

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 575**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/755** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2011 PCT/EP2011/065913**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2012 WO12035050**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2011 E 11769805 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2616486**

54 Título: **Variantes del factor VIII que tienen una absorción celular disminuida**

30 Prioridad:

**14.07.2011 US 201161507666 P**

**13.07.2011 EP 11173768**

**21.09.2010 US 384731 P**

**15.09.2010 EP 10176731**

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

**13.05.2019**

73 Titular/es:

**STICHTING SANQUIN BLOEDVOORZIENING**

**(100.0%)**

**Plesmanlaan 125**

**1066 CX Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**MEEMS, HENRIËT;**

**MEIJER, ALEXANDER BENJAMIN;**

**MERTENS, KOENRAAD;**

**OLSEN, OLE HVILSTED;**

**LAMBERTH, KASPER;**

**NOERBY, PEDER LISBY;**

**JOHNSEN, LAUST BRUUN;**

**KJALKE, MARIANNE;**

**STENNICKE, HENNING RALF;**

**VOORBERG, JOHANNES JACOBUS y**

**VAN DEN BIGGELAAR, MAARTJE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 712 575 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

Variantes del factor VIII que tienen una absorción celular disminuida

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a factores de coagulación modificados. La presente invención se refiere más específicamente a factores de coagulación modificados que tienen una absorción celular disminuida que da como resultado una tasa de eliminación/absorción celular disminuida y/o inmunogenicidad reducida. La invención se refiere además al uso de tales moléculas, así como a métodos para producir dichas moléculas.

Antecedentes de la invención

10 La hemofilia A es un trastorno hemorrágico hereditario provocado por una deficiencia o disfunción de la actividad del factor VIII de coagulación (FVIII). La manifestación clínica no se encuentra en la hemostasia primaria, ya que la formación del coágulo de sangre inicial ocurre normalmente. Más bien, el coágulo es inestable debido a la falta de formación de trombina secundaria y la estabilización de la fibrina del coágulo primario. La enfermedad se trata con una inyección intravenosa de FVIII que se aísla de la sangre o se produce de forma recombinante. El desarrollo de anticuerpos neutralizantes (inhibidores) contra FVIII ocurre en aproximadamente el 20-40% de los pacientes con hemofilia A grave después de la administración de FVIII, lo que hace que el tratamiento adicional con FVIII sea inefectivo. La inducción de inhibidores por lo tanto proporciona una complicación importante en el cuidado de la hemofilia.

20 Las recomendaciones de tratamiento actuales están pasando del tratamiento tradicional a pedido a la profilaxis. La vida media circulatoria del FVIII endógeno unido al factor de Von Willebrand (vWF) es de 12 a 14 horas y, por lo tanto, el tratamiento profiláctico se realiza varias veces a la semana para obtener una vida virtualmente sin síntomas para los pacientes. La administración intravenosa para muchos, especialmente los niños y los jóvenes, se asocia con un gran inconveniente y/o dolor.

25 Se han empleado varios métodos en el desarrollo de una variante de FVIII con vida media circulatoria significativamente prolongada. Varios de estos métodos se relacionan con la conjugación de FVIII con polímeros hidrófilos como, por ejemplo, PEG (polietilenglicol). El documento WO03031464 divulga un enfoque enzimático en el que los grupos PEG pueden unirse a los glucanos presentes en el polipéptido.

30 También se ha sugerido modular la eliminación de FVIII mediada por el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP) para obtener una variante de FVIII con una tasa reducida de eliminación/absorción celular y, por lo tanto, un aumento de la vida media circulatoria in vivo, pero este enfoque ha sido obstaculizado por redundancia masiva evidente de posibles sitios de unión de LRP presentes en la superficie del FVIII y la incertidumbre sobre la función de estos. Además, algunos de estos sitios se encuentran cerca de regiones críticas para la actividad de FVIII: C, y una menor unión de LRP puede ir acompañada de una pérdida sustancial de actividad que hace que la variante de FVIII sea menos atractiva como agente terapéutico. Se piensa que la interacción de la LRP y los receptores relacionados con sus ligandos involucra residuos de lisina en la superficie del acoplamiento del ligando en un "collar" ácido en el receptor (Mol Cell 2006; 22: 277-283). Además, se ha sugerido que los residuos hidrófobos, en combinación con los residuos de lisina, pueden participar en la interacción con los miembros de la familia LRP (FEBS J 2006; 273: 5143-5159, J Mol Biol 2006; 362: 700-716) y podría por lo tanto, especularse si la modificación de estos residuos hidrófobos, además de los residuos críticos de lisina u otros residuos cargados positivamente, podría resultar en una interacción disminuida con los miembros de la familia LRP y una eliminación potencialmente prolongado y/o disminuido.

40 Para ser de interés terapéutico, las variantes del FVIII deben conservar la función procoagulante del FVIII. Por lo tanto, se deduce que existe una necesidad en la técnica de variantes específicas de FVIII con actividad de FVIII mantenida y una vida media circulatoria in vivo significativamente prolongada y/o inmunogenicidad reducida.

Resumen de la invención

45 La presente invención se relaciona así con una variante de FVIII recombinante que tiene actividad de FVIII, en el que dicha variante comprende 2-10 sustituciones de residuos de aminoácidos cargados positivamente accesibles en la superficie en el pie C1 y/o el pie C2 de FVIII, en el que dichos residuos de aminoácidos cargados accesibles desde la superficie están sustituidos con alanina o glutamina, y en el que las sustituciones producen una disminución de la absorción celular de dicha variante de FVIII, en el que dicha variante de FVIII comprende una sustitución R2215 combinada con una sustitución K2092A.

50 Las variantes de FVIII de acuerdo con la presente invención tienen una absorción celular reducida asociada con una vida media circulatoria aumentada. Las variantes de FVIII de acuerdo con la invención pueden además tener la ventaja de tener una unión de LRP reducida. Las variantes de FVIII de acuerdo con la invención pueden además tener la ventaja de tener inmunogenicidad reducida en comparación con las moléculas de FVIII sin este tipo de mutaciones. La explicación de la inmunogenicidad reducida puede ser que los residuos cargados positivamente están sustituidos en los pies C1 y/o C2 de FVIII, lo que resulta en una menor absorción en las células responsables de presentar FVIII al sistema inmunológico.

## Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Modelo de superficie de la estructura cristalográfica de rayos X de FVIII (código de entrada pdb 3cdz) que se muestra en las orientaciones anterior y posterior. Se indican las posiciones de los dominios A1, A2, A3, C1 y C2. Los residuos de lisina y arginina están en negro.

- 5 Figura 2: Modelo de superficie de la estructura cristalográfica de rayos X de FVIII (código de entrada pdb 3cdz) que destaca los dominios C1 y C2 de FVIII. La parte inferior de los dominios C1 y C2 están en blanco, representan sus regiones de unión a la membrana putativas denotadas el pie C1 y el pie C2, respectivamente. Los residuos de lisina y arginina están en negro.

