilman's The Pharmacological Bases of Therapeutics*, Hardman et al., eds., McGraw-Hill Professional (10^a ed., 2001); *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Gennaro, ed., Lippincott Williams & Wilkins (20^a ed., 2003); y *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Ansel et al. (eds.), Lippincott Williams & Wilkins (7^a ed., 1999). Además, las composiciones farmacéuticas de las realizaciones también se pueden formular para incluir otros fármacos o agentes biológicos médicamente útiles.

En algunas realizaciones, los conjugados se usan para aplicaciones *in vivo*. En estas aplicaciones, los conjugados como se exponen en el presente documento se pueden administrar a un sujeto que necesite tratamiento de acuerdo con los protocolos ya bien establecidos en la técnica. Los conjugados se pueden administrar solos o en combinación con un vehículo en una composición farmacéutica adecuada. Típicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable es cualquier vehículo conocido o establecido en la técnica. Vehículos farmacéuticamente aceptables de ejemplo incluyen agua apirógena estéril y solución salina apirógena estéril. Otras formas de vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar para las presentes realizaciones incluyen aglutinantes, disgregantes, tensioactivos, aceleradores de la absorción, agentes de retención de humedad, absorbentes, lubricantes, cargas, expansores, agentes que imparten humedad, conservantes, estabilizantes, emulsionantes, agentes solubilizantes, sales que controlan la presión osmótica, agentes de dilución tales como tampones y excipientes normalmente usados en función de la forma de uso de la formulación. Estos se usan y seleccionan opcionalmente en función de la dosificación unitaria de la formulación resultante.

Una cantidad eficaz del conjugado varía dependiendo del tratamiento hemorrágico que afecta a un sujeto, otros factores conocidos del sujeto, tales como la edad, el peso etc., y, por tanto, deben determinarse empíricamente en cada caso. Esta determinación empírica se puede realizar mediante experimentación de rutina. En algunas realizaciones, los componentes de liposoma se pueden usar a una proporción de aproximadamente 200:1 peso/peso, por ejemplo, 100-300:1 peso/peso, en comparación con el antígeno liberado. En algunas realizaciones, una dosis terapéutica típica de la composición liposómica es de aproximadamente 5-100 mg por dosis, por ejemplo 10 mg por dosis.

Para las aplicaciones *in vivo*, los conjugados se pueden administrar al paciente por cualquier vía de administración habitual, por ejemplo por vía oral, parenteral o mediante inhalación. Como se muestra en el siguiente ejemplo, un liposoma que coexpresa un antígeno y un ligando Siglec se puede administrar a un sujeto mediante inyección intravenosa. En otras algunas realizaciones, el complejo liposómico se puede administrar a un sujeto por vía intravascular. Un liposoma útil para administración intravascular puede ser un liposoma unilamelar pequeño o puede ser un liposoma que comprende PEG-2000. Cuando la composición se administra por vía parenteral, la forma del fármaco incluye agentes inyectables (agentes líquidos, suspensiones) usados para inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular e inyección intraperitoneal, agentes líquidos, suspensiones, emulsiones y agentes de goteo.

En algunas otras realizaciones, el conjugado se administra por vía oral a un sujeto. En estas realizaciones, una forma del fármaco incluye formulaciones sólidas, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, agentes en polvo, gránulos, cápsulas y píldoras, formulaciones líquidas tales como agentes líquidos (p. ej., gotas oculares, gotas nasales), suspensión, emulsión y jarabe, inhaladores tales como agentes en aerosol, atomizadores y nebulizadores, y agentes de inclusión en liposomas. En algunas otras realizaciones más, el conjugado se administra mediante inhalación en el tracto respiratorio de un paciente para llegar a la tráquea y/o el pulmón de un sujeto. En estas realizaciones, se puede usar un nebulizador disponible comercialmente para liberar una dosis terapéutica del complejo liposómico en forma de un aerosol.

Las realizaciones proporcionan además una combinación farmacéutica (p. ej., un kit) para realizar los procedimientos de las presentes realizaciones. En algunas realizaciones, el kit comprende uno o más conjugados de las presentes realizaciones, incluyendo los conjugados que comprenden FVII, FVIII, FVIX, FX y FXI. En algunas realizaciones, el kit comprende además reactivos para la detección de anticuerpos del sujeto contra uno o más de FVII, FVIII, FVIX, FX, y FXI, incluyendo anticuerpos control, reactivos de detección de anticuerpos y antígenos purificados. En algunas realizaciones, el kit comprende uno o más bioterapéuticos que se pueden administrar al sujeto, incluyendo FVII, FVIII, FVIX, FX y FXI. En algunas realizaciones, los conjugados están presentes en una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, el kit comprende además instrucciones para administración de los agentes y/o analizar para detectar anticuerpos en el sujeto. En algunas realizaciones, las instrucciones en los kits generalmente contienen información sobre las dosis, la pauta posológica y la vía de administración para el procedimiento de uso pretendido. Los contenedores de los kits pueden ser dosis unitarias, envases grandes (p. ej., envases de múltiples dosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de las realizaciones normalmente son instrucciones escritas en una etiqueta o ficha (p. ej., una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables las instrucciones que se leen en máquinas (p. ej., instrucciones portadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

En algunas realizaciones, los kits comprenden materiales para la producción de un conjugado que comprende un polipéptido del factor de coagulación específico y un ligando Siglec. Generalmente, estos kits contienen contenedores separados de uno o más antígenos y uno o más ligandos Siglec a partir de los cuales se puede preparar una composición liposómica o conjugado inmunitario. Reactivos adicionales para preparar los compuestos también se pueden proporcionar en los kits, por ejemplo reactivos para fabricar liposomas. Los ligandos Siglec y los antígenos se suministran, en algunas realizaciones, en una forma que permita la formación de complejos después de mezclar los otros reactivos con el ligando Siglec y el antígeno suministrados.

Aunque las realizaciones se han descrito con referencia a determinados ejemplos y realizaciones concretas en el presente documento, los expertos en la técnica apreciarán que se pueden combinar varios ejemplos y realizaciones con el fin de cumplir todas las legislaciones relevantes en materia de patentes (p. ej., se pueden usar procedimientos descritos en ejemplos específicos para describir aspectos concretos de las realizaciones y su operación, aunque no se expongan de forma explícita en las referencias a los mismos).

Ejemplo 1

Liposomas toleragénicos con ligandos Siglec.

Para investigar la posibilidad de reclutar CD22 para la sinapsis inmunológica sobre los linfocitos B para inducir tolerancia a antígenos dependientes de linfocitos T era necesaria una plataforma versátil. Se seleccionaron nanopartículas liposómicas por su uso *in vivo* validado y los sólidos procedimientos que existen para unir covalentemente las proteínas y los ligandos de glicano a los lípidos para su incorporación en la membrana (Chen, W. C. *et al. Blood* 115, 4778-4786 (2010); Loughrey *et al. J Immunol Methods* 132, 25-35 (1990); Shek *et al. Immunology* 50, 101-106 (1983)). De acuerdo con esto, se construyeron liposomas que expresaban el antígeno solo (inmunógeno) o el antígeno y el ligando de CD22 (tolerógeno; Fig. 1a). Para los estudios iniciales se usó un ligando Siglec de alta afinidad, ^{BPA}NeuGc (^{BPA}NeuGc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc; Fig. 1b), que se une al CD22 murino con una afinidad 200 veces mayor que su ligando natural (NeuGc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc; Fig. 1b) y solo tiene un pequeño grado de reactividad cruzada con Siglec-G15, 19.

Esta plataforma se validó usando el antígeno nitrofenol (NP) independiente de linfocitos T en experimentos análogos a estudios anteriores con el mismo antígeno unido a un polímero de poliácridamida. En los ratones en los que se inyectaron liposomas tolerogénicos se produjo una reducción drástica de la respuesta anti-NP (los isotipos IgM e

IgG) y no respondieron a dos exposiciones posteriores a liposomas inmunogénicos (Fig. 1c). Por el contrario, ratones CD22KO tratados con liposomas tolerogénicos no mostraron tolerización a NP tras una exposición posterior; por tanto, se indujo tolerancia a NP en ratones salvajes de un modo dependiente de CD22.

Después, se formularon liposomas tolerogénicos e inmunogénicos expresados en lisozima de huevo de gallina (HEL) para investigar el potencial para inducir tolerancia a un antígeno dependiente de linfocitos T. Usando el mismo diseño experimental, los liposomas tolerogénicos indujeron una sólida tolerancia de los ratones C57BL/6J a HEL de un modo dependiente de CD22 (Fig. 2d). Los experimentos de tolerización a HEL se repitieron con liposomas formulados con cantidades variables de ^{BPA}NeuGc o NeuGc. Al final del experimento de 44 días, que implicó dos exposiciones a liposomas inmunogénicos los días 15 y 30, un efecto dependiente de la dosis sobre la producción de anticuerpos fue evidente para ambos ligandos (Fig. 2e). Los dos órdenes de magnitud de diferencia en la CE50 entre los dos ligandos son consistentes con sus afinidades conocidas por CD2219. La completa tolerización a HEL requirió dos semanas para desarrollarse y lentamente se perdió en 4 meses (Fig. 2f). La cinética de la pérdida de la tolerancia sugiere que los linfocitos B de reciente aparición reestablecen la respuesta anti-HEL.

Ejemplo 2

Los liposomas tolerogénicos inducen apoptosis.

El mecanismo de inducción de tolerancia se investigó después usando linfocitos B reactivos a HEL transgénicos (IgM^{HEL}) de ratones MD4. Los liposomas que expresan HEL y ^{BPA}NeuGc anulaban *in vitro* completamente la activación de los linfocitos B IgM^{HEL} en comparación con los liposomas que expresan HEL solo, según el flujo de calcio, la regulación por aumento de CD86 y la proliferación (Fig. 2a-c). El uso de linfocitos B IgM^{HEL} sobre un fondo de CD22KO reveló que en las tres lecturas de activación de linfocitos B, la inhibición era completamente dependiente de CD22 (Fig. 2a). La inhibición requirió la presentación del ligando y el antígeno al mismo liposoma, ya que una mezcla de liposomas que expresa el ligando o el antígeno solos tuvo como resultado ausencia de inhibición (Fig. 2a). En los ensayos de proliferación (Fig. 2c), se observó que las células tratadas con los liposomas tolerogénicos estaban disminuyendo de número con respecto a células sin estimular. Se analizó el porcentaje de células vivas (Anexina V-PI-), de modo que se revela que los liposomas tolerogénicos producían una disminución significativa del número de células vivas de un modo dependiente del tiempo (Fig. 2d). El cultivo de células con anti-CD40 para imitar la colaboración de los linfocitos B ralentizó pero no previno la muerte celular. Cabe destacar que los liposomas que muestran el ligando CD22 solo no reprodujo los efectos de los liposomas tolerogénicos.

Después se realizaron experimentos similares *in vivo* para examinar el destino de los linfocitos B IgMHEL transferidas de forma adoptiva a ratones huésped tras la inmunización con liposomas. Cuatro días después de la inmunización, los linfocitos B IgMHEL de ratones inmunizados con liposomas tolerogénicos habían proliferado mucho menos y su número disminuyó con respecto al control (Fig. 2e). Tras 12 días, las células IgMHEL (Ly5a⁺IgMa⁺) se redujeron en más de un 95% respecto a los ratones que recibían liposomas desnudos (Fig. 2f). Estos efectos *in vivo* también dependían de CD22.

Ejemplo 3

Impacto de liposomas tolerogénicos sobre la señalización de BCR

La señalización de BCR en linfocitos B IgMHEL se analizó mediante transferencia de tipo Western en varios puntos de tiempo tras la estimulación con liposomas (Fig. 3a). Los liposomas tolerogénicos produjeron una fuerte fosforilación de CD22 sobre los cuatro ITIM analizados, lo que es consistente con la unión física de CD22 y el BCR dentro de la sinapsis inmunológica. Por el contrario, la fosforilación de numerosos componentes de la señalización de BCR proximales (Syk y CD19) y distales (p38, Erk, JNK, Akt, GSK3β, FoxO1, FoxO3a, BIM) se inhibieron fuertemente mediante los liposomas tolerogénicos en comparación con los liposomas inmunogénicos en los puntos de tiempo de 3 y 30 minutos. Con un sorprendente contraste se observó una fuerte fosforilación equivalente de los componentes de señalización con los liposomas inmunogénicos y tolerogénicos en células IgMHEL que carecen de CD22.

Entre los componentes de señalización afectados, es particularmente sorprendente que los liposomas tolerogénicos indujeron hipofosforilación de los componentes en la vía de supervivencia de Akt en comparación con los linfocitos B sin estimular (en reposo). La Akt se hipofosforiló en los sitios Thr308 and Ser473 mientras que las dianas corriente debajo de Akt, tales como GSK3β y FoxO1/FoxO3a también se hipofosforilaron. Dado que la fosforilación mediada por Akt de la familia *forkhead* de transcripción controla su localización celular, se usó microscopia confocal para analizar la tinción celular de FoxO1 y FoxO3a (Fig. 3b). Mientras que FoxO1 y FoxO3a carecían notablemente de tinción nuclear en linfocitos B IgMHEL en reposo o en células activadas con liposomas inmunogénicos, se produjo una fuerte tinción nuclear de las células tratadas con liposomas tolerogénicos. Dado que FoxO1 y FoxO3a regulan la transcripción de los genes implicados en la inhibición del ciclo celular y la apoptosis de los linfocitos B, estos resultados son consistentes con la inducción de la apoptosis mediante los liposomas tolerogénicos.

Ejemplo 4

Tolerancia a antígenos fuertes dependientes de linfocitos T

Para investigar si los liposomas tolerogénicos se pueden usar para inducir tolerancia a antígenos fuertes dependientes de linfocitos T, se investigaron varias combinaciones de proteínas y cepas de ratones que se sabe que proporcionan una fuerte colaboración de linfocitos T. Para los estudios de tolerancia en un sistema mucho más inmunogénico, la formulación liposómica se optimizó para maximizar la tolerancia mediada por CD22. Esto implicó variar la cantidad de HEL en el liposoma y titular la cantidad de liposomas inyectados. Usando condiciones optimizados, ascendiendo al uso de 1.000 veces menos antígeno en la etapa inicial de tolerización, en ratones Balb/c se alcanzó una tolerización sólida a la posterior exposición a HEL liposómico (Fig. 4a). Notablemente, la tolerización también estaba intacta cuando se usó el antígeno soluble en lugar de liposomas inmunogénicos durante la etapa de exposición (Fig. 4b). Con condiciones optimizadas a mano, también se consiguió tolerización a OVA, a la glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG) y al FVIII (Fig 4c-e). Para evaluar la especificidad de la tolerización por el antígeno indicado, se investigó la respuesta de los ratones colerizados a un antígeno diferente. Se descubrió que los ratones colerizados a HEL o a OVA presentaban una respuesta no alterada al otro antígeno (Fig. 4f). La tolerización no parece implicar inducción de células supresoras, dado que los esplenocitos transferidos de forma adoptiva de un ratón colerizado no suprimen una respuesta de anticuerpos a dicho antígeno en ratones huésped.

Ejemplo 5

Protección frente a la hemorragia en ratones con hemofilia

Habiendo establecido las condiciones para tolerizar ratones al FVIII humano, se aplicó este enfoque de tolerización en ratones defectivos en FVIII, que sirvió como modelo de hemofilia A. Los ratones defectivos en FVIII que recibieron liposomas inmunogénicos el día 0 y el día 15 se reconstituyeron sin éxito con rhFVIII el día 30, ya que sangraron hasta una extensión similar en un experimento de un corte en la cola, como los ratones defectivos en FVIII que no se habían reconstituido (Fig. 5a). Por otro lado, se protegió a los ratones que recibieron liposomas tolerogénicos seguidos de una exposición a liposomas inmunogénicos de hemorragias en el experimento del corte en la cola hasta un nivel indistinguible estadísticamente de ratones control que se habían reconstituido. Los niveles de los anticuerpos anti-FVIII en los ratones de este estudio se correlacionaron con los resultados del ensayo de hemorragia; los ratones que se trataron primero con liposomas tolerogénicos antes de una exposición a liposomas inmunogénicos no produjeron un incremento estadísticamente significativo en anticuerpos anti-FVIII respecto a los ratones control (Fig. 5b). Por el contrario, los ratones que recibieron los liposomas inmunogénicos dos veces tenían niveles altos de anticuerpos anti-FVIII. Por tanto, la unión de CD22 para inhibir una respuesta de anticuerpos es un medio eficaz de suprimir la formación de anticuerpos inhibidores contra el FVIII bioterapéutico, que mantiene la eficacia de la terapia de reconstitución.

Ejemplo 6

Un circuito tolerogénico mediado por CD22 es operativo en linfocitos B humanos no expuestos previamente y de memoria.

Para investigar si el CD22 es capaz de inducir un circuito tolerogénico en linfocitos B humanos usando la plataforma liposómica de los inventores, fue necesario un procedimiento para estimular linfocitos B que tuvieran diferentes especificidades de antígenos. Para conseguirlo, los fragmentos Fab anti-IgM o anti-IgG se unieron a los liposomas para actuar como sustitutos de antígenos con el fin de estimular los linfocitos B no expuestos previamente y de memoria, respectivamente. Además, se requirió un ligando de CD22 diferente, dado que el CD22 murino y humano tienen preferencias de ligando diferentes. Afortunadamente, se ha desarrollado un ligando de alta afinidad del CD22 humano que se denomina ^{BPC}NeuAc (^{BPA}NeuGc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc; Fig. 6a). Los liposomas anti-IgM and anti-IgG indujeron una sólida activación de los linfocitos B de linfocitos B purificados aislados de sangre periférica humana, según el flujo de calcio, en compartimentos de linfocitos B no expuestos previamente (CD27⁺CD38^{baja}) y de memoria (IgM⁺IgD⁺), respectivamente (Fig. 6b). Por el contrario, la presencia de ligandos de CD22 humanos sobre estos liposomas inhibió fuertemente la activación de los linfocitos B. De un modo similar, también se observó inhibición de la señalización de BCR en los análisis de transferencia de tipo Western (Fig. 6c) y regulación por aumento de CD86 (Fig. 6d). Para determinar si la tolerogenicidad también disminuía la viabilidad de los linfocitos B humanos primarios, se incubaron los liposomas durante 24 horas y la viabilidad celular se analizó mediante tinción con anexina V y PI. El número de célula vivas (Anexina V-PI) disminuyó en los linfocitos B tanto no expuestos previamente como de memoria incubados con liposomas anti-IgM y anti-IgG que expresan ^{BPC}NeuAc, respectivamente, incluso en presencia de anti-CD40 (Fig. 6e). El efecto más profundo observado en los linfocitos B de memoria es consistente con la inhibición más fuerte observada en las otras lecturas de activación de linfocitos B (Fig. 6b-d) y es particularmente intrigante, ya que los linfocitos de memoria expresan niveles moderadamente más bajos de CD22 que los linfocitos B no expuestos previamente (Fig. 6f).

Ejemplo 7

Los siguientes materiales y procedimientos se usaron en la realización de los experimentos descritos en los ejemplos 1-6.

Estudios con animales: El Comité de uso y atención animal en investigaciones del Scripps Research Institute (TSRI) aprobó todos los procedimientos experimentales con ratones. Ratones CD22KO y Siglec-GKO, en un fondo de C57BL/6J, se obtuvieron en L. Nitchke (University of Erlangen) y Y. Liu (University of Michigan), respectivamente. Ratones dobles defectivos (CD22KO/Siglec-GKO; DKO) se criaron previamente en el laboratorio de los inventores.

5 Los ratones transgénicos MD4 salvajes que expresan IgMH_{EL} (fondo de C57BL/6J) se obtuvieron en Jackson laboratories. Los ratones MD4 se cruzaron con las cepas defectivas en Siglec (CD22KO, Siglec-GKO y CD22KO/Siglec-GKO) y, después, con ratones C57BL/6J Ly5a. Los ratones que expresan mHEL (KLK4)43 en un fondo de C57BL/6J se obtuvieron en C. Xiao (The Scripps Research Institute) y se cruzaron con ratones con deficiencia de ST6Gal1. Los ratones que expresan mOVA45 en un fondo C56BL/6J transgénicos se obtuvieron en Jackson laboratories. Ratones deficientes en FVIII en un fondo BalbC fueron un generoso obsequio de David Lillicrap (Queens University). Los ratones Balb/c y C57BL/6J salvajes se obtuvieron de la colonia de cría de roedores de TSRI.

Aislamiento de linfocitos B humanos: Los procedimientos con sujetos humanos fueron revisados y aprobados por el Comité de Revisión Institucional del TSRI. Se obtuvo sangre normal del Servicio de Donantes de Sangre Normal del TSRI. Para aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre heparinizada, primero se diluyó 2 veces con HBSS. La sangre diluida (35 ml) se depositó en una capa encima de 15 ml de ficoll-paque plus (GE healthcare) y se centrifugó durante 40 minutos a 400 rcf. La capa leucocitaria se aisló y se diluyó 4 veces con HBSS y se centrifugó (10 min, 300 rcf). Los linfocitos B se purificaron mediante selección negativa (Miltenyi) y normalmente tenían una pureza del 99 % (CD19⁺). Para el análisis de transferencia de tipo Western de los componentes de señalización de BCR, los linfocitos B purificados se clasificaron adicionalmente en linfocitos B no expuestos previamente (CD3⁻CD27⁻) o de memoria de cambio de isotipo (CD3⁺IgM⁺IgD⁻).

Inmunización y obtención de sangre: Se extrajo sangre entera (50 µl) de los ratones mediante extracción retroorbitaria usando tubos capilares heparinizados (Fisher). La sangre se centrifugó (17.000 rcf, 1 minuto) para obtener el suero. El suero se usó inmediatamente para los ELISA o se almacenó a -20 °C. Se descubrió que un ciclo de congelación-descongelación tenía un efecto mínimo sobre la determinación del título de anticuerpos. Los liposomas y las células se obtuvieron a través de la vena lateral de la cola en un volumen de 200 µl. Para los estudios que implican una exposición con antígeno soluble (no liposómico), se inyectó a los ratones 200 µg de HEL disuelto en HBSS y se administraron intraperitonealmente o 1 µg de FVIII administrado por vía intravenosa.

Ensayos de hemorragia en ratones deficientes en el FVIII Los ratones se reconstituyeron con 200 µl del FVIII humano recombinante (rhFVIII; Kogenate, Bayer Healthcare) o solución salina una hora antes del corte en la cola. El rhFVIII se disolvió de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se diluyó en solución salina estéril y se administraron dosis a 50 U/kg usando una inyección intravenosa retroorbitaria. Tras una hora, se anestesió a los ratones y se cortó la porción distal de la cola a un diámetro de 1,5 mm y se sumergió en un volumen predefinido de solución salina durante 20 minutos. Durante esta etapa, la solución de solución salina se mantuvo a 37 °C. La concentración de hemoglobina en la solución salina se determinó después de la lisis de los glóbulos rojos con 2% de ácido acético y se cuantificó mediante la absorbancia a 405 nm. La concentración de hemoglobina contra un patrón conocido se usó para calcular la pérdida de sangre por gramo de peso de ratón y se expresó en µl/g, suponiendo un hematocrito del 46% para un ratón normal. La pérdida de sangre en ratones Balb/c salvajes a los que se ha inyectado 200 µl de solución salina sirvió como control. Se consideró que los ratones estaban protegidos si la pérdida de sangre era inferior a la pérdida de sangre media más tres desviaciones estándar observada en ratones Balb/c salvajes.

Citometría de flujo: Se llevó a cabo una citometría de flujo a dos colores en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD). Cuando se usaron tres o más colores se empleó un citómetro de flujo LSR II (BD). Los anticuerpos marcados para la citometría de flujo se obtuvieron en Biolegend. En todos los casos, las células muertas se acotaron con 1 g/ml de yoduro de propidio.

Purificación de linfocitos B: Los linfocitos B se purificaron mediante selección negativa usando esferas magnéticas de acuerdo con el protocolo del fabricante (Miltenyi). La pureza de las células aisladas fue, generalmente, ≥ 99%.

Marcaje fluorescente de linfocitos B: Los linfocitos B IgMH_{EL} purificados (10x10⁶ células/ml) se marcaron de forma fluorescente con CFSE (6 µM) o CTV (1,5 µM) (Invitrogen) en HBSS durante 7 minutos a temperatura ambiente mezclando cada 2 minutos. Las reacciones se inactivaron mediante la adición de HBSS que contiene 3% de FBS y se centrifugaron (270 rcf, 7 minutos). Las células se resuspendieron en el tampón adecuado y se centrifugaron de nuevo, tras lo cual las células se resuspendieron a la concentración adecuada en el tampón de ensayo.

Ensayos de linfocitos B *in Vitro*: Los linfocitos B IgMH_{EL} purificados se incubaron durante 1 hora en medio (RPMI, 3% de FCS, Pen/Strep) antes de comenzar el ensayo. Las células (0,2 x 10⁶) se sembraron en placas de cultivo de fondo en U de 96 pocillos (Falcon). Se añadieron liposomas (concentración final de lípidos 5 µM) y las células se incubaron a 37°C durante varios periodos de tiempo. Para analizar las células mediante citometría de flujo, primero se centrifugaron las células (270 rcf, 7 min), seguido de incubación con los anticuerpos adecuados en 50 µl de tampón FACS (HBSS que contiene 0,1% de BSA y EDTA 2 mM). Tras 30-60 min de tinción en hielo, las células se lavaron una vez con 220 µl de tampón FACS y, por último, se resuspendieron en tampón FACS que contiene 1 µg/ml de yoduro de propidio antes de analizar mediante citometría de flujo. Una excepción a este protocolo fue la

tinción con Anexina V, que se llevó a cabo en tampón suministrado por el fabricante (Biolegend).

Ensayos de proliferación linfocitos B *in vitro*: Las células IgMHEL marcadas con CFSE se resuspendieron a una concentración de 10×10^6 células/ml en HBSS y se inyectaron 200 μ l (2×10^6 células) en los ratones huésped a través de la vena de la cola. Al día siguiente (24 horas), se inyectaron los liposomas a través de la vena de la cola. Cuatro días después, se extrajeron los bazos de los ratones huésped para analizar la tinción con CFSE de los linfocitos B Ly5a+IgMa+. Para analizar el número de linfocitos B IgMHEL que quedaban en el ratón huésped 12 días después de la inmunización con liposomas, los linfocitos IgMHEL no estaban marcados con CFSE.

Flujo de calcio: Los linfocitos B purificados se resuspendieron a 15×10^6 células/ml en medio RPMI que contiene 1% de FCS, HEPES 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 1 mM e Indo-1 1 μ M (Invitrogen). Las células se incubaron en un incubador de agua a 37 °C durante 30 minutos. Tras este periodo de incubación, se añadió un volumen de cinco veces el mismo tampón (sin indo-1) y las células se centrifugaron (270 rcf, 7 min). Para los experimentos con linfocitos B humanos, las células se tiñeron durante 20 minutos en hielo en HBSS con 3% de FCS. Para investigar los linfocitos B humanos no expuestos previamente, las células se tiñeron con CD3 y CD27 para acotar cualquier linfocito T contaminante, así como los linfocitos B de memoria. Para investigar los linfocitos B humanos de memoria, las células se tiñeron con CD3 IgM e IgD para acotar cualquier linfocito T contaminante, así como los linfocitos B no expuestos previamente. Las células se lavaron, se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de 2×10^6 células/ml en HBSS que contiene 1% de FCS, $MgCl_2$ 1 mM y $CaCl_2$ 1 mM. Las células se almacenaron en hielo y un alícuota (0,5 ml; 1×10^6 células) se calentó hasta 37 °C durante 5 minutos antes de medir el flujo de calcio. Las células se estimularon con liposomas (que varían de 5 a 50 μ M) y la fluorescencia con Indo-1 se monitorizó mediante citometría de flujo (100 – 1.000 acontecimientos/segundo) durante 3-6 minutos. La estimulación siempre tuvo lugar después de adquirir durante 10 segundos para establecer el fondo. Durante el ensayo, se usó una camisa de agua para mantener el tubo a 37°C. Los datos se analizaron en FlowJo usando las funciones cinéticas y los datos se representan como la intensidad media con desenfoque gaussiano.

ELISA: Placas Maxisorp (de 96 pocillos, Thermo Fisher) se revistieron con 50 μ l/pocillo de la proteína relevante a una concentración entre 10 – 100 μ g/ml en PBS y se dejaron durante la noche a 4°C. Para ver los anticuerpos anti-NP, se usó NP4-7-BSA en PBS (Biosearch Technologies). Al día siguiente, las placas se lavaron dos veces en TBS-T (solución salina tamponada con Tris bloqueada que contiene 0,1% de Tween 20) y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 μ l del diluyente de ensayo (TBS-T con 1% de BSA). El lavado de las placas se consiguió sumergiendo toda la placa en una pila con tampón de lavado el número adecuado de veces. El suero se diluyó inicialmente entre 20-10.000 veces y se diluyó en diluciones en serie por 2-3 ocho veces en la placa de ELISA. Las placas se incubaron con suero (50 μ l/pocillo) durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual las placas se lavaron cuatro veces en TBS-T. Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Santa Cruz Biotechnologies) se diluyeron 2.000 veces en diluyente de ensayo y a cada pocillo se añadieron 50 μ l. Después de incubar durante 1 hora a 37 °C, las placas se lavaron cinco veces en TBS-T. Para desarrollar la placa, se añadieron 75 μ l/pocillo de sustrato TMB (Thermo Fisher). La placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se añadieron 75 μ l/pocillo de H_2SO_4 2N para inactivar la reacción. Las placas se leyeron a 450 nm usando un espectrofotómetro (Molecular Devices). El título se definió como el título final, que era la dilución de suero que produjo una absorbancia 2 veces superior al fondo.

Transferencia de tipo Western: Los linfocitos B IgMHEL (30×10^6 /condición) se incubaron en medio (RPMI, 3% de FCS, Pen/Strep) a 37 °C durante 1 hora antes de estimular las células. Se añadieron liposomas (concentración final de los lípidos 5 μ M) a las células y tras una incubación de 3 o 30 minutos a 37°C, las células se centrifugaron brevemente (13.000 rcf, 8 s), se lavaron en 1 ml de PBS frío, se centrifugaron una segunda vez y se lisaron en 280 μ l de tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 150, EDTA 1 mM, 1% de Triton-X 100, NaF 10 mM, ortovanadato sódico 2 mM, cóctel inhibidor de la proteasa (Roche), pH 7,5) en hielo durante 30 minutos. Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación (13.000 rcf, 5 min, 4 °C) y la concentración de proteínas de los lisados celulares se normalizó mediante el ensayo BCA (Pierce). A los lisados se añadió tampón de carga SDS-PAGE con DTT 100 mM y las muestras se calentaron a 75°C durante 15 minutos. Las muestras se pasaron en un gradiente de 4-12% de geles de SDS-PAGE (Invitrogen) a 150 V durante 60-90 minutos y se transfirieron a nitrocelulosa (30 V, 2 horas). Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 hora en 5% de leche en polvo desgrasada disuelta en TBS-T (0,1% de Tween-20) y se sondaron con el anticuerpo primario durante la noche a 4 °C en TBS-T que contiene 1% de BSA. Los anticuerpos primarios se obtuvieron en Cellular Signaling Technologies y se usaron a una dilución de 1:1.000. Los anticuerpos fosfoespecíficos anti-CD22 fueron un obsequio de M. Fujimoto (University of Tokyo). Al día siguiente, las membranas se lavaron 4 x 5 minutos, seguido de 30 minutos de bloqueo con TBS-T que contiene 1% de BSA. Las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (dilución a 1:10.000; Santa Cruz Biotechnologies) disueltos en TBS-T + 1% BSA. Tras cuatro lavados, las transferencias se incubaron con solución de desarrollo (GE Healthcare) durante 2 minutos y se expusieron a la película. Microscopía: Los linfocitos B IgMHEL purificados se incubaron en medio (RPMI, 3% de FCS, Pen/Strep) a 37 °C durante 1 hora antes de estimular las células. Las células se estimularon del mismo modo que en el análisis de transferencia de tipo Western, a excepción de que la estimulación se produjo durante 2 horas. Tras la estimulación con liposomas, las células se sedimentaron suavemente (0,5 rcf, 3 minutos), se lavaron en 1 ml de PBS frío y de nuevo se centrifugaron suavemente. Para fijar las células, el sedimento se resuspendió en 1 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% frío y se rotó a 4 °C durante 10 minutos. Las células se centrifugaron suavemente y el

sedimento se resuspendió en 200 µl de PBS y 50 µl de las células resuspendidas (aproximadamente 3×10^6 células) se dispersan en portaobjetos de polilisina (Fisher). Después de secar la solución, los portaobjetos se lavaron otras tres veces con PBS para eliminar el exceso de PFA. Las células se permeabilizaron con 5% de Triton-X 100 durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de bloqueo con 5% de suero de cabra normal (NGS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se sondaron con anti-FoxO1 o anti-FoxO3a (Cellular Signaling Technologies) a una concentración de 1:80 en solución de 1% de NGS que contenía 0,01% de TX-100 durante la noche a 4°C. Al día siguiente, los portaobjetos se lavaron tres veces con PBS y se sondaron con anticonejo de cabra conjugado con Alexa488 (dilución a 1:1.000; Invitrogen) junto con faloidina conjugada con Alex555 (dilución a 1:40; Invitrogen) en 1% de NGS. Tras tres lavados con PBS, los portaobjetos se incubaron brevemente con una solución de DAPI y se montaron en medio anti-disipación Prolong (Invitrogen). La obtención de imágenes de las células se realizó con un microscopio confocal Zeiss.