- 10 Figura 3: Figura 1. El intercambio de hidrógeno (HX) controlado por espectrometría de masas identifica las regiones de FVIII involucradas en (A) los espectros de masa/carga de unión 4F30 y KM33 correspondientes al fragmento de péptido 2078-2095,  $([M+H]^+ = 672.3818, z = 3)$ , identificado como parte del epítipo de la unión de 4F30 y KM33 a FVIII. (B) Espectros de masa/carga correspondientes al fragmento 2148-2161 peptídico,  $(m/z = 565.6554, z = 3)$ , identificados como parte del epítipo de la unión tanto de 4F30 como de KM33 a FVIII. Para todos los espectros, los paneles superiores muestran los controles no deuterados; en segundo lugar, el panel muestra el péptido después de 15 segundos de intercambio con  $D_2O$  en el ligando de ausencia, los paneles tercero y cuarto muestran el péptido después de 10 segundos de intercambio con  $D_2O$  en presencia de 4F30 y KM33, respectivamente.

- Figura 4: gráficos de tiempo de intercambio de hidrógeno de péptidos representativos de FVIII en presencia de 4F30 y KM33. La incorporación de deuterio ( $D_a$ ) de los péptidos del FVIII se representa en función del tiempo en una escala logarítmica en ausencia (cuadrado sólido) o la presencia de 4F30 (triángulo abierto) o KM33 (cuadrado abierto). Los péptidos que cubren los residuos aa 2062-2073 y 2163-2168 representan regiones de FVIII que no se ven afectadas por la formación de complejos con 4F30 y KM33. Los péptidos que cubren los residuos aa 2078-2095, y 2148-2161 representan regiones de FVIII que son parte del epítipo de unión de 4F30 y KM33.
- 20

- Figura 5: La secuencia de cobertura de HX analizó los péptidos de FVIII en presencia de KM33 y 4F30. La secuencia primaria (utilizando una numeración madura; panel horizontal A: aa 2062-2100 y panel horizontal B: aa 2139-2168) se muestra sobre los péptidos analizados HX (mostrados como barras horizontales). Los péptidos que muestran patrones de intercambio similares tanto en presencia como en ausencia de 4F30 y KM33 se muestran sin rellenos (barras abiertas), mientras que los péptidos que muestran una incorporación reducida de deuterio en ambos enlaces de 4F30 y KM33 se rellenan en negro (barras cerradas).
- 25

## Descripción de la invención

- 30 Definiciones:

- Moléculas del factor VIII: FVIII/El factor VIII es una glicoproteína grande y compleja que se produce principalmente por los hepatocitos. El FVIII humano consta de 2351 aminoácidos, incluido el péptido señal, y contiene varios dominios distintos, según lo define la homología. Hay tres dominios A, un dominio B único y dos dominios C. El orden del dominio se puede enumerar como  $NH_2$ -A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH. El FVIII circula en plasma como dos cadenas, separadas en el borde B-A3. Las cadenas están conectadas por enlaces de iones metálicos bivalentes. La cadena A1-A2-B se denomina cadena pesada (HC), mientras que la A3-C1-C2 se denomina cadena ligera (LC).
- 35

- “Pie C1” y “pie C2”: En el contexto de la presente invención, el “pie C1” se define como la región del dominio C1 que tiene la capacidad de anclar no covalentemente la variante de la molécula de FVIII/FVIII a las membranas aniónicas que comprende fosfatidil-L-serina encontrado por ejemplo sobre las plaquetas. En la Figura 1 se muestra un modelo de superficie de la estructura cristalográfica de rayos X de FVIII (código de entrada pdb 3cdz) en las orientaciones anterior y posterior. Se indican las posiciones de los dominios A1, A2, A3, C1 y C2. Los residuos de lisina y arginina están en negro, mostrando su amplia distribución. El pie C1 se muestra en blanco en el modelo de FVIII que se muestra en la FIGURA 2. Más específicamente, los siguientes aminoácidos C1 probablemente están anclados en la membrana de fosfolípidos, en relación con, por ejemplo, unión a las plaquetas, y por lo tanto son una parte del pie C1: 2029-2035 + 2043-2069 + 2090-2100 + 2130-2136 + 2156-2163. Los inventores de la presente invención han demostrado sorprendentemente que la mutación de cada uno de los residuos 2065, 2090 y 2092 dará como resultado variantes del FVIII biológicamente activas que tienen una menor unión de LRP, en particular cuando estos residuos están sustituidos, pero no se limitan a, cualquiera de las dos glutamina o un residuo de alanina, dependiendo del área de superficie accesible del residuo.
- 40
- 45

- En el contexto de la presente invención, el “pie C2” se define como la región del dominio C2 que probablemente tenga la capacidad de anclar la variante de la molécula de FVIII/FVIII a las membranas aniónicas que comprenden fosfatidil-L-serina encontrada, por ejemplo, sobre las plaquetas. El pie C2 se muestra en blanco en el modelo de FVIII que se muestra en la FIGURA 2. Más específicamente, los siguientes aminoácidos C2 están anclados en la capa de fosfolípidos, en relación con, por ejemplo, unión de plaquetas, y por lo tanto son una parte del pie C2: 2195-2227 + 2248-2258 + 2287-2291 + 2313-2320. Los inventores de la presente invención han demostrado que la mutación de uno de los residuos de lisina o arginina expuestos en la superficie en el pie C2 (ya sea R2215 o K2249) dará como resultado variantes del FVIII biológicamente activas que tienen una unión de LRP disminuida, en particular cuando estos residuos están sustituidos con, pero no limitado a, ya sea un residuo de glutamina o un residuo de alanina,
- 50
- 55

dependiendo de la accesibilidad a la superficie del residuo. Los inventores han demostrado además que una variante de FVIII que comprende una sustitución en el pie C1 y una en el pie C2 muestra una disminución de la unión de LRP y mantiene la actividad del FVIII:C.

- 5 Residuos cargados accesibles desde la superficie/residuos cargados positivamente/residuos de lisina o arginina en el FVIII C1 y/o el pie C2: el área de la superficie accesible (AAS) es el área de la superficie de una biomolécula o partes de una superficie biomolecular (por ejemplo, una sola cadena lateral de aminoácido) que es accesible a un solvente. El ASA se suele citar en angstrom cuadrado (una unidad de medida estándar en biología molecular). El ASA fue descrito por primera vez por Lee & Richards en 1971 y a veces se le llama la superficie molecular de Lee-Richards [B. Lee and F.M. Richards, "The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility" J. Mol. Biol. 55, 379-400 (1971)]. Las accesibilidades de la superficie se pueden calcular con el programa de ordenador Quanta 2005 de Accelrys Inc. usando las coordenadas atómicas que se originan de, por ejemplo, Estructuras de rayos x. La accesibilidad relativa a la superficie de una cadena lateral de aminoácidos es el área accesible real de la superficie dividida por el área de superficie máxima accesible determinada para el aminoácido único. El ASA se calcula a partir de la estructura cristalográfica de rayos X de FVIII con el código de entrada pdb 3cdz. Si la accesibilidad relativa a la superficie es inferior al 20%, el residuo se muta a glutamina para evitar el colapso local de la superficie de la proteína. Los residuos de aminoácidos accesibles en la superficie cargada, preferiblemente los residuos de aminoácidos cargados positivamente, preferiblemente los residuos de lisina y/o arginina en el pie C1 y/o C2 pueden seleccionarse para la sustitución de aminoácidos con el fin de llegar a una variante de FVIII que tenga una absorción celular disminuida y opcionalmente también disminuyó la unión de LRP/eliminación mediado por LRP.
- 10
- 15
- 20 "Factor VIII" o "FVIII", como se usa en el presente documento, se refiere a una glucoproteína plasmática humana que es un miembro de la vía de coagulación intrínseca y es esencial para la coagulación de la sangre. "FVIII nativo" es la molécula de FVIII humano de longitud completa como se muestra en la SEQ ID NO. 1 (aminoácido 1-2332). El dominio B abarca los aminoácidos 741-1648 en la SEQ ID NO 1.

SEQ ID NO 1 (wt human FVIII):

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKS-  
 FPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASH-  
 PVS LHAVGVS YWKASEGA EYDDQTSQREKEDDKVFP GG-  
 SHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSH-  
 VDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVF-  
 DEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVY-  
 WHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ-  
 25 TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCEPEPQLRMKNNEEAEDYDDDLT-

DSEMDVVRFDNDNSPSFIQIRSVAKKHPKTVWHYIAAEEEDWDYAPLVLAP-  
 DDRSYKSYQLNNGPQRIGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLII-  
 IFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKS-  
 DPRCLTRYSSVFVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW-  
 YLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTD-  
 FLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRG-  
 MTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFSQNSRHPSTRQKQFNATTI-  
 PENDIEKTDWPFAHRTPMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDP-  
 SPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSMDMVFTEPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLD-  
 FKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDITLFGKKSPLTESGG-  
 PLSLSEENNSKLLSEGLMNSQESS-  
 WGKNVSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVISLTKNTKTSNNSATNRKTHIDGPSLLI  
 ENSPSVWQNILESDETFKVTPLIHDRM-  
 LMDKNATALRLNHSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSSFFKMLFLPESAR-  
 WIQRTHGKNSLNSGQGP-  
 SPKQLVSLGPEKSVQNFSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTNLD-  
 NLHENNTHNQEKKIQEEIEKKTETLIQENVVLPQIHTVTGTFKMFKNLFLSTRQNVESYD-  
 GAYAPVLQDFRSLNDSTNRKKTHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISP-  
 NTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLPSTLTQI-  
 DYNEKEKGAITQSPSLDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSS-  
 FPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRK-  
 KDSGVQESSHFLQGAKKNLSLAILTLEMTGDQREVGSGLGTSATNSVTYKVENTVLPKPD  
 PKTSGKVVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLQGTGTEGAIK-  
 WNEANRPGKVFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWSQEKSPKTAFA-  
 KKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVLRHQREITRT-  
 TLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFI-  
 AAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEH-  
 LGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETK-  
 TYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG-  
 PLLVCHTNTLNPAGHRQVTVQEFALFFTFDETKSWYFTENMERN-  
 CRAPCNQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNE-  
 NIHSIHFGHVFTRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM-  
 LPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPMGASGHIRDFQITASGQYQWAP-  
 KLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLD-  
 GKKWQTYRGNSTGLMVFFGNVDSSGIKHNFNPIIARYIRLHPHYSIRSTLR-  
 MELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFAT-  
 WSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKE-  
 FLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFGGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRI-  
 HPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

5 Las moléculas/variantes de FVIII de acuerdo con la presente invención pueden ser moléculas de FVIII truncadas en el dominio B borradas o con eliminación del dominio B, en las que los dominios restantes se corresponden estrechamente con la secuencia expuesta en el aminoácido No. 1-740 y 1649-2332 en la SEQ ID NO. 1. Sin embargo, las moléculas truncadas en el dominio B de acuerdo con la invención pueden diferir ligeramente de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO 1, lo que significa que los dominios restantes (es decir, los tres dominios A y los dos dominios C) pueden diferir ligeramente, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO 1 (aminoácidos 1-740 y 1649-2332) debido al hecho de que se pueden introducir mutaciones para, por ejemplo, reducir la capacidad de enlace vWF. Además, se introducen una o dos sustituciones de aminoácidos en el pie C1 y/o C2 para modificar la capacidad de unión de FVIII para LRP. Sin embargo, es posible que las variantes de FVIII de acuerdo con la presente invención comprendan además sustituciones de lisina en otros lugares en la superficie de la molécula para modificar adicionalmente la unión de LRP. También se pueden introducir sustituciones, eliminaciones o adiciones adicionales de aminoácidos para modular las propiedades de la variante de FVIII de acuerdo con la invención. Finalmente, se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en las variantes de FVIII de acuerdo con la presente invención para aumentar la estabilidad intramolecular de la molécula.

Las moléculas de FVIII de acuerdo con la presente invención tienen actividad de FVIII también denominada actividad de FVIII: C o FVIII: C, lo que significa la capacidad de funcionar en la cascada de coagulación de una manera funcionalmente similar o equivalente a FVIII, inducir la formación de FXa a través de la interacción con FIXa en una plaqueta activada, y favorece la formación de un coágulo sanguíneo. La actividad se puede evaluar in vitro mediante técnicas bien conocidas en la técnica, como, por ejemplo, medición de la activación de FX en un ensayo cromogénico, análisis de coágulos utilizando plasma deficiente en FVIII, ensayos de generación de trombina, tromboelastografía, etc. Las moléculas de FVIII según la presente invención tienen una actividad de FVIII de al menos aproximadamente el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos 90%, y 100% o incluso más del 100% de la del FVIII humano nativo.