Conjugación de proteínas-lípidos: Las proteínas se conjugaron con diestearoilfosetanolamina pegilada (PEG-DSPE) usando química de maleimida en un procedimiento similar describen otros autores (Loughrey, H. C., Choi, L. S., Cullis, P. R. y Bally, M. B. Optimized Procedures for the Coupling of Proteins to Liposomes. *J Immunol Methods* 132, 25-35 (1990)). En primer lugar, se introdujo un grupo tiol en la proteína usando el reticulador heterobifuncional 3-(2-piridilditio)-propionato de N-succinimidilo (SPDP; Pierce), que modifica los residuos de lisina. A una solución proteica (en PBS) en el intervalo de 1 - 20 mg/ml se añadieron aproximadamente 5 equivalentes molares de SPDP (recién disueltos en DMSO). La reacción se agitó mediante balanceo a temperatura ambiente durante 1 hora y después se centrifugó para eliminar cualquier precipitado. Para eliminar el SPDP sin reaccionar, la proteína se desaló en una columna Sephadex G-50. La proteína desalada se trató con DTT 25 mM (10 min, temperatura ambiente) para desproteger el grupo 2-piridil-disulfuro y, de este modo, generar un tiol libre. La cantidad del grupo saliente de 2-piridilo liberada durante la reacción se determinó midiendo la absorbancia a 343 nm (coeficiente de extinción $7550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), que pudo usarse para calcular la extensión de la modificación de la proteína con el ligador comparándola con la concentración de la proteína. La proteína se desaló de nuevo en una columna Sephadex G-50 para eliminar el exceso de DTT. La proteína derivada de tiol (en el intervalo de 10 - 50 µM) se hizo reaccionar inmediatamente con maleimida-PEG2000-DSPE (200 µM; NOF America) en nitrógeno a temperatura ambiente durante la noche. Las proteínas modificadas con lípidos eran micelas y se pudieron purificar fácilmente de la proteína sin modificar en una columna Sephadex G-100. Las proteínas modificadas con lípidos deseadas eluyeron en el volumen de fase móvil y la concentración de las proteínas se determinó mediante una medición de A280 y después se almacenó a 4°C. Para validar que las proteínas se habían modificado por los lípidos, se usó SDS-PAGE. La modificación con lípidos de las proteínas fue fácilmente evidente por un incremento en su PM aparente en el gel (Figura S2c). Usando estas condiciones de reacción, las proteínas se modificaron con de uno a tres lípidos.

Conjugación de azúcares-lípidos: El ligando CD22 murino de alta afinidad ($^{\text{BPA}}$ NeuGc) y el ligando de CD22 humano ($^{\text{BPC}}$ NeuAc) se unieron a PEG-DSPE mediante acoplamiento de 9-N-bifenilacetil-NeuGcα2-6Galβ1-4GlcNAc-β-etilamina o 9-N-bifenilcarboxil-NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAc-β-etilamina con NHS-PEG₂₀₀₀-DSPE (NOF), respectivamente, como se ha descrito previamente (Chen *et al.*, *Blood* 115:4778-4786 (2010)).

Síntesis de NP-PEG₂₀₀₀-DSPE: 4-Hidroxi-3-nitrofenilacetil-O-succinimida (1,5 mg, 0,0050 mmol, 2,8 eq) y amina-PEG₂₀₀₀-DSPE (5,0 mg, 0,0018 mmol; NOF) se disolvieron en 0,5 ml de diclorometano seco que contenía 10 equivalentes molares de N,N-Diisopropiletilamina (3,1 µl, 0,018 mmol, 10 eq). Después de tres horas a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó al vacío y el residuo sólido restante se resuspendió en ddH₂O (2 ml) con la ayuda de sonicación. La suspensión se dializó tres veces seguidas contra ddH₂O usando casetes de diálisis con un corte de peso molecular de 10 kDa (Pierce). La muestra dializada se liofilizó después en un vial impermeabilizado, dando un polvo esponjoso amarillo claro. La espectroscopia de RMN de ^1H en DMSO confirmó la proporción prevista (1:2) de protones aromáticos del grupo de nitrofenol y los grupos metilo terminales de los lípidos de estearoil, respectivamente.

Liposomas: Todos los liposomas estaban compuestos por una proporción molar de 60:35:5 de diestearoilfosfatidilcolina (DSPC; Avanti Polar Lipids), colesterol (Sigma) y lípidos pegilados. La % mol total de los lípidos pegilados siempre se mantuvo a 5%; este 5% estaba formado por la combinación adecuada de polietilenglicol (PEG₂₀₀₀)-diestearoilfosfoetanolamina (PEG-DSPE; Avanti Polar Lipids), $^{\text{BPA}}$ NeuGc-PEG₂₀₀₀-DSPE, $^{\text{BPC}}$ NeuAc-PEG₂₀₀₀-DSPE, NP-PEG₂₀₀₀-DSPE o Protein-PEG₂₀₀₀-DSPE. Para ensamblar los liposomas, la cantidad adecuada de DSPC y colesterol recién disuelto se evaporaron en una corriente de gas nitrógeno. Al lípido desecado se añadió un alícuota de $^{\text{BPA}}$ NeuGc-PEG₂₀₀₀-DSPE, $^{\text{BPC}}$ NeuAc-PEG₂₀₀₀-DSPE, NP-PEG₂₀₀₀-DSPE de reservas de DMSO y esta mezcla se liofilizó. Los lípidos desecados se hidrataron en PBS y se sometieron a ultrasonidos enérgicamente durante un mínimo de cinco veces 30 segundos, con un retraso de varios minutos entre las rondas de sonicación. En el momento de la hidratación se añadió Proteína-PEG₂₀₀₀-DSPE. La % mol de la proteína en el liposoma se varió durante los estudios de los inventores de 0,0033 a 0,33%. La concentración total de los liposomas se define por la molaridad de los lípidos y los liposomas se hidrataron típicamente en el intervalo de 1 a 10 mM. Los liposomas se pasaron un mínimo de 20 veces a través de filtros de 800 nm, 100 nm y, por último, de 100 nm, usando un dispositivo de miniextrusión manual (Avanti Polar Lipids). La extrusión se llevó a cabo entre 40 y 45 °C. El diámetro de los liposomas se midió en un zetasizer (Malvern) y generalmente se encontró que estaba en el intervalo de 100 a 130 ± 30 nm. La incorporación de Proteína-PEG₂₀₀₀-DSPE en los liposomas no influyó sobre su tamaño.

Clonación, expresión y purificación de MOG: Los residuos 1-120 de la glicoproteína de mielina del oligodendrocito de rata se clonaron en una biblioteca de ADNc de cerebro de rata (Zyagen) usando los cebadores siguientes: 5'-GCAGCACATATGGGACAGTTCATAGTGATAGGG-3' (SEC ID N° 11) y 5'-GCAGACCTCGAGGTAGAAGGGATCTTCTACTTTC-3' (SEC ID N° 12), las letras subrayadas representan los sitios de restricción NdeI y XhoI, respectivamente. El producto de la PCR se ligó en pET23a para expresar una proteína con un marcador de Hls6 en el extremo C. La expresión y purificación de proteínas se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (Chan, J. W. et al. Monitoring dynamic protein expression in living E-coli. Bacterial Celts by laser tweezers raman spectroscopy. Cytom Part A 71A, 468-474 (2007)).

Análisis estadísticos: La significación estadística se determinó usando una prueba t de Student de dos colas no apareada.

Ejemplo 8

Generación de conjugados del Factor VIII-PEG

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA Y LA ACTIVIDAD DEL FVIII. FVIII y BDD FVIII son moléculas complejas muy grandes con muchos sitios diferentes implicados en reacciones biológicas. Los intentos anteriores de modificarlos covalentemente para mejorar las propiedades farmacocinéticas tuvieron resultados mixtos. Fue sorprendente que las moléculas podían mutarse específicamente y después añadirse un polímero de un modo específico de sitio. Además, los resultados de las propiedades farmacocinéticas mejoradas y la actividad conservada también fueron sorprendentes, dados los problemas con los conjugados poliméricos anteriores que causaron adición inespecífica y actividad reducida.

En una realización, se proporciona mutagénesis dirigida a sitio usando ligandos específicos de cisteína, tales como PEG-maleimida. Un BDD no mutado no tiene ninguna cisteína disponible para reaccionar con un PEG-maleimida, por consiguiente únicamente la posición de la cisteína mutada será el sitio de PEGilación. Más específicamente, el BDD FVIII tiene 19 cisteínas, 16 de las cuales forman disulfuros y los otros tres son cisteínas libres (McMullen *et al.*, 1995, *Protein Sci.* 4, pág. 740-746). El modelo estructural de BDD sugiere que las 3 cisteínas libres están enterradas (Stolova-McPhie *et al.*, 2002, *Blood* 99, pág. 1215-1223). Dado que las cisteínas oxidadas no se pueden PEGilar con PEG-maleimidadas, las 16 cisteínas que forman disulfuros en BDD no se pueden PEGilar sin reducirse primero. En base a los modelos estructurales de BDD, las 3 cisteínas libres en BDD pueden no estar PEGiladas sin desnaturar primero la proteína para exponer estas cisteínas al reactivo PEG. Por tanto, no parece factible conseguir una PEGilación específica de BDD mediante PEGilación en los residuos de cisteína nativos sin alterar drásticamente la estructura de BDD, que con gran probabilidad destruirá su función.

El estado redox de las 4 cisteínas en el dominio B del FVIII de longitud completa es desconocido. La PEGilación de las 4 cisteínas en el dominio B puede ser posible si no forman disulfuros y están expuestas en la superficie. No obstante, dado que el FVIII de longitud completa y el BDD tienen un perfil farmacocinético (PK) similar y semividas *in vivo* similares (Gruppo *et al.*, 2003, *Haemophilia* 9, pág. 251-260), la PEGilación del dominio B es improbable que de una semivida en plasma mejorada a menos que se produzca PEG también para proteger las regiones no pertenecientes al dominio B.

Para determinar el sitio predefinido en un polipéptido que tenga actividad FVIII para la unión al polímero que conservará la actividad del factor VIII y mejorará la farmacocinética, las siguientes guías se presentan en base al BDD FVIII. Las modificaciones se deberán dirigir a la eliminación, inactivación y mecanismos inmunogénicos tales como LRP, HSPG, APC, y a los sitios de unión de los anticuerpos inhibidores. Stolova-McPhie, S. *et al.*, 2002, *Blood* 99(4), pág. 1215-23 muestra la estructura de BDD. Por ejemplo, para prolongar la semivida se puede introducir un único PEG en un sitio específico en o cerca de los sitios de unión de LRP en los residuos A2 484-509 y los residuos A3 1811-1818. La introducción del PEG voluminoso en estos sitios debería alterar la capacidad del FVIII para unirse a LRP y reducir la eliminación del FVIII de la circulación. También se cree que para prolongar la semivida sin que ello afecte significativamente a la actividad se puede introducir un PEG en el residuo 1648, que está en la unión del dominio B y el dominio A3 en la molécula de longitud completa y en el ligador I de 14 aminoácidos del BDD entre los dominios A2 y A3.

La especificidad de la PEGilación se puede conseguir mediante modificación por ingeniería de un único residuo de cisteína en los dominios A2 y A3 usando técnicas de mutagénesis de ADN recombinante, seguido de PEGilación específica de sitio de la cisteína introducida con un reactivo PEG específico de cisteína, tal como PEG-maleimida. Otra ventaja de la PEGilación en 484-509 y 1811-1818 es que estos dos epítomos representan dos de las tres clases principales de sitios antigénicos inhibidores en pacientes. Para conseguir un efecto máximo de mejorar de la semivida en circulación y reducción de la respuesta inmunogénica, los sitios de unión A2 y A3 de LRP se pueden PEGilar, dando un producto diPEGilado. Cabe destacar que la PEGilación dentro de la región 1811-1818 puede conducir a una pérdida significativa de actividad, ya que esta región también está implicada en la unión al FIX. La PEGilación dirigida a sitio en 558-565 debería anular la unión de HSPG, pero también puede reducir la actividad, ya que esta región también se une a FIX.

Sitios adicionales en la superficie se pueden PEGilar para identificar un nuevo mecanismo de eliminación del FVIII. La PEGilación del dominio A2 puede ofrecer ventajas adicionales en cuando a que el dominio A2 se disocia del FVIII tras su activación y probablemente se elimine de la circulación más rápido que el resto de la molécula de FVIII por su tamaño más pequeño. Por otro lado, el A2 PEGilado puede ser lo bastante grande como para escapar al aclaramiento renal y tiene una semivida en plasma comparable al resto del FVIII y, por consiguiente, puede reconstituir el FVIII activado *in vivo*.

IDENTIFICACIÓN DE SITIOS DE PEGilación EN LAS REGIONES A2 Y A3. Se seleccionaron cinco posiciones (Y487, L491, K496, L504 and Q468 correspondiente a las posiciones PEG1-5) en o cerca de la posible región A2 de unión a LRP como ejemplos para la PEGilación dirigida a sitio en base a la elevada exposición en superficie y la dirección hacia afuera de su trayectoria de C α a C β . Además, estos residuos están aproximadamente equidistantes entre sí en la estructura tridimensional de la molécula, de modo que juntos pueden representar esta región completa. Se seleccionaron ocho posiciones (1808, 1810, 1812, 1813, 1815, 1795, 1796, 1803, 1804 correspondientes a PEG6-14) en o cerca de la posible región A3 de unión a LRP como ejemplos para la PEGilación dirigida a sitio. PEG6 (K1808) es adyacente a 1811-1818 y el sitio de glicosilación unido a N natural en 1810. La PEGilación en la posición 1810 (PEG7) sustituirá el azúcar por un PEG. La mutación en la posición de PEG8 T1812 también anulará el sitio de glicosilación. Aunque se predijo que la posición PEG9 (K1813) estaba apuntando hacia el interior, se seleccionó en caso de que el modelo de estructura no fuera correcto. PEG10 (Y1815) es un aminoácido hidrófobo voluminoso dentro del bucle de unión a LRP y puede ser un residuo de interacción crucial, ya que los aminoácidos hidrófobos normalmente se encuentran en el centro de las interacciones proteína-proteína. Dado que se ha notificado que la región 1811-1818 está implicada en la unión a LRP y a FIX, se pensó que la PEGilación dentro de este bucle posiblemente tenga como resultado una actividad reducida. Por tanto, PEG11-PEG14 (1795, 1796, 1803, 1804) se diseñaron para estar cerca del bucle 1811-1818 pero no dentro del bucle, por lo que se puede disociar la unión a LRP y a FIX con PEG de diferentes tamaños.

Para bloquear los sitios de unión a LRP de forma simultánea, se puede generar una PEGilación doble, por ejemplo las posiciones PEG2 y PEG6.