10 Estabilidad intramolecular de FVIII (estabilidad intrínseca):

La "estabilidad intrínseca" de las variantes del FVIII de acuerdo con la invención a veces puede denominarse la "estabilidad", la "estabilidad física", la "estabilidad inherente", la "estabilidad estructural", la "estabilidad química", la "estabilidad intrínseca", la "estabilidad in vitro", la "estabilidad termodinámica", la "estabilidad térmica", la "estabilidad de plegado", etc., y depende de las condiciones ambientales de forma compleja. El tema común para estos términos es que se refieren a la estabilidad in vitro del polipéptido y esta estabilidad in vitro puede verse como la suma de las fuerzas en el polipéptido que estabilizan el conjunto relativamente pequeño de conformaciones plegadas. Existen diferencias significativas entre la estabilidad in vivo del FVIII y la estabilidad in vitro porque el FVIII está sujeto a un gran número de mecanismos de eliminación in vivo. Hasta ahora no ha sido posible obtener una vida media circulatoria in vivo prolongada con variantes de FVIII que tengan una estabilidad in vitro mejorada. La estabilidad in vitro de las variantes de FVIII según la invención se puede mejorar, por ejemplo, por inserción de puentes disulfuro estabilizadores, inserción de aminoácidos hidrófobos adicionales que pueden formar interacciones hidrófobas intramoleculares, inserción de aminoácidos positivos y negativos que formarán interacciones electrostáticas, etc.

La conjugación de FVIII con varias cadenas laterales se conoce en la técnica como un medio para obtener una vida media circulatoria prolongada de FVIII. Se ha demostrado previamente que la vida media circulatoria se puede aumentar aproximadamente 2 veces, es decir, hasta aproximadamente 24 horas, por ejemplo, por conjugación de la molécula de FVIII. La estabilidad intrínseca del FVIII wt, determinada por una vida media en el plasma anticoagulante TAP/hirudina a 37°C, es de aproximadamente 30 horas, lo que coincide con la vida media circulatoria más larga informada para una variante de FVIII.

Sin embargo, puede haber un efecto inesperado de sinergia en la combinación de sustituciones de lisina o arginina en el pie C1 y/o C2, por ejemplo, aumentando la estabilidad in vitro de FVIII y/o, por ejemplo, conjugando la variante del FVIII con una cadena lateral. Un sorprendente efecto de sinergia adicional que se puede obtener con las moléculas de acuerdo con la presente invención es que las variantes resultantes del FVIII pueden además poseer una actividad específica significativamente mayor que resulta en una molécula más potente.

Molécula de FVIII truncada/eliminada del dominio B: el dominio B en FVIII abarca los aminoácidos 741-1648 en la SEQ ID NO 1. El dominio B se divide en varios sitios diferentes, generando una gran heterogeneidad en las moléculas de FVIII en plasma circulante. La función exacta del dominio B altamente glicosilado es desconocida. Lo que se sabe es que el dominio es prescindible para la actividad del FVIII en la cascada de coagulación. Por lo tanto, el FVIII recombinante se produce frecuentemente en forma de variantes B eliminadas/truncadas del dominio B.

El FVIII endógeno de longitud completa se sintetiza como una molécula precursora de cadena única. Antes de la secreción, el precursor se divide en la cadena pesada y la cadena ligera. El FVIII con eliminación del dominio B recombinante se puede producir a partir de dos estrategias diferentes. O bien la cadena pesada sin el dominio B y la cadena ligera se sintetizan individualmente como dos cadenas polipeptídicas diferentes (estrategia de dos cadenas) o el FVIII con eliminación del dominio B se sintetiza como una cadena polipeptídica precursora única (estrategia de cadena única) que se divide en las cadenas pesada y ligera de la misma manera que el precursor de FVIII de longitud completa.

En un polipéptido precursor de FVIII con eliminación del dominio B preparado por la estrategia de cadena única, los restos de cadena pesada y ligera están normalmente separados por un enlazador. Para minimizar el riesgo de introducción de epítopos inmunogénicos en el FVIII con eliminación del dominio B, la secuencia del enlazador es preferible derivada del dominio B del FVIII. Como mínimo, el enlazador debe comprender un sitio de reconocimiento para la proteasa que divide el polipéptido precursor del FVIII eliminado en el dominio B en la cadena pesada y ligera. En el dominio B del FVIII de longitud completa, el aminoácido 1644-1648 constituye este sitio de reconocimiento. El sitio de trombina que conduce a la eliminación del enlazador en la activación del FVIII con eliminación del dominio B se encuentra en la cadena pesada. Por lo tanto, es poco probable que el tamaño y la secuencia de aminoácidos del enlazador influyan en su eliminación de la molécula de FVIII restante mediante la activación de la trombina. La eliminación del dominio B es una ventaja para la producción de FVIII. Sin embargo, partes del dominio B pueden incluirse en el enlazador sin reducir la productividad. El efecto negativo del dominio B en la productividad no se ha atribuido a ningún tamaño o secuencia específicos del dominio B.

El dominio B truncado puede comprender solo un sitio potencial de O-glicosilación y uno o más grupos/fracciones laterales están conjugados covalentemente a este sitio de O-glicosilación, preferiblemente a través de un enlazador.