Dado que se ha demostrado que la región 558-565 se une tanto a HSPG como a FIX, no se diseñaron sitios dentro de esta región. En su lugar, se diseñaron PEG15-PEG17 (377, 378 y 556) entre las regiones A2 de unión a LRP y HSPG de forma que un PEG unido puede interferir en ambas interacciones y alterar las posibles interacciones entre ellos. También se pudieron seleccionar sitios adicionales expuestos en la superficie y apuntando hacia fuera dentro de o cerca de las regiones de unión a LRP y HSPG. Para identificar nuevos mecanismos de aclaramiento, el FVIII se puede PEGilar sistemáticamente. Además de PEG1-17, los tres sitios de glicosilación naturales, es decir N41, N239, and N2118 correspondientes a PEG18-20 se pueden usar como puntos de unión para la PEGilación, ya que deberían estar expuestos en la superficie. Las áreas de superficie dentro de un radio de 20 Angstrom desde los átomos C α de PEG2, PEG6 y los cuatro sitios de glicosilación se mapearon sobre el modelo de BDD además de los sitios de interacción funcionales para vWF, FIX, FX, fosfolípidos y trombina.

PEG21-29 correspondiente a Y81, F129, K422, K523, K570, N1864, T1911, Q2091, y Q2284 se seleccionaron después en base a su capacidad para cubrir casi toda la superficie de BDD restante con un radio de 20 Angstrom de cada uno de sus átomos C β . Estas posiciones también se seleccionaron porque están completamente expuestas, apuntando hacia fuera y lejos de las cisteínas naturales para minimizar la posible formación incorrecta de disulfuros. Cabe esperar que el radio de 20 Angstrom se elige porque un PEG grande, tal como un PEG ramificado de 64 kDa, tenga el potencial de cubrir una esfera con un radio de aproximadamente 20 Angstrom. La PEGilación de PEG21-29 junto con PEG2 and PEG6 y los sitios de glicosilación PEG18, 19, y 20 es probable que protejan casi toda la superficie no funcional de FVIII.

Las posiciones de PEGilación que conducen a propiedades potenciadas, tales como un perfil PK mejorado, mayor estabilidad o inmunogenicidad reducida, se pueden combinar para generar un producto multPEGilado con propiedades máximamente potenciadas. PEG30 y PEG31 se diseñaron eliminando los disulfuros expuestos en los dominios A2 y A3, respectivamente. PEG30, o C630A, deberían liberar su pareja de disulfuro C711 para la PEGilación. Asimismo, PEG31, C1899A deberán permitir la PEGilación de C1903.

MUTAGÉNESIS. Los sustratos para la PEGilación dirigida a sitio de FVIII se pueden generar introduciendo un codón para cisteína en el sitio elegido para la PEGilación. Se usó el kit de mutagénesis dirigida a sitio Stratagene cQuickChange II para fabricar todos los mutantes de PEG (kit de Stratagene 200523 de Stratagene Corporation, La Jolla, Calif.). El procedimiento de la mutagénesis dirigida a sitio cQuickChange.TM. se realiza usando Pfu Turbo.RTM, ADN polimerasa y un cicladador de temperatura. Dos cebadores oligonucleotídicos complementarios que contenían la mutación deseada se alargan usando Pfu Turbo, que no desplazarán los cebadores. El dsADN que contiene el gen de FVIII salvaje se usa como molde. Tras múltiples ciclos de elongación, el producto se digiere con DpnI endonucleasa, que es específico del ADN metilado. El ADN recién sintetizado que contiene la mutación no está metilado, mientras que el ADN silvestre parental está metilado. El ADN digerido se usa después para transformar células XL-1 Blue súpercompetentes.

La eficiencia de la mutagénesis es casi del 80%. Las reacciones de mutagénesis se realizaron en pSK207+BDD C2.6 o pSK207+BDD. El éxito de la mutagénesis se confirmó mediante secuenciación del ADN y fragmentos

adecuados, que contienen la mutación, se transfirieron en la estructura del FVIII en el vector de expresión en mamíferos pSS207+BDD. Después de la transferencia, de nuevo se confirmó la secuencia de todas las mutaciones. Para las muteínas de A3 PEG 6, 7, 8, 9, and 10, se realizó mutagénesis en el vector pSK207+BDD C2.6. Después de la confirmación mediante secuenciación, el fragmento mutante, KpnI/Pme, se subclonó en pSK207+BDD. La muteína de BDD se subclonó después en el vector de expresión pSS207+BDD. Para las muteínas de A3 PEG 11, 12, 13, 14, se realizó mutagénesis directamente en el vector pSK207+BDD y el mutante de BDD de secuencia confirmada se subclonó después en pSK207+BDD. Para las muteínas de A2 PEG 1, 2, 3, 4, 5, la mutagénesis se realizó en el vector pSK207+BDD C2.6. El mutante de secuencia confirmada se subclonó en pSK207+BDD y después en pSS207+BDD.

10 Los cebadores (solo hebra sentido) usados para la mutagénesis se enumeran para cara reacción

PEG1, Y487C: GATGTCCGTCCTTTGTGCTCAAGGAGATTACCA (SEC ID Nº 13)
 PEG2, L491C: TTGTATTCAAGGAGATGCCCAAAAGGTGTAAC (SEC ID Nº 14)
 PEG3, K496C: TTACCAAAAGGTGTATGCCATTTGAAGGATTTTC (SEC ID Nº 15)
 PEG4, L504C: AAGGATTTTCCAATTTGCCAGGAGAAATATTC (SEC ID Nº 16)
 15 PEG5, Q468C: GATTATATTTAAGAATTGCGCAAGCAGACCATAT (SEC ID Nº 17)
 PEG6, K1808C: TAGAAAAAAGCTTTGTCTGCCCTAATGAAACCAAAAC (SEC ID Nº 18)
 PEG7, N1810C: AACTTTGTCAAGCCTTGCGAAACCAAACTTAC (SEC ID Nº 19)
 PEG8, T1812C: GTCAAGCCTAATGAATGCAAACTTACTTTTGGA (SEC ID Nº 20)
 PEG9, K1813C: CAAGCCTAATGAAACCTGCACTTACTTTTGGAAG (SEC ID Nº 21)
 20 PEG10, Y1815C: CTAATGAAACCAAACTTGCTTTTGGAAGTGCAAC (SEC ID Nº 22)
 PEG11, D1795C: ATTTCTTATGAGGAATGCCAGAGGCAAGGAGCA (SEC ID Nº 23)
 PEG12, Q1796C: TCTTATGAGGAAGATTGCAGGCAAGGAGCAGAA (SEC ID Nº 24)
 PEG13, R1803C: CAAGGAGCAGAACCTTGCAAAACTTTGTCAAGCCT (SEC ID Nº 25)
 PEG14, K1804C: GGAGCAGAACCTAGATGCAACTTTGTCAAGCCT (SEC ID Nº 26)
 25 PEG15, K377C: CGCTCAGTTGCCAAGTGTCTCCTAAACTTGG (SEC ID Nº 27)
 PEG16, H378C: TCAGTTGCCAAGAAGTGTCTAAACTTGGGTA (SEC ID Nº 28)
 PEG17, K556C: CTCCTCATCTGCTACTGCGAATCTGTAGATCAA (SEC ID Nº 29)
 PEG18, N41C: CAAAATCTTTTCCATTCTGCACCTCAGTCGTGTAC (SEC ID Nº 30)
 PEG19, N239C: GTCAATGGTTATGTATGCAGGTCTCTGCCAGGT (SEC ID Nº 31)
 30 PEG20, N2118C: CAGACTTATCGAGGATGTTCCACTGGAACCTTA (SEC ID Nº 32)
 PEG21, Y81C: ATCCAGGCTGAGGTTTGTGATACAGTGGTCATT (SEC ID Nº 33)
 PEG22, F129C: GAAGATGATAAAGTCTGTCTGGTGGGAAGCCAT (SEC ID Nº 34)
 PEG23, K422C: CAGCGGATTGGTAGGTGTTACAAAAAGTCCGA (SEC ID Nº 35)
 PEG24, K523C: GAAGATGGGCCAACTTGCTCAGATCCTCGGTGC (SEC ID Nº 36)
 35 PEG25, K570C: CAGATAATGTCAGACTGCAGGAATGTCATCCTG (SEC ID Nº 37)
 PEG26, N1864C: CACACTAACACACTGTGTCTGCTCATGGGAGA (SEC ID Nº 38)
 PEG27, T1911C, CAGATGGAAGATCCCTGCTTTAAAGAGAATTAT (SEC ID Nº 39)
 PEG28, Q2091C: ACCCAGGGTGCCCGTTGCAAGTTCTCCAGCCTC (SEC ID Nº 40)
 PEG29, Q2284C: AAAGTAAAGTTTTTTCGCGAAATCAAGACTCC (SEC ID Nº 41)
 40 PEG30, C630A: TTGCAGTTGTCAGTTGCTTTGCATGAGGTGGCA (SEC ID Nº 42)
 PEG31, C1899A: AATATGGAAGAAACGCTAGGGCTCCCTGCAAT (SEC ID Nº 43)

EXPRESIÓN DE MUTEÍNAS. Tras la inserción en un vector que confiere resistencia a higromicina B, las muteínas de PEG se transfirieron en células HKB11 (patente de EE.UU. Nº 6.136.599) en complejo con el reactivo de transfección 293 Fectin Transfection Reagent (Invitrogen Corp. Nº de cat. 12347-019) según las instrucciones del fabricante. La expresión de FVIII a los tres días de la transfección se evaluó mediante ensayo cromogénico Coatest (Chromogenix Corp. Nº de cat. 821033, véase el ensayo cromogénico del Ejemplo 12). Las células transfectadas se introdujeron después a presión selectiva con 50.cuadratura.g/ml de higromicina B en un medio de crecimiento suplementado con 5% de FBS. Cuando aparecieron las colonias resistentes a higromicina B se escogieron manualmente y se sometieron a detección para la expresión de FVIII mediante ensayo cromogénico Coatest. Las células estables que expresaban FVIII se adaptaron después a un medio que contenía suplemento de HPPS. Las células se expandieron y se sembraron a 1×10^5 células/ml en matraces de agitación con medio fresco. El fluido del cultivo tisular (TCF) recogido tras 3 días se usó para la purificación de las muteínas FVIII BDD. La actividad del FVIII del TCF se analizó mediante Coatest.

PURIFICACIÓN DE MUTEÍNA. Tras la recolección del sobrenadante del cultivo celular que contenía la proteína muteína de FVIII secretada, el sobrenadante se filtra a través de un filtro de membrana de 0,2 micrómetros para eliminar todas las células restantes. Después, el sobrenadante se concentra mediante ultrafiltración o intercambio aniónico. Después se aplica a una columna de inmunoafinidad, en la que se eliminan los componentes del medio de cultivo celular y la mayoría de las impurezas proteicas de la célula huésped. El eluato de la columna de inmunoafinidad se somete a intercambio con tampón mediante infiltración en un tampón de formulación que contiene sacarosa y se congela. El rendimiento y la recuperación de proteína en una columna de anticuerpo del FVIII monoclonal se evaluaron mediante ensayo cromogénico. Las muestras de carga, flujo continuo, varias fracciones del eluato, tiras y el eluato diafiltrado de una carrera de cromatografía se analizaron para determinar la actividad de FVIII.

PEGILACIÓN. El FVIII de longitud competa nativo o el BDD no se pueden PEGilar mediante PEG específicos de cisteína sin reducción y desnaturalización a un exceso superior a 100 veces de PEG: proporción de proteínas (datos no mostrados), lo que confirma la hipótesis basada en el modelo de estructura de BDD de que todas las cisteínas nativas forman disulfuros o están enterradas dentro del FVIII. Las muteínas de cisteína de FVIII expresadas y purificadas usando los protocolos estándar enumerados anteriormente no se pudieron PEGilar con un reactivo de PEG maleimida específico de cisteína, probablemente porque la cisteína introducida en FVIII se “tapa con un capuchón” haciendo reaccionar con los grupos sulfhidrilo, tales como cisteína y β -mercaptoetanol, presentes en el medio de crecimiento celular. Este problema se puede resolver potencialmente eliminando las cisteínas y el β -mercaptoetanol del medio de cultivo, pero esto puede conducir a una menor producción de FVIII y no prevendría el bloqueo por los sulfhidrilos liberados por las células de la cisteína introducida en el FVIII.

En otro aspecto se desarrolló un procedimiento de tres etapas para permitir la PEGilación específica de sitio del FVIII. En la etapa 1, la muteína de cisteína de FVIII en aproximadamente 1 μ M se reduce ligeramente con reductores tales como Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) aproximadamente 0,7 mM o ditioneitol (DTT) 0,07 mM durante 30 minutos a 4 °C para liberar el “capuchón”. En la etapa 2, el reductor se elimina junto con el “capuchón” mediante un procedimiento de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), tal como pasando la muestra a través de una columna de centrifugación BioRad) para permitir que los disulfuros del FVI se vuelvan a formar dejando la cisteína introducida libre y reducida. En la etapa 3, al menos 30 minutos después de la eliminación del reductor, la muteína cisteína del FVIII liberada se trata con un exceso molar de al menos 10 veces de PEG-maleimida con tamaños que varían de 5 a 64 kDa (Nektar Therapeutics y N.O.F. Corporation) durante al menos 1 hora a 4 °C. Este procedimiento da un perfil de producto altamente consistente con datos reproducibles para docenas de reacciones repetidas por individuos diferentes.

Dado que el procedimiento en columna de centrifugación para la eliminación de TCEP no se puede escalar se seleccionó la cromatografía de desalación con filtración en gel. No obstante, tras analizar este procedimiento usando una muestra enriquecida en TCEP, se demostró que el TCEP eluía a niveles mensurables en la fase móvil de la columna y no justo en la fracción de sal como cabría esperar de una molécula con su peso molecular bajo. Los ensayos de transferencia de tipo Western mostraron una PEGilación de fondo significativa probablemente por una eliminación incompleta de TCEP. Durante este tiempo, experimentos aparte mostraron que el material purificado de C7F7 podría purificarse significativamente a partir de otras impurezas proteicas usando un medio de cromatografía de intercambio aniónico combinado con un gradiente de sales. Después, se decidió reducir el material C7F7 con TCEP como se ha descrito anteriormente y, después, procesar el material en una columna de intercambio aniónico. Dada la diferencia de cargas, la proteína FVIII se retendría mientras que el TCEP fluiría por la columna y no se retendría. Al mismo tiempo, durante la elución de las sales en gradiente, la proteína FVIII se purificaría lejos de la mayoría de las impurezas proteicas restantes. Esto significó que esta última PEGilación sería, en teoría, más homogénea con material de partida más puro. No obstante, tras el análisis con una muestra enriquecida de TCEP, se demostró que se hallaban niveles mensurables de TCEP eluyendo en el gradiente con el FVIII. Por tanto, se decidió implementar la cromatografía de desalación de filtración en gel después de la cromatografía de intercambio aniónico, por tanto estados dos etapas, cuando se usaron en secuencia, tendrían como resultado la eliminación completa de TCEP y la eliminación de PEGilación inespecífica.

ANÁLISIS DE LA PEGILACIÓN MEDIANTE SDS PAGE Y TRANSFERENCIA DE TIPO WESTERN. El producto PEGilado se puede analizar mediante electroforesis en un gel reductor de TrisGlicina al 6% de SDS poliácridamida (Invitrogen). Tras la electroforesis, el gel se puede teñir con azul de Coomassie para identificar todas las proteínas o someterlo a un protocolo estándar de transferencia de tipo Western para identificar el patrón de PEGilación en diferentes regiones del FVIII. La tinción de la transferencia con un anticuerpo monoclonal R8B12 o C7F7 de ratón producido contra la región en C-terminal de la cadena pesada del FVIII o la región N-terminal de la cadena ligera de FVIII, respectivamente, deberá identificar la PEGilación de las respectivas cadenas. La tinción con el anticuerpo 413 contra la región 484-509 del FVIII determinará si la PEGilación es, de hecho, específica de sitio o no para muteínas tales como PEG 1-4. Asimismo, la tinción con el anticuerpo CLB-CAG A que reconoce la región 1801-1823 del FVIII determinará si la PEGilación es específica de sitio o no para las muteínas tales como PEG6-10.

Se demostró que la PEGilación PEG2 (L491C) era selectiva de la cadena pesada por encima de la cadena ligera y particularmente selectiva de la región 484-509, mientras que se demostró que PEG6 (K1808C) era selectivo de la cadena ligera por encima de la cadena pesada.