- Los oligosacáridos enlazados a O en las moléculas truncadas en el dominio B de acuerdo con la invención pueden unirse a sitios de O-glicosilación que se crearon artificialmente por medios recombinantes y/o por generación de nuevos sitios de O-glicosilación por truncamiento del dominio B. Un ejemplo de un dominio B de FVIII truncado en O glicosilado es: SFSQNSRHPSQNPVVKRHQR (SEQ ID NO 2). Dichas moléculas pueden prepararse diseñando una
- 5 secuencia de aminoácidos de FVIII truncada en el dominio B y subsecuentemente sometiendo la secuencia de aminoácidos a un análisis in silico que predice la probabilidad de sitios de O-glicosilación en el dominio B truncado. Las moléculas con una probabilidad relativamente alta de tener tales sitios de glicosilación se pueden sintetizar en una célula huésped adecuada, seguido del análisis del patrón de glicosilación y la selección subsiguiente de moléculas que tienen glicosilación unida a O en el dominio B truncado.
- 10 La molécula de FVIII también contiene una serie de oligosacáridos enlazados a N y cada uno de estos puede servir como un ancla para la unión de un grupo/fracción lateral que se extiende a la vida media.
- La longitud máxima del dominio B en la molécula de FVIII wt es de aproximadamente 907 aminoácidos. La longitud del dominio B truncado en las moléculas de acuerdo con la presente invención puede variar de aproximadamente 10 a aproximadamente 800 aminoácidos, tal como, por ejemplo, desde aproximadamente 10 aminoácidos hasta
- 15 aproximadamente 700 ácidos, tal como, por ejemplo, aproximadamente 12-500 aminoácidos, 12-400 aminoácidos, 12-300 aminoácidos, 12-200 aminoácidos, 15-100 aminoácidos, 15-75 aminoácidos, 15-50 aminoácidos, 15-45 aminoácidos, 20-45 aminoácidos, 20-40 aminoácidos, o 20-30 aminoácidos. El dominio B truncado puede comprender fragmentos de la cadena pesada y/o la cadena ligera y/o una secuencia introducida artificialmente que no se encuentra en la molécula de FVIII wt. Los términos "dominio B truncado" y "dominio B eliminado" se pueden usar indistintamente en este documento.
- 20 Vida media circulatoria modificada: las moléculas según la presente invención pueden tener una vida media circulatoria in vivo modificada en comparación con la molécula de FVIII de tipo silvestre, preferiblemente una vida media circulatoria aumentada. La vida media circulatoria se incrementa preferiblemente al menos el 10%, preferiblemente al menos el 15%, preferiblemente al menos el 20%, preferiblemente al menos el 25%, preferiblemente al menos el 30%, preferiblemente al menos el 35%, preferiblemente al menos el 40%, preferiblemente al menos el 45%, preferiblemente al menos el 50%, preferiblemente al menos el 55%, preferiblemente al menos el 60%, preferiblemente al menos el 65%, preferiblemente al menos el 70%, preferiblemente al menos el 75%, preferiblemente al menos el 80%, preferiblemente al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, preferiblemente al menos el 100%, más preferiblemente al menos el 125%, más preferiblemente al menos el 150%, más
- 25 preferiblemente al menos el 175%, más preferiblemente al menos el 200%, y lo más preferiblemente al menos el 250% o 300%. Incluso más preferiblemente, tales moléculas tienen una vida media circulatoria que se incrementa al menos el 400%, 500%, 600% o incluso 700%. Se puede usar el siguiente método para medir la vida media circulatoria in vivo: el FVIII se administra por vía intravenosa a ratones deficientes en FVIII, por ejemplo, ratones transgénicos (KO) FVIII Exon 16 con crías originales c57bl/6 en Taconic M&B, o ratones con deficiencia de vWF, por ejemplo, ratones KO
- 30 VWF exón 4 + 5 con SV129 mezclado y crías originales c57bl/6 en Charles River, Alemania. Los ratones con vWF-KO tenían un 13% de FVIII: C normal, mientras que los ratones con FVIII-KO no tenían FVIII: C detectable. Los ratones reciben una única inyección intravenosa de rFVIII (280 UI/kg) en la vena de la cola. La sangre se extrae del plexo orbital en puntos de tiempo hasta 64 horas después de la dosificación utilizando tubos de vidrio capilar no recubiertos. Se toman tres muestras de cada ratón y se recogen de 2 a 4 muestras en cada punto de tiempo. La sangre se estabiliza inmediatamente con citrato de sodio y se diluye en cuatro volúmenes de tampón (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, BSA al 1%, pH 7.3, con conservante) antes de centrifugación a 5 min a 4000 x g. El plasma obtenido a partir de sangre diluida se congela en hielo seco y se mantiene a -80°C. El FVIII:C se determina en un ensayo cromogénico esencialmente como se describe en el ejemplo 3. El antígeno FVIII se puede medir por ELISA, por ejemplo, Asserachrom® VIII: Ag de Diagnostica Stago. El análisis farmacocinético se puede llevar a cabo, por ejemplo, métodos no compartimentales
- 35 (NCA) que utilizan el software winnonlin pro versión 4.1.
- Anticuerpos: el término "anticuerpo" en este documento se refiere a una proteína, derivada de una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal, capaz de unirse específicamente a un antígeno o una porción del mismo. El término incluye anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo (es decir, IgA, IgE, IgG, IgM y/o IgY) y cualquier cadena única de los mismos. El sitio en el antígeno al que se une un anticuerpo se llama epítopo.
- 40 Los anticuerpos de longitud completa generalmente comprenden al menos cuatro cadenas polipeptídicas: es decir, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que están interconectadas por enlaces disulfuro. El anticuerpo puede diseccionarse en los fragmentos Fab de unión a antígeno y el dominio Fc que se une a varios receptores Fc. Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica.
- 45 Inmunogenicidad del FVIII: los pacientes con hemofilia A grave tienen menos del 1% de FVIII y, por lo tanto, su sistema inmunitario puede responder a la administración terapéutica de FVIII como un antígeno extraño, en particular en relación con el tratamiento de alta intensidad después de hemorragias importantes. Los anticuerpos neutralizantes del FVIII (inhibidores) generalmente se asignan a ciertas áreas dentro del dominio A2 y la cadena ligera, en particular el dominio C2 (J Thromb Haemost 2004; 2: 1082-1095; Blood 2007; 110: 4234-4242). Se cree que la absorción por células dendríticas y macrófagos es el paso inicial para presentar el FVIII al sistema inmunitario en (J Thromb Haemost 2009; 7: 1816-1823). Se ha sugerido que los receptores de manosa de macrófagos están involucrados en la absorción
- 50
- 55
- 60

de FVIII por estas células presentadoras de antígenos (Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 8965-8970) mientras que el LRP parece no estar involucrado (Haematologica 2008; 93: 83-89). El desarrollo posterior de los inhibidores es una respuesta inmunitaria dependiente de las células T. Se ha identificado y confirmado un solo epítipo de células T CD4+ dentro de un péptido que abarca el aminoácido 2098-2112 en el dominio C1, mientras que ningún otro péptido de 15 mer que abarque la totalidad de los dominios A1-A2-A3-C1-C2 se confirmó como positivo (J Thromb Haemost 2005; 3: 991-1000). Mutaciones de dos aminoácidos en el péptido, es decir, M2104 y L2107, dieron como resultado una disminución en la proliferación de células T. En otro estudio, los epítopos de células T se analizaron dentro de los dominios A2, C1 y C2 y se encontró que los residuos de aminoácidos R2220, F2196, N2198, M2199, L2200 y R2215 en C2 son de particular importancia para provocar una respuesta de células T (WO 2011/060372). Además, un epítipo de células B en el dominio A2 puede tener una función en la generación de una respuesta inmunitaria, ya que FVIII-R484A/R489A/P492A indujo un nivel más bajo de anticuerpos anti-FVIII inhibidores en un modelo de ratones con hemofilia A que wt FVIII (Blood 2004; 104 : 704-710). Por lo tanto, se deduce que diferentes investigadores han identificado diferentes epítopos en el FVIII que están involucrados en la respuesta inmunitaria al FVIII, y que no hay un acuerdo común sobre dónde en el FVIII introducir sustituciones para generar una molécula de FVIII menos inmunogénica. La inmunogenicidad del FVIII se evalúa típicamente en modelos de ratones con hemofilia A que llevan el murino nativo (Thromb Haemost 1999; 81: 240-244) o (parte de) el repertorio del MHC de clase II (Haemophilia 2010; 16 suppl 5: 47-53), en modelos animales en los que se ha inducido tolerancia a FVIII humano (Haemophilia 2010; 16 suppl 5: 47-53), o en ensayos de respuesta de células T humanas (Thromb Haemost 2000; 84: 643-652; WO 2011/060372), aunque no se sabe si alguno de estos modelos es predictivo para la clínica humana.

20 Absorción celular/eliminación de FVIII mediado por LRP: las variantes de FVIII de acuerdo con la invención tienen preferiblemente una absorción celular disminuida. Una menor absorción celular puede asociarse con una vida media circulatoria in vivo prolongada. La absorción celular se puede medir utilizando el ensayo divulgado en el ejemplo 7. Los miembros de la familia LRP y LRP se han implicado en la eliminación del FVIII a través de la eliminación de endocitosis de FVIII por células que expresan LRP en la superficie de, por ejemplo, hepatocitos. La infusión de una RAP (proteína asociada al receptor) de antagonista de LRP en ratones inhibió completamente la fase inicial de la eliminación de FVIII en ratones BALB/c y prolongó la vida media de <sup>125</sup>I-FVIII 3.3 veces (J Biol Chem 1999; 274: 37685-37692). En ratones deficientes en LRP condicional, se observó un aumento del nivel plasmático de FVIII (Blood 2003; 101: 3933-3939) y en un ratón combinado deficiente en LRP y LDLR (receptor de lipoproteínas de baja densidad) tiene un tiempo de residencia medio 4.8 veces mayor de FVIII inducido (Blood 2005; 106: 906-912). Si bien estas publicaciones demuestran la función de los miembros de la familia LRP y LRP en la eliminación de FVIII in vivo, las posiciones exactas en FVIII responsables de la interacción con LRP siguen sin estar claras. Un sitio de unión LRP que comprende el aminoácido 484-509 se ha identificado previamente en A2 (J Biol Chem 1999; 274: 37685-37692; Biochemistry 2006; 45: 1829-1840; Blood Coagul Fibrinolysis 2008; 19: 543-555). Sin embargo, la unión de mAb413 a esta región solo afectó la unión de LRP a A2 aislada y no a FVIII intacto, ya que el sitio LRP en A2 solo se expone en FVIII activado (FVIIIa) (J Thromb Haemost 2006; 4: 1487-1493). Además, el FVIII con sustituciones de alanina únicas o múltiples dentro del aminoácido 376-556 mostró una unión de LRP comparable a FVIII sin sustituciones en esta región, y el tiempo de residencia en plasma en ratones de las moléculas de FVIII mutado no aumentó con respecto a la vida media de los de tipo silvestre FVIII (resumen PT-035, ISTH 2007). Se ha sugerido que existan sitios de unión de LRP en la cadena ligera de FVIII (J Biol Chem 1999; 274: 23734-23739, WO 00/28021) y se identificó un sitio que involucra a Glu1811-Lys1818 en el dominio A3 en base a un efecto inhibitorio de un anticuerpo así como péptidos sintéticos que cubren esta región y la falta de unión de LRP de las quimeras FVIII-FV donde esta región en FVIII se reemplazó con la secuencia correspondiente en FV (J Biol Chem 2003; 278: 9370-9377). Esta región está cerca o superpuesta con un sitio de interacción del factor IXa y, por consiguiente, las mutaciones dentro de este sitio pueden afectar la actividad del cofactor del FVIII. Además, se ha sugerido un sitio en el dominio C2 basado en la capacidad del mAb ESH4 anti C2 para inhibir la unión de LRP de FVIII (J Biol Chem 1999; 274: 23734-23739). Se han sugerido varios epítopos para ESH4 dentro del dominio C2 de FVIII. Un epítipo para ESH4 dentro del aminoácido 2248-2285 se observa en J Biol Chem 1997; 272: 18007-18014), mientras que 2173-2222 se identificó más tarde como esencial para la unión de ESH4 a FVIII (Thromb Haemost 2003; 89: 795-802). En la hoja de datos del anticuerpo (American Diagnostica) y en J Mol Recognit 2009; 22: 301-306 se anota un epítipo dentro de 2303-2322 de FVIII. Por lo tanto, los datos disponibles para la localización del epítipo de ESH4 en FVIII son contradictorios y no están lo suficientemente detallados como para permitir la predicción de los aminoácidos individuales esenciales para la unión de LRP. Además, incluso a altas concentraciones de C2 (500 nM) solo se observó una asociación modesta con LRP (J Biol Chem 1999; 274: 23734-23739), lo que sugiere que la afinidad del sitio LRP en C2 es baja y que no está claro si este sitio desempeña cualquier función dominante en FVIII intacto. Un importante sitio de unión a fosfolípidos está presente en el dominio C2 de FVIIIa. Esto se identificó originalmente debido a la capacidad de los péptidos sintéticos que abarcan el dominio C2 para inhibir la unión del FVIII a la fosfatidil serina inmovilizada (Blood 1990; 75: 1999-2004). De esta manera, se sugirieron los residuos 2303-2332 para mediar la unión a fosfolípidos. Además, el anticuerpo monoclonal ESH-8 redujo la afinidad de FVIIIa a las vesículas de fosfolípidos que contienen fosfatidil-L-serina (Blood 1995; 86: 1811-1819; J Biol Chem 1998; 273: 27918-27926). El epítipo de ESH8 incluye el aminoácido 2248-2285 (Blood 1995; 86: 1811-1819). Sin embargo, en una publicación posterior, ESH8 y un péptido que consiste en el aminoácido 2248-2285 no pudieron inhibir la unión de FVIIIa a las plaquetas activadas, mientras que el anticuerpo ESH4 y un péptido que cubren el aminoácido 2303-2332 inhibieron la unión de FVIIIa a las plaquetas activadas (Biochemistry 2005 44: 13858-13865).

Por lo tanto, aunque se ha especulado durante mucho tiempo en la técnica que las variantes de FVIII que tienen una unión de LRP disminuida podrían tener una vida media circulatoria in vivo incrementada, no tienen sitios de unión de LRP específicos en los dominios C1 y C2 de FVIII dando como resultado una vida media circulatoria prolongada que hasta ahora se ha identificado.