ANÁLISIS DE LA PEGILACIÓN MEDIANTE ESCISIÓN CON TROMBINA Y TRANSFERENCIA DE TIPO WESTERN. El producto PEGilado se puede tratar con trombina (40 UI/ μ g de FVIII) a 37°C durante 30 minutos. La trombina usada también contiene APC como contaminante. La escisión con trombina generará los dominios A1 de 50 kDa y A2 de 43 kDa de la cadena pesada, mientras que la escisión de APC dividirá el dominio A2 adicionalmente en los fragmentos de 21 y de 22 kDa. La tinción con el anticuerpo R8B12, que reconoce el extremo C de la cadena pesada solo identificará el dominio A2 intacto y el fragmento en C-terminal de 21 kDa (FVIII 562-740). Por tanto, si la PEGilación de PEG2 era específica de la posición 491, el dominio A2 de 43 kDa deberá estar PEGilado pero no el fragmento en el extremo C de 21 kDa. De hecho, esto se confirmó mediante transferencia de tipo Western para el PEG2 PEGilado de 22 kDa. Por tanto, mediante eliminación, la PEGilación de PEG2 se ha localizado en el fragmento de 22 kDa en N-terminal (FVIII 373-561) del dominio A2. Dado Que PE—maleimida es completamente selectivo de las cisteínas a pH 6,8 y las únicas cisteínas del FVIII nativo en 373-561 proceden de un disulfuro

enterrado entre 528 y 554, PEG2 está, muy probablemente, PEGilado en la cisteína introducida en la posición 491. La tinción de tipo Western del PEG2 PEGilado tratado con trombina con un anticuerpo N-terminal de la cadena pesada de FVIII mostró ausencia de PEGilación del dominio A1 (datos no mostrados). La PEGilación selectiva de PEG2 usando el procedimiento de escisión con trombina también se ha confirmado para los PEG de 5, 12, 33, and 43 kDa (datos no mostrados). La escisión con trombina con el FVIII de longitud completa silvestre PEGilado muestra que solo el dominio B está PEGilado.

ANÁLISIS DE LA PEGILACIÓN MEDIANTE TINCIÓN CON YODO. Para confirmar que las bandas recién creadas en tinción con azul de Coomassie y de tipo Western eran de hecho bandas PEGiladas se usó tinción con bario-yodo, que es específica de PEG. El PEG2 PEGilado se pasó por un gel de TrisGlicina al 6% (Invitrogen) y se tiñó con el anticuerpo de la cadena pesada de R8B12 o una solución de bario-yodo (Lee et al, Pharm Dev Technol. 1999 4:269-275). Las bandas PEGiladas se correspondían entre las dos tinciones usando el marcador de peso molecular para alinearlas, de modo que se confirma la PEGilación de la cadena pesada de FVIII.

ANÁLISIS DE LA PEGILACIÓN MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS-MALDI. Para confirmar la PEGilación del dominio A2 en la cadena pesada, la muestra de rFVIII, antes y después de la PEGilación se analizó mediante espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). Las muestras se mezclaron y cristalizaron en la placa diana de MALDI con una matriz de ácido sinapínico en 30% de acetonitrilo, 0,1% de TFA. Después se analizaron en un espectrómetro Voyager DE-PRO en modo lineal, positivo. Los resultados mostraron la cadena ligera de PEG2 centrada a 83 kDa y la cadena pesada (HC) a 89 kDa. El espectro adquirido para la muestra PEGilada mostró un descenso del pico de la HC y la formación de un nuevo pico, centrado a 111 kDa. Esto confirma la PEGilación de la cadena pesada. No se observó PEGilación de la cadena ligera (a 105 kDa) por encima del límite de detección.

Después, las muestras se sometieron a digestión con trombina a 20 unidades de trombina/mg de FVIII a 37°C durante 30 minutos, tras la determinación de la concentración de FVIII mediante análisis de los aminoácidos (Commonwealth Biotechnologies, Inc.). La cadena pesada se escindió en una fracción en N-terminal de 46 kDa (A1) y una fracción (A2) de 43 kDa. El espectro MALDI adquirido para la muestra PEGilada muestra la pérdida del pico de 43 kDa y el desarrollo de un nuevo pico de 65 kDa, debido al dominio A2 PEGilado. De nuevo no se observa PEGilación de la LC por encima del límite de detección. Estos resultados confirman de nuevo la PEGilación del dominio A2 del FVIII. El mismo análisis se aplicó al PEG6 PEGilado, lo que confirma la PEGilación del fragmento A3C1C2 de la cadena ligera.

Medición de la actividad

ENSAYO DE COAGULACIÓN. El procedimiento de ensayo del FVIII de coagulación:C es un ensayo de una etapa pasado en el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). El FVIII actúa como cofactor en presencia del Factor IXa, calcio y fosfolípidos en la conversión enzimática del Factor X a Xa. En este ensayo, las muestras de ensayo diluidas se incuban a 37°C con una mezcla de sustrato plasmático deficiente en FVIII y reactivo de aPTT. A la mezcla incubada se añade cloruro cálcico y se inicia la coagulación. Existe una relación inversa entre el tiempo (Segundos) necesario para que se forme un coágulo y el logaritmo de la concentración de FVIII:C. Los niveles de actividad para muestras desconocidas se interpolan mediante comparación de los tiempos de coagulación de varias diluciones del material de ensayo con una curva construida a partir de una serie de diluciones de la materia estándar de actividad conocida y se expresan en unidades internacionales por ml (UI/ml).

ENSAYO CROMOGÉNICO. El procedimiento del ensayo cromogénico de dos etapas consecutivas en las que la intensidad del color es proporcional a la actividad del FVIII. En la primera etapa, el factor X se activa en FXa mediante FIXa con su cofactor, FVIIIa, en presencia de cantidades óptimas de iones de calcio y fosfolípidos. Hay presentes cantidades en exceso del factor X de forma tal que la velocidad de activación del factor X es dependiente únicamente de la cantidad de FVIII. En la segunda etapa, el factor Xa hidroliza el sustrato cromogénico para dar un cromóforo y la intensidad del color se lee fotométricamente a 405 nm. Se calcula la potencia de uno desconocido y la validez del ensayo se comprueba con el procedimiento estadístico de la pendiente-proporción. La actividad se expresa en unidades internacionales por ml (UI/ml).

El bucle 1811-1818 está implicado en la unión a FIX, pero la importancia de las posiciones individuales dentro de este bucle no se ha determinado. Las muteínas PEG7-10 muestran una actividad cromogénica específica casi idéntica respecto al FVIII nativo.

ELISA DE ANTÍGENO TOTAL (TAE). El FVIII se captura en una placa de microtitulación que se ha revestido con un anticuerpo policlonal frente al FVIII. El FVIII unido se detecta con un anticuerpo policlonal biotinilado frente a rFVIII y peroxidasa de rábano (HARP) conjugada con estreptavidina. El complejo peroxidasa-estreptavidina produce una reacción de color tras la adición de sustrato de tetrametilbencidina (TMB). Las concentraciones de la muestra se interpolan a partir de una curva patrón usando modelos de ajuste de cuatro parámetros.

ELISA DE UNIÓN AL vWF Se permite la unión del FVIII a vWF en plasma de hemofílico grave en solución. El complejo FVIII-vWF se captura después en una placa de microtitulación que se ha revestido con un anticuerpo monoclonal específico del vWf. El FVIII unido al vWf se detecta con un conjugado de anticuerpo policlonal frente al

FVIII anti-conejo-peroxidasa de rábano. El complejo anticuerpo conjugado con peroxidasa produce una reacción de color tras la adición del sustrato. Las concentraciones de la muestra se interpolan a partir de una curva patrón usando un modelo de ajuste de cuatro parámetros. Los resultados de unión a FVIII se expresan en $\mu\text{g/ml}$. No se produjo un impacto significativo sobre ninguna de las actividades tras la PEGilación que fuera consistente con la PEGilación en el dominio B.

PURIFICACIÓN DEL FVIII PEGilado MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO. El FVIII PEGilado se aplica a una columna de intercambio aniónico o columna de intercambio catiónico, en la que la proteína se une a la columna mientras que ningún exceso de reactivo PEG libre se une y se elimina del flujo continuo. La muteína de PEG se eluye después de la columna con un gradiente de cloruro sódico. Se usó un gel de Bis-Tris al 4-12% teñido con bario-yodo de carga, flujo continuo y fracciones de gradiente para confirmar que las fracciones de elución de la columna tienen la muteína PEGilada.

PURIFICACIÓN DEL FVIII PEGilado MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO. Las fracciones del intercambio aniónico que contienen la mayoría de la muteína PEG2 se combinan y se concentran mediante ultrafiltración, después se aplican a una columna de exclusión por tamaño. Las columnas se eluyen después usando el tampón de formulación. Dado que la diferencia de tamaño y de forma de la proteína depende de si el PEG está unido a la proteína, esta columna separa la muteína PEG2 PEGilada de la de cualquier PEG2 restante, que no está PEGilada. Las fracciones de FVIII de la muteína PEGilada se combinan según las que tienen la mayor cantidad de actividad del FVIII, después se congelan para posteriores estudios con animales y caracterización molecular.

Con las muteínas como PEG6 que muestran eficiencias más bajas de PEGilación, es decir menos del 50%, el esquema de purificación más eficaz para dar el producto PEGilado altamente puro es usar una combinación de cromatografía de intercambio catiónico seguida de cromatografía de exclusión por tamaño. Por ejemplo, con PEG6, la cromatografía de exclusión por tamaño purifica el PEG6 PEGilado (fracción de elución más temprana) de la mayoría de PEG6 no PEGilado (fracción de elución más tardía). La cromatografía de exclusión purifica después la proteína PEGilada (fracción de elución más temprana) del resto de la proteína sin PEGilar (fracción de elución más tardía).

EFFECTO DEL TAMAÑO DE PEG SOBRE LA ACTIVIDAD. Para analizar si los tamaños de PEG tienen un efecto sobre la coagulación y las actividades cromogénicas del FVIII tras la PEGilación, el FVIII de longitud completa purificado, PEG2, PEG6, and PEG14 se redujeron mediante TCEP seguido de la eliminación reductora y reacción con un tampón control o PEG que varían de 6 kDa a 64 kDa. El FVIII PEGilado resultante se analizó directamente sin eliminar el exceso de PEG o el FVIII no PEGilado. Los experimentos control mostraron que el exceso de PEG no tenía efectos sobre la actividad del FVIII.

La PEGilación dentro de los dominios A2 o A3 en la posición PEG2, PEG6 o PEG14 de BDD condujo a pérdidas considerables de la actividad de coagulación cuando el tamaño de PEG aumenta más allá de 6 kDa. No obstante, la PEGilación en el dominio B en una cisteína del dominio B nativo del FVIII de longitud completa no tuvo efectos sobre la actividad de coagulación. Es interesante el hecho de que la actividad cromogénica no se ve afectada por todas las construcciones PEGiladas. Esto se puede deber a diferencias en los ensayos. Es posible que el sustrato peptídico cromogénico pequeño tenga un acceso más fácil a un complejo de FVIII/FIX/FX PEGilado que el sustrato proteico más grande usado en el ensayo de coagulación. Como alternativa, el PEG puede afectar a la activación de la muteína. Esto se detectaría más fácilmente mediante el ensayo de coagulación en una etapa que con el ensayo cromogénico de dos etapas.

Para confirmar la observación de los efectos de PEG sobre la actividad de coagulación de PEG2, 6 y 14, se purificaron varias construcciones PEGiladas del PEG en exceso y no PEGilado. Dado que el PEG no tiene ningún efecto sobre la actividad cromogénica, la proporción entre la actividad cromogénica y la coagulación es una buena estimación del efecto relativo del PEG sobre la actividad de coagulación. PEG más grandes en una posición dada, tal como PEG2 y un número más alto de PEG como en el caso con la construcción PEG2+6, inducen una mayor pérdida de actividad de coagulación.

ESTUDIO PK EN CONEJOS Para entender los efectos de la PEGilación sobre la farmacocinética (PK) del FVIII, se realizaron estudios PK en una serie de especies. Para el estudio se usaron conejos NZW SPF: 10 hembras, 5 conejos por grupo, 2 grupos (PEG2 FVIII y PEG2 PEGilado de 22 kDa). Las muestras se diluyeron en PBS estéril con una concentración final de 100 UI/ml (unidades cromogénicas). Cada conejo recibió una dosis de 1 ml/kg (100 UI/kg) de la sustancia de ensayo diluida o control a través de la vena de la oreja marginal. Varias veces después de la inyección, se extrajeron muestras de sangre (1 ml) con una jeringa de 1 ml (cargada con 100 μl de citrato sódico al 3,8%) de la arteria central de la oreja en puntos de tiempo definidos tras la administración de las dosis. Las muestras de plasma se incubaron con el anticuerpo de la cadena pesada R8B12 revistiendo una placa de 96 pocillos para capturar específicamente el FVIII humano administrado. La actividad del FVIII capturado se determinó mediante el ensayo cromogénico. PEG2 PEGilado y PEG6 PEGilado también se compararon con BDD, con muteínas PEGiladas que muestran una mejora de la recuperación en plasma en comparación con BDD. El FVIII de longitud completa silvestre PEGilado no parecía mostrar mucha mejora.

ESTUDIO PK EN RATÓN. Como segunda especie, en los estudios PK se usaron ratones ICR normales o hemofílicos deficientes en FVIII (Taconic, Hudson, N.Y.). Para el estudio se usaron ratones normales, 5 ratones por grupo por punto de tiempo. Los materiales de ensayo se diluyeron en tampón de formulación hasta una concentración final nominal de 25 UI/ml. A cada ratón se le puede administrar 4 ml/kg (aproximadamente 0,1 ml de volumen total) del material de ensayo diluido a través de la vena de la cola. Se extraen muestras de sangre (0,45 o 0,3 ml para el estudio de ratones normales o hemofílicos, respectivamente) en una jeringuilla de 1 ml (cargada con 50 o 30 μ l de Na-citrato al 3,8% para el estudio con ratones normales o hemofílicos, respectivamente) desde la vena cava inferior al punto de tiempo indicado (un animal por muestra). Las muestras de plasma se analizan para determinar la concentración de FVIII usando el procedimiento de ensayo cromogénico descrito con anterioridad. El PEG6 PEGilado muestra mayor recuperación en plasma en comparación con BDD o PEG6. El PEG2 PEGilado muestra mayor recuperación en plasma en comparación con BDD.

RECUPERACIÓN DEL FACTOR VIII (BDD) DE RATÓN HEMOFÍLICO. El histograma de recuperación del factor VIII (BDD) de ratón hemofílico representa una evaluación farmacocinética (PK) de la semivida de dos especies de Factor VIII BDD en un ensayo de ratón hemofílico. Este ensayo se diseñó para medir las concentraciones en plasma del Factor VIII BDD y la variante PEG 2+6 doble PEGilada del Factor VIII BDD (y se identificó en otro lugar en el presente documento como la variante doble L491C, K1808C del Factor VIII BDD) en tres puntos de tiempo tras la administración intravenosa en un modelo de ratón. Mientras que las evaluaciones PK en los puntos de tiempo de 0,8 y 0,4 horas eran comparables, la evaluación de 16 horas es particularmente considerable. A las 16 horas, aproximadamente cuatro veces (400 %) más que la variante del factor VIII BDD doblemente PEGilado (PEG 2+6) quedaban en el plasma de ratón 16 horas después de la administración en comparación con la molécula sin PEGilar.

MODELO DE LACERACIÓN RENAL. Para determinar si las muteínas de FVIII PEGilado eran eficaces en la detención de un sangrado en un ratón hemofílico se usó el modelo de laceración renal. Ratones hemofílicos (C57/BL6 con un gen del FVIII alterado) fueron anestesiados con isoflurano y se pesaron. Se expuso la vena cava inferior 1 se inyectaron 100 μ l de solución salina o de FVIII usando una aguja de 0,3 mm. La aguja se retiró cuidadosamente y se aplicó presión en el lugar de la inyección durante 30-45 segundos para evitar sangrados. Tras dos minutos, se expuso el riñón derecho y se mantuvo entre las pinzas a lo largo del eje vertical. Usando un escalpelo del N° 15 se cortó horizontalmente el riñón hasta una profundidad de 3 mm. Para garantizar una profundidad uniforme de la lesión, el riñón se sujetó ligeramente en el medio para exponer igual cantidad de tejido a ambos lados de las pinzas. La superficie expuesta del riñón se cortó hasta la profundidad de las pinzas. La pérdida de sangre se cuantificó como se ha descrito en lo que antecede. Se analizaron diferentes dosis de FVIII en los ratones para caracterizar la relación de la respuesta a la dosis del FVIII con la hemorragia renal. El PEG2 PEGilado muestra una potencia comparable a BDD en la reducción de la pérdida de sangre tras la lesión renal del ratón. Por tanto, aunque la actividad de coagulación de PEG2 PEGilado es menor que la de BDD, este modelo de laceración renal muestra que la eficacia *in vivo* de PEG2 PEGilado no se reducía censurablemente en comparación con BDD, consistente con los datos del ensayo cromogénico.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE ANTICUERPOS. La adición de un polímero de peso molecular alto, tal como polietilenglicol (PEG) específicamente en la posición 491 (es decir, PEG2) debería reducir la unión y la sensibilidad a mAB 413 y mediante la extensión a una gran proporción de anticuerpos inhibidores de los pacientes, ya que muchos pacientes desarrollan anticuerpos inhibidores contra el mismo epítipo de mAB 413. Para analizar esto, se incubaron cantidades crecientes de mAB 413 con cantidades no saturantes (0,003 UI/ml) de BDD o PEG2 PEGilado de 43 kDa y se analizó la actividad funcional en un ensayo cromogénico. R8B12, un anticuerpo no inhibidor, y ESH4, un anticuerpo inhibidor que está dirigido al dominio C2 se usaron como controles. PEG2 PEGilado es, de hecho, más resistente a la inhibición de mAB 413 que BDD y muestra un patrón de inhibición similar en presencia de los anticuerpos control que no se unen cerca de la posición 491. Además, el efecto de protección del PEG contra la inhibición por mAB 413 depende del tamaño del PEG, teniendo los PEG más grandes un efecto mayor. Para analizar si el FVIII PEGilado es más resistente a los anticuerpos inhibidores de pacientes, se midió la actividad cromogénica en presencia de un panel de plasma derivado de pacientes de hemofilia A que han desarrollado inhibidores al FVIII. Del plasma de 8 pacientes analizados, el PG2 PEGilado de 43 kDa fue más resistente a la inhibición en el plasma de los pacientes que BDD en 4 muestras de plasma de pacientes. Por ejemplo, PEG2, PEG6 o PEG2+6 PEGilados mostraron una actividad residual mayor que BDD en el plasma de un paciente pero no en otro plasma. El PEG2+6 diPEGilado parece ser más resistente que PEG2 o PEG6 monoPEGilado. Estos resultados sugieren que las muteínas de PEG PEGilado pueden ser más eficaces en el tratamiento de los pacientes que desarrollan inhibidores frente al FVIII.

DETECCIÓN SELECTIVA DE LA PEGILACIÓN DE ALTO RENDIMIENTO. La eficiencia de la PEGilación de una muteína de PEG concreta es impredecible, especialmente porque no hay información estructural directa de BDD. Por ejemplo, en base al modelo de estructura de BDD, cabría predecir que la eficiencia de la PEGilación de PEG4 y PEG5 sería muy alta, similar a la de PEG2 y PEG15, ya que las tres posiciones están expuestas en la superficie y apuntan hacia fuera de acuerdo con la estructura. Por tanto, para usar PEG para buscar un nuevo mecanismo de aclaramiento mediante PEGilación sistemática será necesario un gran número de muteínas que se van a someter a detección selectiva.

Para una detección selectiva rápida de un gran número de muteínas de PEG se ha desarrollado un nuevo

procedimiento de rendimiento alto que puede analizar la eficiencia de la PEGilación y la actividad funcional de los productos PEGilados de muteínas transfectadas de forma transitoria. Tan poco como 5-10 ml de muteínas de PEG expresadas de forma transitoria con un valor cromogénico del FVII tan bajo como 0,1-0,2 UI/ml se concentran en aproximadamente 50 veces usando un dispositivo Amicon-centra Ultra MWCO 30K de forma que la concentración de FVII alcanza más de 1 nM, cerca del intervalo de afinidad de la interacción anticuerpo con FVIII. La muteína de PEG concentrada (aproximadamente 300 ul) se incubaba con aproximadamente 30 ul de la resina de anticuerpo frente a FVIII C7F7 durante la noche a 4°C, se lavó, se eluyó, se dializó y se redujo. El reductor se elimina y las muteínas de PEG reducidas se PEGilan y se someten a un análisis de tipo Western como se ha descrito anteriormente. La eficiencia relativa de la PEGilación de las muteínas de PEG expresadas de forma transitoria coincide exactamente con la de las muteínas de PEG purificadas.

Mediante este procedimiento se pueden someter a detección selectiva docenas de muteínas de PEG en uno o dos meses. Por ejemplo, PEG14 (K1804C BDD) tenía al menos aproximadamente un 80% de PEGilación de la cadena ligera con un PEG de 12 kDa y ausencia de PEGilación de la cadena pesada (datos no mostrados), consistente con la mutación K1804C localizada en la cadena ligera. La distancia de C.cuadratura. a C.cuadratura entre K1804 and K1808 (posición PEG6) es de solo 8,4 Angstrom en base a la estructura de BDD, lo que sugiere que la introducción de un PEG de 43 kDa en esta posición tendrá una mejora en la PK similar a la de PEG6 PEGilado de 33 kDa, con la ventaja de un rendimiento de PEGilación mucho más alto. La PEGilación fue muy selectiva para la cadena de FVIII concreta en la que se introdujo la mutación de cisteína, en cuanto a que cada muteína con la cisteína en la cadena pesada solo se PEGila en la cadena pesada, mientras que cada muteína con la cisteína en la cadena ligera se PEGila en la cadena ligera. Los números 2 a 31 de muteína representan mutaciones de cisteína de BDD sustituyendo al aminoácido nativo en la posición indicada con una cisteína. PEG2+6 es una doble muteína de BDD en la que las posiciones 491 y 1808 estaban sustituidas por cisteínas. A1 y A2, (y el dominio B para KG-2, el FVIII de longitud completa) pertenecen a la cadena pesada, mientras que A3, C1 y C2 pertenecen a la cadena ligera. La eficiencia de la PEGilación se estimó a partir del paso de los productos PEGilados en un SDS-PAGE comparando las intensidades de la banda PEGilada con la banda sin PEGilar: +++ aproximadamente >80% rendimiento de la PEGilación, ++ rendimiento de aproximadamente 30-70%, + rendimiento de aproximadamente 10-30% y rendimiento aproximadamente <10%.

ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE MUTEÍNAS DE PEG REDUCIDAS. Para determinar la identidad del "capuchón" que impide la PEGilación directa de las muteínas de PEG o del FVIII de longitud completa, PEG2+14 se redujo con TCEP a concentraciones que varían de 67 uM a 670 uM. El rendimiento de la PEGilación aumentó en proporción a las cantidades crecientes de TCEP. Las mismas muestras también se analizaron mediante espectrometría de masas antes de la PEGilación. Con el fin de tener un dominio proteico que pudiera estudiarse directamente, las muestras se digirieron con trombina a una proporción de 20 unidades/mg de FVIII durante 30 minutos a 37°C. La escisión de la trombina produce un fragmento A2 que incluye los residuos 372 a 740 y sitios de glicosilación no ocupados. La muestra digerida se inyectó en un sistema de cromatografía de líquidos de fase inversa C4 y el eluyente de la columna se introdujo directamente en el espectrómetro de masas cuadrupolo - tiempo de vuelo mediante una interfaz de electropulverización. El espectro de masas procedente de debajo del pico cromatográfico correspondiente al dominio A2 se somete a deconvolución para proporcionar un valor de masa intacta de la proteína. Antes de la reducción, el dominio A2 de PEG2+14 proporciona una masa que es 118 Dalton mayor que lo predicho en teoría. A medida que la concentración de TCEP aumenta aparece un pico nuevo que tiene la masa predicha precisa del dominio A2. La proporción de este pico nuevo aumenta a medida que aumenta la concentración de TCEP. La diferencia de 118 Dalton se puede justificar mediante la cisteinilación en el residuo Cys 491 mediante formulación de disulfuros con una cisteína (119 Da) y la precisión del instrumento. Por tanto, esto muestra que las muteínas de PEG tienen un capuchón de cisteína, que impide la PEGilación directa.

45 Ejemplo 9

Protocolo para cuantificar el número de ligandos unidos a cada molécula de factor de coagulación. Cuantificación del contenido de ácido siálico usando el kit de marcaje TAKARA DMB

El kit de marcaje de fluorescencia con ácido siálico (nº cat. 4400) sirve para el análisis cuantitativo y altamente sensible de sialoglicoconjugados. Esta técnica de marcaje de fluorescencia con ácido siálico basada en HPLC usando 1,2-diamino-4,5-metilenoxibenceno (DMB) es un procedimiento cuantitativo simple y altamente sensible. En este procedimiento, los ácidos siálicos libres se analizan mediante HPLC de fase inversa (GlycosepR, de Glyko, nº 1-4727) después de marcar con DMB.

Procedimiento experimental:

1. Marcaje con DMB:

Pipetear 5 muestras de ~50 µg en un tubo Eppendorf, secar con centrifugación, después añadir 500ul de ácido acético al tubo, bloquear con calor a 80°C durante 2 horas. Una vez finalizada la reacción, usar centrifugación para secar la muestra tratada con ácido.

Fabricar los reactivos DMB; cada tubo de reacción necesita 200 ul de DMB

1 parte del reactivo B	80 ul
5 partes del reactivo A	400 ul
4 partes de agua	320 ul

Las reacciones se montan del siguiente modo:

Muestra		Ácido acético	Reactivo DMB
Blanco		10ul	190ul
Patrón (100 uM)	10ul	10ul	190ul
		10ul	180ul

(Nota: Fabricar ácido acético 2M: 114 ul en agua para HPLC hasta un volumen final de 1 ml)
 Mezclar bien y bloquear con calor a 50°C durante 1,5 horas

Detener la reacción añadiendo un volumen igual de agua helada para HPLC (es decir, 200 ul de H₂O), terminar la reacción colocando el tubo Eppendorf en hielo. Realizar la HPLC el mismo día.

5 2. Análisis por HPLC: isocrático

Columna: GlycoSepR de Glyko, nº Cat.1-4727
 Disolvente: Acetonitrilo/metanol/agua =9/7/84
 Caudal: 1 ml/minuto
 Detección: FLD: Ex 310 nm, Em 448 nm

10 El pico del ácido siálico marcado con DMB normalmente aparece a los 6~7 minutos. Para cuantificar el ácido siálico, el área del pico de la muestra se comparó con el área del pico del ácido siálico patrón.

Los encabezados de sección usados en el presente documento son únicamente con motivos organizativos.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Bayer HealthCare LLC

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA INTRODUCIR TOLERANCIA INMUNITARIA A LAS PROTEÍNAS FACTORES DE COAGULACIÓN

20 <130> BAY-006PCT1

<150> 61/816.790

<151> 28-04-2013

25 <160> 43

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1

<211> 2351

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 1

ES 2 691 041 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp
770 775 780

Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
785 790 795 800

Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
805 810 815

Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
820 825 830

Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
835 840 845

Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
850 855 860

Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
865 870 875 880

Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
885 890 895

Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
900 905 910

Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met

ES 2 691 041 T3

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

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

Ile	Pro	Gln	Ala	Asn	Arg	Ser	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Lys	Val	Ser
1400						1405					1410			
Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Arg	Pro	Ile	Tyr	Leu	Thr	Arg	Val	Leu	Phe
1415						1420					1425			
Gln	Asp	Asn	Ser	Ser	His	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys
1430						1435					1440			
Asp	Ser	Gly	Val	Gln	Glu	Ser	Ser	His	Phe	Leu	Gln	Gly	Ala	Lys
1445						1450					1455			
Lys	Asn	Asn	Leu	Ser	Leu	Ala	Ile	Leu	Thr	Leu	Glu	Met	Thr	Gly
1460						1465					1470			
Asp	Gln	Arg	Glu	Val	Gly	Ser	Leu	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser
1475						1480					1485			
Val	Thr	Tyr	Lys	Lys	Val	Glu	Asn	Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Asp
1490						1495					1500			
Leu	Pro	Lys	Thr	Ser	Gly	Lys	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Val	His
1505						1510					1515			
Ile	Tyr	Gln	Lys	Asp	Leu	Phe	Pro	Thr	Glu	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser
1520						1525					1530			
Pro	Gly	His	Leu	Asp	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Leu	Leu	Gln	Gly	Thr
1535						1540					1545			
Glu	Gly	Ala	Ile	Lys	Trp	Asn	Glu	Ala	Asn	Arg	Pro	Gly	Lys	Val
1550						1555					1560			
Pro	Phe	Leu	Arg	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Pro	Ser
1565						1570					1575			
Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	His	Tyr	Gly	Thr	Gln
1580						1585					1590			
Ile	Pro	Lys	Glu	Glu	Trp	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Lys
1595						1600					1605			
Thr	Ala	Phe	Lys	Lys	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys
1610						1615					1620			
Glu	Ser	Asn	His	Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys
1625						1630					1635			

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

ES 2 691 041 T3

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

Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser
2105						2110					2115			
Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr
2120						2125					2130			
Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu	Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn
2135						2140					2145			
Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn	Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile
2150						2155					2160			
Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg
2165						2170					2175			
Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly	Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys
2180						2185					2190			
Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln
2195						2200					2205			
Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn	Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser
2210						2215					2220			
Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp
2225						2230					2235			
Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe
2240						2245					2250			
Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys
2255						2260					2265			
Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser
2270						2275					2280			
Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys
2285						2290					2295			
Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val
2300						2305					2310			
Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His
2315						2320					2325			
Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu
2330						2335					2340			

Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
2345 2350

5
<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
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	Val	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 210	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser 215	Leu	Met	Gln	Asp	Arg 220	Asp	Ala	Ala	Ser
Ala 225	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys 230	Met	His	Thr	Val	Asn 235	Gly	Tyr	Val	Asn	Arg 240
Ser	Leu	Pro	Gly	Leu 245	Ile	Gly	Cys	His	Arg 250	Lys	Ser	Val	Tyr	Trp 255	His
Val	Ile	Gly	Met 260	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu 265	Val	His	Ser	Ile	Phe 270	Leu	Glu
Gly	His	Thr 275	Phe	Leu	Val	Arg	Asn 280	His	Arg	Gln	Ala	Ser 285	Leu	Glu	Ile
Ser 290	Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr 295	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu 300	Met	Asp	Leu	Gly
Gln 305	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys 310	His	Ile	Ser	Ser	His 315	Gln	His	Asp	Gly	Met 320
Glu	Ala	Tyr	Val	Lys 325	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu 330	Glu	Pro	Gln	Leu 335	Arg
Met	Lys	Asn	Asn 340	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp 345	Tyr	Asp	Asp	Asp	Leu 350	Thr	Asp
Ser	Glu	Met 355	Asp	Val	Val	Arg	Phe 360	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser 365	Pro	Ser	Phe
Ile 370	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala 375	Lys	Lys	His	Pro	Lys 380	Thr	Trp	Val	His
Tyr 385	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu 390	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr 395	Ala	Pro	Leu	Val	Leu 400
Ala	Pro	Asp	Asp	Arg 405	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln 410	Tyr	Leu	Asn	Asn	Gly 415	Pro
Gln	Arg	Ile	Gly 420	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys 425	Val	Arg	Phe	Met	Ala 430	Tyr	Thr
Asp	Glu	Thr 435	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu 440	Ala	Ile	Gln	His	Glu 445	Ser	Gly	Ile
Leu	Gly 450	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly 455	Glu	Val	Gly	Asp	Thr 460	Leu	Leu	Ile	Ile

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

ES 2 691 041 T3

705					710						715					720
Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Asn	Ala	
				725					730					735		
Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro	Ser	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			
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	

ES 2 691 041 T3

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 Al
 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
 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	Glu	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			
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			
Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys	Pro	Glu	Ile	Glu
1610						1615					1620			
Val	Thr	Trp	Ala	Lys	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Arg	Leu	Cys	Ser	Gln
1625						1630					1635			
Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr
1640						1645					1650			
Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile
1655						1660					1665			
Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp

1670		1675		1680
Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr				
1685		1690		1695
Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser				
1700		1705		1710
Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro				
1715		1720		1725
Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe				
1730		1735		1740
Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu				
1745		1750		1755
Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val				
1760		1765		1770
Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser				
1775		1780		1785
Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg				
1790		1795		1800
Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys				
1805		1810		1815
Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys				
1820		1825		1830
Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His				
1835		1840		1845
Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu				
1850		1855		1860
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			
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 2150	Leu His Pro Thr His 2155	Tyr Ser Ile Arg Ser 2160	Thr Leu Arg
Met Glu 2165	Leu Met Gly Cys Asp 2170	Leu Asn Ser Cys Ser 2175	Met Pro Leu
Gly Met 2180	Glu Ser Lys Ala Ile 2185	Ser Asp Ala Gln Ile 2190	Thr Ala Ser
Ser Tyr 2195	Phe Thr Asn Met Phe 2200	Ala Thr Trp Ser Pro 2205	Ser Lys Ala
Arg Leu 2210	His Leu Gln Gly Arg 2215	Ser Asn Ala Trp Arg 2220	Pro Gln Val
Asn Asn 2225	Pro Lys Glu Trp Leu 2230	Gln Val Asp Phe Gln 2235	Lys Thr Met
Lys Val 2240	Thr Gly Val Thr Thr 2245	Gln Gly Val Lys Ser 2250	Leu Leu Thr
Ser Met 2255	Tyr Val Lys Glu Phe 2260	Leu Ile Ser Ser Ser 2265	Gln Asp Gly
His Gln 2270	Trp Thr Leu Phe Phe 2275	Gln Asn Gly Lys Val 2280	Lys Val Phe
Gln Gly 2285	Asn Gln Asp Ser Phe 2290	Thr Pro Val Val Asn 2295	Ser Leu Asp
Pro Pro 2300	Leu Leu Thr Arg Tyr 2305	Leu Arg Ile His Pro 2310	Gln Ser Trp
Val His 2315	Gln Ile Ala Leu Arg 2320	Met Glu Val Leu Gly 2325	Cys Glu Ala
Gln Asp 2330	Leu Tyr		

<210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido

<400> 3

Ser Phe Ser Gln
1

5 <210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido
<400> 4

Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg
1 5 10

15 <210> 5
<211> 1457
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Dominio B eliminado de FVIII recombinante
<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 691 041 T3

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430
 Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp

645								650					655				
Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe		
			660				665						670				
Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr		
			675				680						685				
Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro		
			690				695						700				
Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly		
			705				710						715	720			
Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp		
			725				730						735				
Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys		
			740				745						750				
Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Leu		
			755				760						765				
Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln		
			770				775						780				
Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu		
			785				790						795	800			
Asp	Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe		
			805				810						815				
Gln	Lys	Lys	Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp		
			820				825						830				
Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln		
			835				840						845				
Ser	Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr		
			850				855						860				
Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu	His		
			865				870						875	880			
Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp	Asn	Ile		
			885				890						895				

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

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

Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu
1385 1390 1395

Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
1400 1405 1410

Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr
1415 1420 1425

Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
1430 1435 1440

Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
1445 1450 1455

<210> 6
<211> 1438
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio B eliminado de FVIII recombinante
<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
 210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
 225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270

Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
 275 280 285

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
 290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
 305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
 325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
 340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
 355 360 365

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

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
 385 390 395 400
 Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
 405 410 415
 Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
 420 425 430
 Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445
 Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460
 Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480
 Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495
 His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510
 Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525
 Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540
 Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560
 Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575
 Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590
 Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605
 Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620
 Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu

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

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

ES 2 691 041 T3

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

Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn
1370 1375 1380

Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro
1385 1390 1395

Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg
1400 1405 1410

Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu
1415 1420 1425

Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
1430 1435

<210> 7
<211> 625
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Met Ile Phe Leu Tyr Gln Val Val His Phe Ile Leu Phe Thr Ser Val
1 5 10 15

Ser Gly Glu Cys Val Thr Gln Leu Leu Lys Asp Thr Cys Phe Glu Gly
20 25 30

Gly Asp Ile Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser Ala Lys Tyr Cys Gln Val
35 40 45

Val Cys Thr Tyr His Pro Arg Cys Leu Leu Phe Thr Phe Thr Ala Glu
50 55 60

Ser Pro Ser Glu Asp Pro Thr Arg Trp Phe Thr Cys Val Leu Lys Asp
65 70 75 80

Ser Val Thr Glu Thr Leu Pro Arg Val Asn Arg Thr Ala Ala Ile Ser
85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Lys Gln Cys Ser His Gln Ile Ser Ala Cys Asn Lys
100 105 110

Asp Ile Tyr Val Asp Leu Asp Met Lys Gly Ile Asn Tyr Asn Ser Ser
115 120 125

Val Ala Lys Ser Ala Gln Glu Cys Gln Glu Arg Cys Thr Asp Asp Val
130 135 140

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

ES 2 691 041 T3

385		390		395		400									
Trp	Gln	Val	Thr	Leu	His	Thr	Thr	Ser	Pro	Thr	Gln	Arg	His	Leu	Cys
				405				410						415	
Gly	Gly	Ser	Ile	Ile	Gly	Asn	Gln	Trp	Ile	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys
			420					425					430		
Phe	Tyr	Gly	Val	Glu	Ser	Pro	Lys	Ile	Leu	Arg	Val	Tyr	Ser	Gly	Ile
		435					440					445			
Leu	Asn	Gln	Ser	Glu	Ile	Lys	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Phe	Gly	Val	Gln
	450					455					460				
Glu	Ile	Ile	Ile	His	Asp	Gln	Tyr	Lys	Met	Ala	Glu	Ser	Gly	Tyr	Asp
465					470					475					480
Ile	Ala	Leu	Leu	Lys	Leu	Glu	Thr	Thr	Val	Asn	Tyr	Thr	Asp	Ser	Gln
				485					490					495	
Arg	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Ser	Lys	Gly	Asp	Arg	Asn	Val	Ile	Tyr	Thr
			500					505					510		
Asp	Cys	Trp	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Tyr	Arg	Lys	Leu	Arg	Asp	Lys	Ile
		515					520					525			
Gln	Asn	Thr	Leu	Gln	Lys	Ala	Lys	Ile	Pro	Leu	Val	Thr	Asn	Glu	Glu
	530					535					540				
Cys	Gln	Lys	Arg	Tyr	Arg	Gly	His	Lys	Ile	Thr	His	Lys	Met	Ile	Cys
545					550					555					560
Ala	Gly	Tyr	Arg	Glu	Gly	Gly	Lys	Asp	Ala	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly
				565					570					575	
Gly	Pro	Leu	Ser	Cys	Lys	His	Asn	Glu	Val	Trp	His	Leu	Val	Gly	Ile
			580					585					590		
Thr	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	Ala	Gln	Arg	Glu	Arg	Pro	Gly	Val	Tyr
		595					600					605			
Thr	Asn	Val	Val	Glu	Tyr	Val	Asp	Trp	Ile	Leu	Glu	Lys	Thr	Gln	Ala
	610					615					620				
Val															
625															

ES 2 691 041 T3

<210> 8
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

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

Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr
 225 230 235 240

Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His
 245 250 255

Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu
 260 265 270

Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys
 275 280 285

Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly
 290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es ácido 4-carboxiglutámico

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa es ácido 4-carboxiglutámico

<220>

<221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa es ácido 4-carboxiglutámico

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> Xaa es ácido 4-carboxiglutámico

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> Xaa es ácido 4-carboxiglutámico

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa es ácido 4-carboxiglutámico

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa es ácido 4-carboxiglutámico

25

<400> 9

Ala Asn Ala Phe Leu Gly Xaa Leu Arg Pro Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15

Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Lys
 20 25 30

Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35 40 45

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50 55 60

Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65 70 75 80

Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85 90 95

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100 105 110

Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115 120 125

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130 135 140

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

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 10
<211> 488
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

```

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

Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn
 20           25           30

Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met
 35           40           45

Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr
 50           55           60

Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe
 65           70           75           80

Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln
 85           90           95

Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys
 100          105          110

Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu
 115          120          125

Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln
 130          135          140

Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn
 145          150          155          160

Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr
 165          170          175

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

Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu
 195          200          205

```

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

ES 2 691 041 T3

450

455

460

Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu
465 470 475 480

Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
485

5 <210> 11
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 11
gcagcacata tgggacagtt catagtata ggg 33

15 <210> 12
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 12
gcagacctcg aggtagaagg gatcttctac ttct 34

25 <210> 13
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 13
gatgtccgtc cttgtgctc aaggagatta cca 33

35 <210> 14
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador

<400> 14
ttgtattcaa ggagatgcc aaagggtgta aaac 34

45 <210> 15
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador

55 <400> 15

	ttacaaaag gtgtatgcca ttgaaggat ttc	34
5	<210> 16 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 16 aaggatttc caattgccc aggagaaata ttc	33
15	<210> 17 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador	
	<400> 17 gattatattt aagaattgcg caagcagacc atat	34
25	<210> 18 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador	
35	<400> 18 tagaaaaaac ttgtctgcc ctaatgaaac caaaac	36
40	<210> 19 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador	
	<400> 19 aactttgtca agccttgcca aaccaaaact tac	33
50	<210> 20 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Secuencia artificial	
	<400> 20 gtcaagccta atgaatgcaa aacttacttt tgga	34
60	<210> 21 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	

<400> 21
 caagcctaata gaaacctgca ctacttttg gaaag 35
 <210> 22
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 22
 ctaatgaaac caaaacttgc tttggaaag tgcaac 36
 <210> 23
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 23
 atttcttatg aggaatgccg gaggaagga gca 33
 <210> 24
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 24
 ttttatgagg aagattgcag gcaaggagca gaa 33
 <210> 25
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 25
 caaggagcag aacctgcaa aaactttgtc aagcct 36
 <210> 26
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 26
 ggagcagaac ctatgtcaa cttgtcaag cct 33
 <210> 27
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador
 <400> 27
 cgctcagttg ccaagtgta tctaaaact tgg 33
 5
 <210> 28
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 28
 tcagttgcc aagaagtgtcc taaaacttgg gta 33
 15
 <210> 29
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 29
 ctctcatct gctactgca atctgtgat caa 33
 25
 <210> 30
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 30
 caaaatcttt tccattctgc acctcagtcg tgtac 35
 35
 <210> 31
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 31
 gtcaatggtt atgtatgcag gtctctgcc ggt 33
 45
 <210> 32
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 32
 cagactatc gaggatgttc cactggaacc tta 33
 55
 <210> 33
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60

<220>
 <223> Cebador

 <400> 33
 5 atccaggctg aggttgtga tacagtggc att 33

 <210> 34
 <211> 33
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 15 <400> 34
 gaagatgata aagctgttc tgggtgaagc cat 33

 <210> 35
 <211> 33
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 25
 <400> 35
 cagcggattg gtaggtgta caaaaaagtc cga 33

 <210> 36
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 35
 <400> 36
 gaagatgggc caactgctc agatcctcgg tgc 33

 40 <210> 37
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Cebador

 <400> 37
 50 cagataatgt cagactgcag gaatgtcatc ctg 33

 <210> 38
 <211> 33
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 38
 60 cacactaaca cactgtgtcc tgctcatggg aga 33

 <210> 39
 <211> 33
 <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 39	
	cagatggaag atccctgctt taaagagaat tat	33
10	<210> 40	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 40	
	accaggggtg cccgttgcaa gttctccagc etc	33
20	<210> 41	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 41	
	aaagtaaagg tttttgagg aaatcaagac tcc	33
30	<210> 42	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 42	
40	ttgcagttgt cagttgcttt gcatgaggto gca	33
	<210> 43	
	<211> 33	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 43	
	aatatggaaa gaaacgctag ggctccctgc aat	33

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado para inducir tolerancia de la proteína factor de coagulación, en el que el conjugado comprende una proteína factor de coagulación o un fragmento antigénico o variante del mismo y un ligando Siglec de linfocitos B, en el que el ligando Siglec es un glicano seleccionado del grupo que consiste en 9-N-bifenilcarboxil-NeuAca2-6Gal~1-4GlcNAc (6'-BPCNeuAc), NeuAca2-6Gal~1-4GlcNAc y NeuAca2-6Gal~1-4(6-sulfo)GlcNAc y combinaciones de los mismos.
2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que la proteína factor de coagulación está conjugada directamente a un ligando Siglec, o en el que la proteína factor de coagulación está conjugada indirectamente en un ligando Siglec.
3. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el conjugado comprende un liposoma.
4. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la distancia que separa la proteína factor de coagulación y el ligando Siglec del conjugado permite la presentación eficiente a un linfocito B que tiene como resultado la unión obligada y la yuxtaposición del receptor de Siglec y de linfocitos B en una sinapsis inmunológica.
5. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la proteína factor de coagulación se selecciona del grupo que consiste en Factor VII, Factor VIII, Factor X y Factor XI y combinaciones de los mismos.
6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Una cantidad eficaz de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento de un trastorno hemorrágico.
8. La cantidad efectiva de un conjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho uso comprende la inducción de tolerancia en una proteína factor de coagulación.
9. La cantidad efectiva de un conjugado para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en la que dicho uso se produce en presencia de anticuerpos contra la proteína factor de coagulación.
10. Un kit que comprende el conjugado de las reivindicaciones 1-5.
11. El conjugado de la reivindicación 1, en el que la proteína factor de coagulación es FVIII y un polímero biocompatible está unido covalentemente a una o más de las posiciones de aminoácidos del FVIII 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 y 2284.
12. El conjugado de la reivindicación 1, en el que la proteína factor de coagulación es FVIII y un polímero biocompatible está unido covalentemente a una o más de las posiciones de aminoácidos del FVIII 377, 378, 468, 491, 504, 556, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911 and 2284.
13. El conjugado de la reivindicación 1, en el que la proteína factor de coagulación es FVIII y un polímero biocompatible está unido covalentemente a una o más de las posiciones de aminoácidos del FVIII 377, 378, 468, 491, 504, 556 y 711.
14. El conjugado de la reivindicación 1, en el que la proteína factor de coagulación es FVIII y un polímero biocompatible está unido covalentemente a una o más de las posiciones de aminoácidos del FVIII 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 y 2284.
15. El conjugado de cualquiera de la reivindicación 1, en el que la proteína factor de coagulación es factor VIII con delección del dominio B, en el que preferentemente un polímero biocompatible está unido covalentemente al FVIII con delección del dominio B en las posiciones de aminoácidos del FVIII 129, 491, 1804 y/o 1808.
16. El conjugado de la reivindicación 1, en el que la proteína factor de coagulación es el FVIII de longitud completa o el FVIII con delección del dominio B y un polímero biocompatible está unido a la posición de aminoácido del FVIII 1804 y comprende polietilenglicol.
17. Una cantidad eficaz de un conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o 13-19 y una cantidad eficaz de un factor de coagulación para su uso en el tratamiento de un trastorno hemorrágico.
18. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en el que la posición del aminoácido está mutada a cisteína.