5 Se cree que los motivos de unión a LRP involucran residuos de lisina pareados con una distancia de aproximadamente 20 Å cada acoplamiento en un "collar ácido" (Mol Cell 2006; 22: 277-286). Sin embargo, la distancia entre los sitios de unión de LRP puede desviarse un poco de los 20 Å (por ejemplo, al menos 15 Å) debido a la flexibilidad en las cadenas laterales de aminoácidos, la flexibilidad en la estructura del FVIII, etc. Del mismo modo, la distancia entre dos sitios de unión de LRP también puede ser de aproximadamente 40 Å, 60 Å o incluso 80 Å. La arginina puede sustituir a la lisina, ya que la cadena lateral de la arginina es más voluminosa que la lisina y es posible que no encaje en el collar ácido, lo que disminuye la unión de la LRP. El FVIII comprende un gran número de posibles motivos de unión a LRP, es decir, los inventores de la presente invención han definido 140 lisinas o argininas expuestas en la superficie (Figura 1 y tabla 1). Por lo tanto, se deduce que una persona experta en la técnica no podría identificar variantes de FVIII con una, dos, tres, o solo un número limitado de sustituciones con la unión de LRP sustancialmente reducida. Además, el experto en la materia podría esperar que un gran número de residuos de lisina y/o arginina se deban mutar para reducir significativamente la unión de LRP y la depuración de FVIII mediada por LRP. Un gran número de sustituciones de lisina y/o arginina, para reducir la unión de LRP, daría como resultado una molécula que tiene poca o ninguna actividad biológica y/o una molécula que no se puede expresar en cantidades suficientes. Esto se ejemplifica mediante varios de los mutantes de FVIII que se muestran en la tabla 1. Sin embargo, los inventores de la presente invención han demostrado sorprendentemente que la sustitución de un residuo de lisina o arginina accesible en la superficie ya sea en el pie C1 o C2, o con una sustitución tanto en el pie C1 como en el pie C2 del FVIII, da como resultado una variante FVIII que tiene una reducción significativa de la unión de LRP mientras retiene la actividad completa.

La absorción de FVIII por parte de las células que presentan antígeno, como células dendríticas y macrófagos, que pasan por alto a la familia del receptor LRP (Haematologica 2008; 93: 83-98). En su lugar, la unión del receptor de la manosa macrófaga a los glucanos de alta manosa se ha relacionado con la absorción de FVIII por estas células (Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 8965-8970). Sin embargo, los inventores de la presente invención han demostrado que las mutaciones del FVIII que dan como resultado una unión disminuida a la LRP también muestran una absorción disminuida en células dendríticas y macrófagos. En un modelo murino de formación de anticuerpos contra el FVIII humano, estas sustituciones en el FVIII sorprendentemente dieron como resultado un nivel más bajo de anticuerpos anti-FVIII totales, así como anticuerpos neutralizantes (inhibidores) medidos en el ensayo Bethesda generalmente utilizado para monitorear el desarrollo de inhibidores en pacientes con hemofilia. Por lo tanto, se puede especular si las variantes de FVIII con disminución de la absorción celular podrían tener un beneficio terapéutico en relación con un menor riesgo de desarrollar inhibidores.

Mutaciones de FVIII adecuadas para modular la absorción celular/unión de LRP:

35 Se sabe en la técnica que el anticuerpo KM33 tiene la capacidad de inhibir la unión del FVIII a LRP (J Biol Chem 2003; 278: 9370-9377 y WO 03/093313). La administración conjunta de KM33 scFv con FVIII a ratones deficientes en vWF dio como resultado un mayor nivel de actividad de FVIII 15 y 30 minutos después de la administración en comparación con los ratones de control que recibieron solo FVIII (documento WO 03/093313). Como KM33 se une a la región K2092-52094 (Blood 2009; 114: 3938-3946 y el resumen P-M-040, presentado en ISTH, 2007), se ha sugerido que K2092 podría formar parte de un posible sitio de unión de LRP, que puede comprender además K2065 (resumen O-M-041 presentado en ISTH, 2007). Estas sustituciones individuales afectaron a la unión de LRP, pero no a la interacción con el factor IXa (resumen O-M-041, ISTH, 2007). Sin embargo, no se ha sugerido que la sustitución de solo dos o más (hasta aproximadamente diez) de estos residuos de aminoácidos con alanina disminuya significativamente la unión de LRP y/o la absorción celular.

45 Las variantes de FVIII que comprenden una sustitución K2092A y/o una sustitución F2093A se describen en Blood 2009; 114: 3938-3946. Se encontró que estas mutaciones tienen una reducción de 3 a 10 veces en la afinidad a membranas que comprenden 4% de fosfatidil-L-serina y una reducción de más del 95% de la actividad del factor Xasa a un nivel bajo de fosfatidil-L-serina, por ejemplo, 4%.

50 Teniendo en cuenta la gran redundancia de los posibles sitios de unión de LRP y el hecho de que solo se pueden realizar unas pocas sustituciones de aminoácidos de los residuos de lisina (o arginina) expuestas en la superficie sin perder actividad biológica y/o reducir significativamente el rendimiento de FVIII, hasta ahora no ha sido posible proporcionar variantes de FVIII biológicamente activas que tienen una o dos o unas pocas sustituciones de aminoácidos que dan como resultado una disminución significativa de la unión de LRP. Sin embargo, los inventores de la presente invención llegaron a seleccionar sustituciones de aminoácidos en el pie C1 y/o C2 del FVIII que mantuvieron la actividad biológica y mostraron una reducción significativa en la unión de la LRP (tabla 1 y 2). No se esperaba que la combinación de sustituciones dentro de los sitios LRP en el pie C1 con las sustituciones dentro de los sitios en el pie C2 daría lugar a moléculas de FVIII con un efecto mayor en la unión de LRP y estas moléculas de FVIII al mismo tiempo mantendrían FVIII:C, como los sitios están cerca de los sitios de unión a fosfolípidos.

60 Los ejemplos de variantes de FVIII que tienen unión de LRP modulada/absorción celular de acuerdo con la presente invención incluyen:

K2092A (SEQ ID NO 3)

atrryylgavelswdymqsdlgelpvdarfpprvpksfpfntsvvykktlfveftdhlf-  
niakprppwmgllgptiqaevydtvvitlknmashpvsilhavgvsyw-  
kasegaeyddqtsqrekeddkvfpggshyvwqvlkengpmasdpcltysylsh-  
vdlvkdlnsgligallvcreglakektqtlhkfillfavfdegkswhsetknsmlmqdrdaa-  
sarawpkmhtvngyvnrsplgigchrksvywhvigmgtpvehsifleghtflvrnhr-  
qasleispitftaqtllmdlgqflfchisshqhdgmeayvkvdscpeepqlrmkn-  
neeaedyddldtsemvvrfdddnspfiqirsvakkhpktwvhyiaaeed-  
wdyapvlapddrsyksqylngpqrigrkykkvrfmaytdetfktreaiqhesgilgpily-  
gevgdtllifknqasrpyniyphgitdvrplysrrl-  
pkgvkhkldfipilpgeifkykwtvtedgptksdprcltryssfvnmerdlasglig-  
pllicykesvdqrgnqimskrnvilfsvfdenrswylteniqrflpnpagvqledpefqas-  
nimhsingyvfdslqlsvclhevaywyilsigaqtdflsvffsgytfkhkmvyedtlitf-  
pfsgetvfmsmenpgwilgchnsdfrnrgmtallkvsscdkntgdyedsyedisayllskn-  
naieprsfsqnppvlkrhqreirttlqsdqeeidyddtisvemkkedfdiydedenqsprs-  
fqkktrhyfiaaverlwdygmssspvlmraqsgsvppqkkvfvqeftdgsftqplyr-