Figura 1

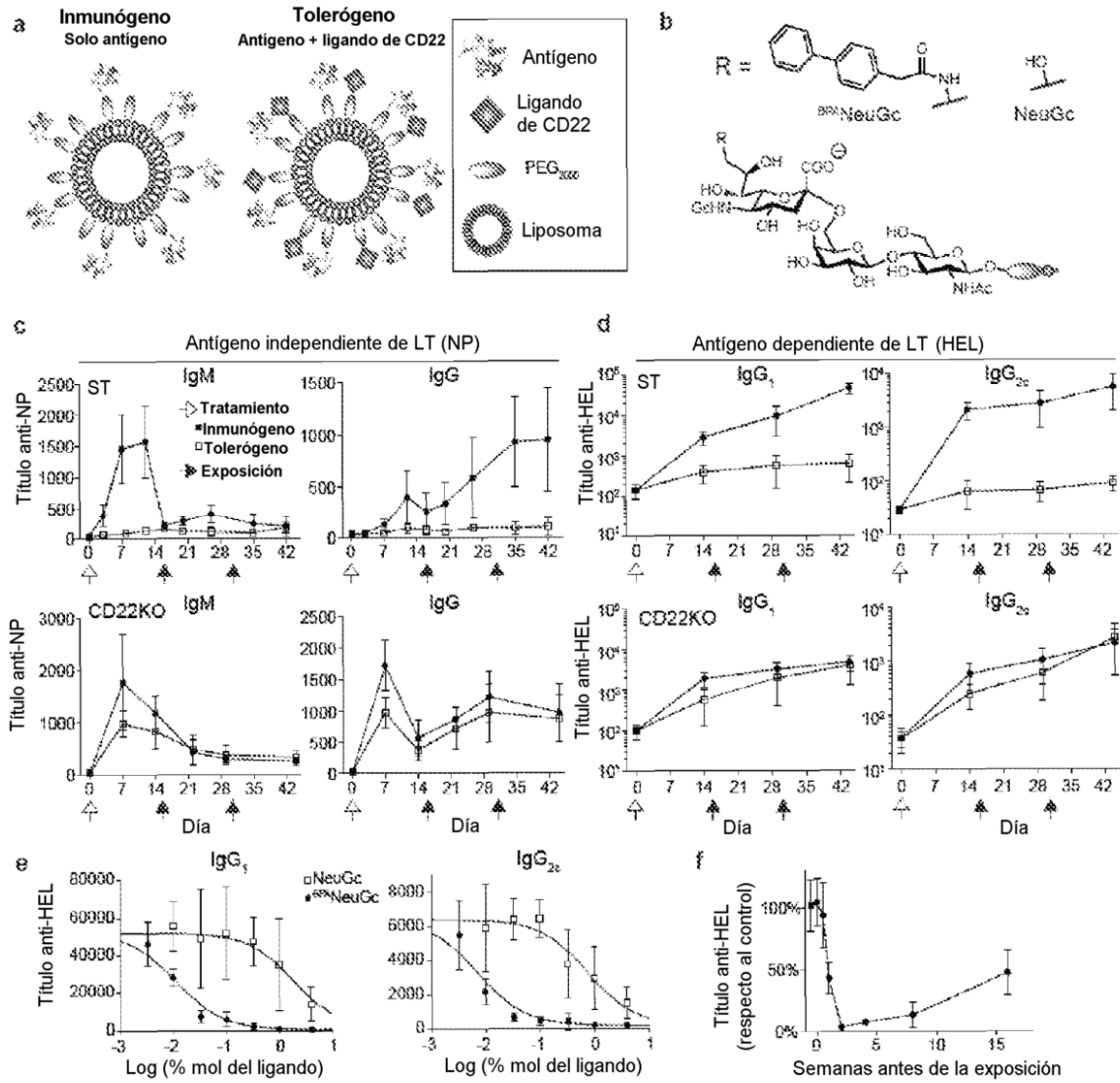


Figura 2

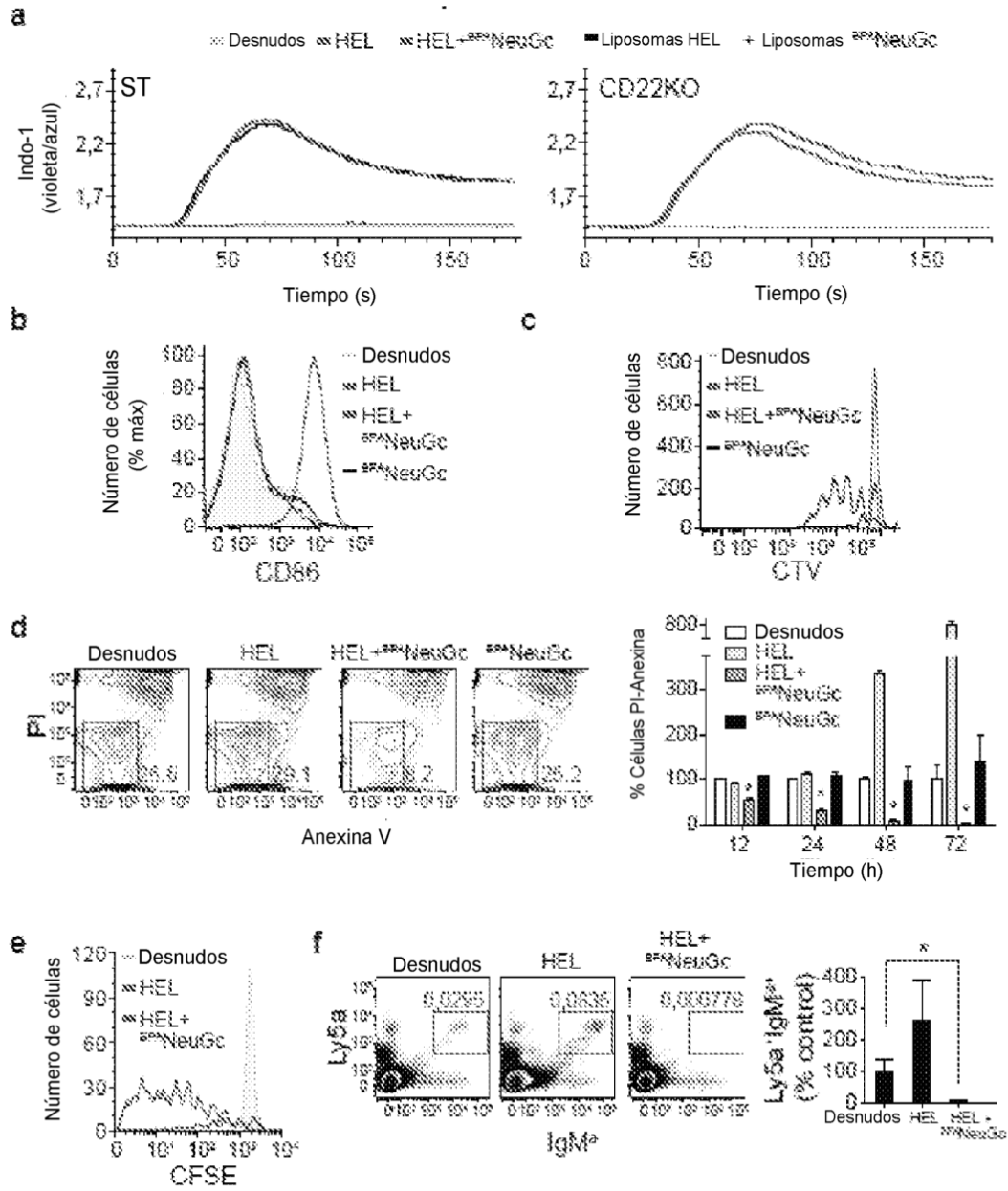


Figura 3

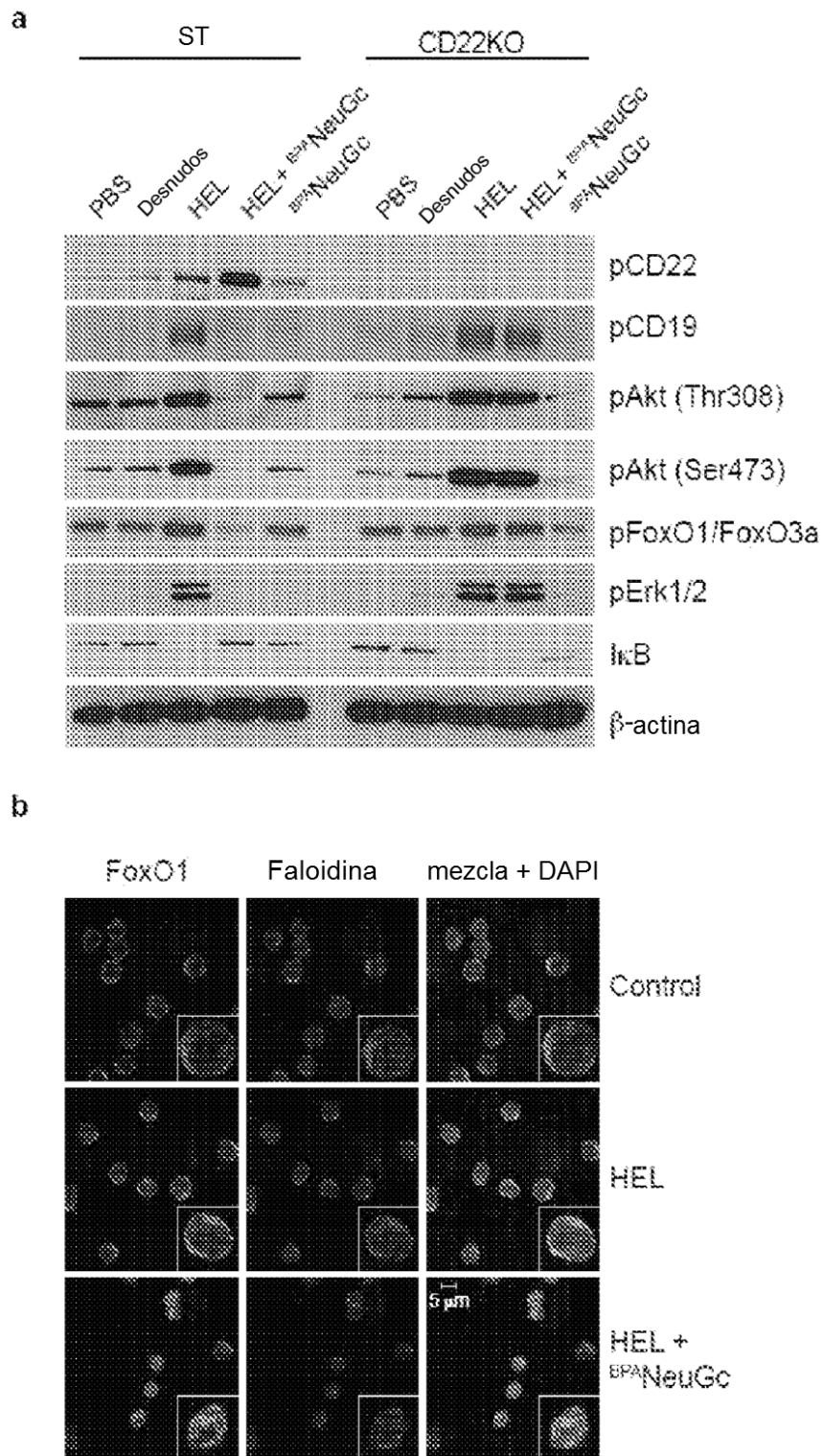


Figura 4

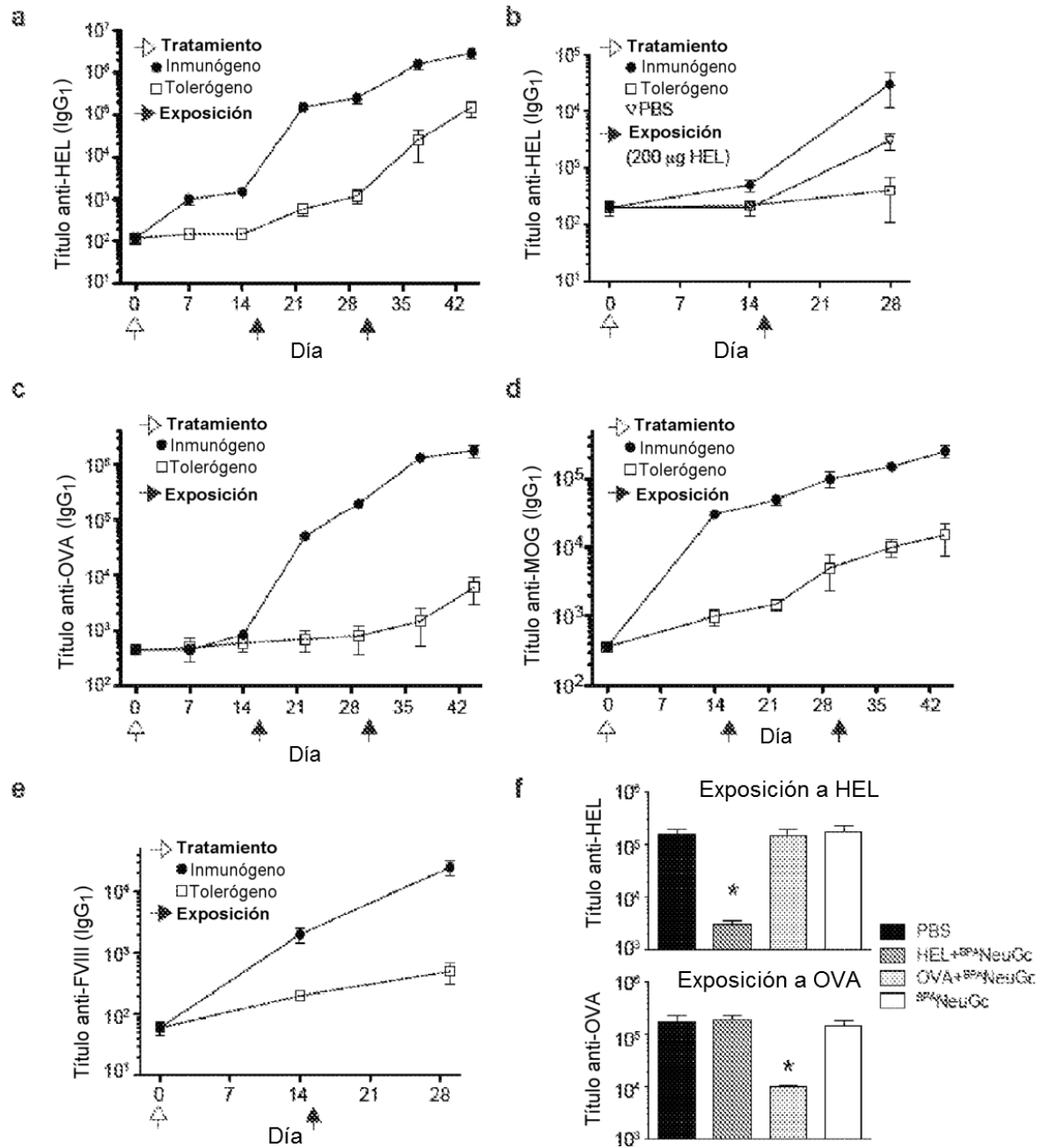


Figura 5

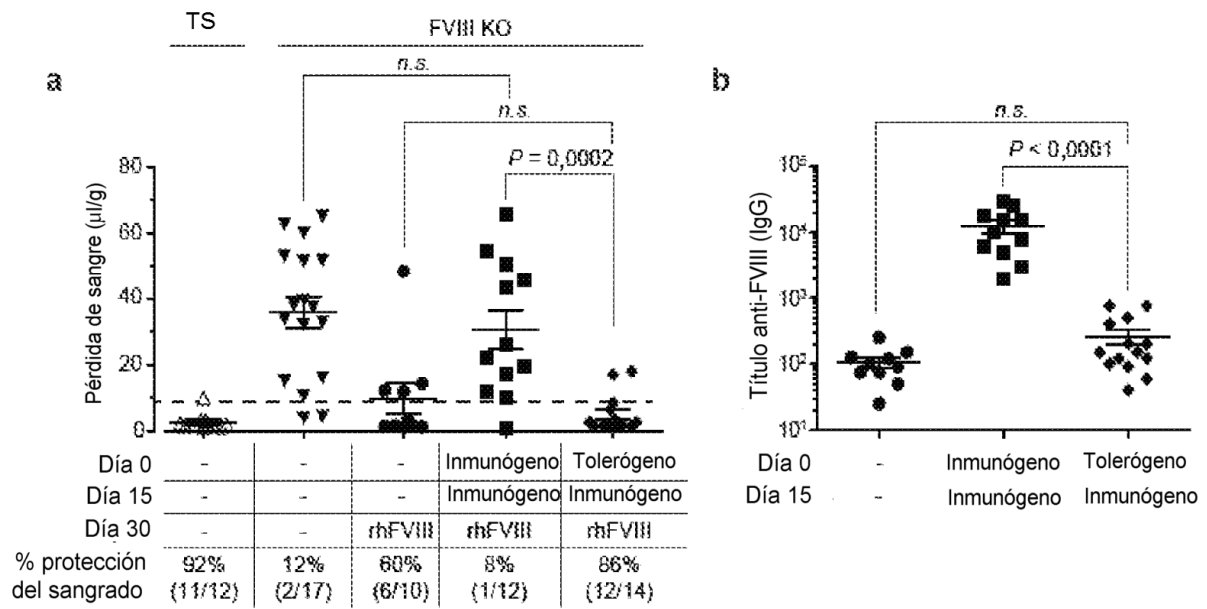


Figura 6