gelnehlgllgpyiraavednimvfrnqasrpysfysslisy-  
eedqrqgaepkrnfvkpnetyfwkvqhmaptkdefdckawayfsdvlekdvhsglig-  
pllvchtntlnpahgrqvtvqefalfftifdetkswyftenmern-  
crapcniqmedptfkenyrfhaingyimdtlpglvmaqdrirwyllsmgsne-  
nihsihfsghvftvrkkeeykmalynlypgvfetvem-  
lpskagiwrvecligehlhagmstflvysnkcqtplgmasghirdfqtasgqygqwap-  
klarlhysgsinawstkepfswikvdlapmiihgiktqgarqafsslyisqfiimysld-  
gkkwqtyrgnstgtlmvffgnvdssgikhnifnppiaryirlhpthysirstlr-  
melmgcdlnscsmplgmeskaisdaqitassyftnmfatwspskarhlqgrsnawrpqvnp-  
kewlqvdfqktmkvtgvtqgvkslltsmyvkefliss-  
qdghqwtlffqngkvkvfgnqdsftpvvnslppltrylrihpqswvhqialrmevlgeaqdly

F2093A (SEQ ID NO 4)

atryyIlgavelswdymqsdIgelpvdarfprrvpksfpntsvvykktlfveftdhlf-  
niakprppwmglIqptiqaevydtvitlknmashpvsIhavgsyw-  
kasegaeyddqtsqrekeddkvfpggshtyvwqvlkengpmasdpIctysylsh-  
vdlvkdInsgIgalIvcreglakektqtlhkfillfavfdegkswhsetknsImqdrdaa-  
sarawpkmhtvngyvnrslpplIqchrksvywhvigmgttpevhsifleghtflvrnhr-  
qasleispitftaqtllmdIlgqllfchisshqhdgmeayvkvdscpeepqlrmkn-  
neeaedydddItdsemvvrfdddnspsfiqrsvakkhpktvwhyaeeed-  
wdyapIvlapddrsyksqyInngpqrigrkykkvrfmaydetfktreaiqhesgilgpIly-  
gevgdtllIifknqasrpyniyphgitdvrplysrI-  
pkgvkhIkdfpilpgeifkykwvtvedgptksdprcltryssfvnmerdlasglI-  
plIcykesvdqrgnqimsdkrnviIsvfdenrswylteniqrIpnpagvqledpefqas-  
nimhsingyvfdslqlsvclhevaywylsigaqtdflsvffsgytfkhkmvyedtIlf-  
pfsgetvfmsmenpgIwilgchnsdfnrngmtallkvsscdkntgdyedyedisayllskn-  
naieprsfqnppvlkrhqreitrItdsqdqeidyddtisvemkkedfdiydedenqsprs-  
fqkktrhyfiaaverIwdygmssshvIrnraqsgsvpqfkvvfgefIdgsftqplyr-  
gelnehIglIgpYiraavednimvtfrnqasrpysfyssIisy-  
eedqrqgaeprknfvkpnetyfwkvqhmaptkdefdckawayfsdvdlekdvhsglI-  
pllvchtntInpahgrqvtvqefalftifdetkswyftenmern-  
crapcniqmedptfkenyrfhaingyimdtIpglvmaqdrirwylIsmgsne-  
nihsihfsghvftvrkkeykmalynIyppgvfetvem-  
IpskagiwrvecligehlhagmstIflvysnkcqtplgmasghirdfqitasggygwap-  
klarIhysgsinawstkepfswikvdlIapmiihgiktqgarqkasslyisqfiimysId-

gkkwqtyrgnstgtImvffgnvdssgikhnifnppiiaryIrlhpthysirstI-  
melmgcdInscsmplgmeskaisdaqitassyftnmfatwspskarIhlqgrsnawrpqvnnp-  
kewIqvdqkmtkvgttqgvkslltsmyvkefliss-  
qdghqwtIffqngkvkvfagnqdsftpvvnsIdpplltryIrihpqswvhqialrmevlgceaqdly

K2092-F2093A (SEQ ID NO 5)

atrryyigavelswdymqsdlgelpvdarfpprvpksfpntsvvykktlfveftdhlf-  
niakprppwmgllgptiqaevydvtvitknmashpvslhavgvsyw-  
kasegaeyddqtsqrekeddkvfpqgshtyvwqvkengpmasdpclcitysh-  
vdlvkdlnsgligallvcreglakektqtlhkfillfavfdegkswhsetknslnmqdrdaa-  
sarawpkmhtvngyvnrslpgligchrksvywhvigmgtpevhsifleghtflvmhr-  
qasleispitfltaqtlldlgqflfchisshqhdgmeayvkvdscpeepqlmkn-  
neeaedydddldsemdvvrfdddnspsfiqirsvakkhpkttwvhyiaaeed-  
wdyaplvlapddrsyksqylnngpqgrigrkykkvrfmaytdetfktreaiqhesgilpily-  
gevgdtllifknqasrpyniyphgitedvrplysrll-  
pkgvkhkldfipilpgeifkykwtvtvedgptksdprcltryssfvnmerdlasglig-  
pllicykesvdqrgnqimsdkrnvilfsvdenrswylteniqrflpnpagvqledpefqas-  
nimhsingyvfdslqlsvclhevaywyilsigaqtdflsvffsgytfkhkmvyedtlif-  
pfsgetvfmsmenpglwiigchnsdfrnrgmtallkvsscdkntgdyedyedisayllskn-  
naieprfsqnppvlkrhreitrtllqsdqeeidyddtisvemkkedfdiydedenqspr-  
fqkkrthyfiaaverlwdygmssspvlmraqsgsvpqfkkvqfefdgsftqplyr-  
gelnehlgllgpyiraavednimvfrnqasrpysfysslisy-  
eedqrqgaepkrnfvknetktyfwkvqhmaptkdefdckawayfsdvlekdvhsglig-  
pilyvchtntlnpahgrqvtvqefalfftifdetkswyftenmern-  
crapcniqmedptfkenyrfhaingyimdtlpglvmaqdrirwyllsmgsne-  
nihsihfsghvftvrkkeeykmalylypgvftvem-  
lpskagiwrvecligehlhagmstflvysnkcqtpgmasghirdfqtasgqyqwap-  
klarlhysgsinawstkepfswikvdlapmiihgiktqgarqaasslyisqfiimysld-  
gkkwqytrgnstgflmvffgnvdssgikhnifnppiiaryirhpthysirstlr-  
melmgcdlnscsmplgmeskaisdaqitassyftnmfatwspskarlhlgqrsnawrpqvnp-  
kewlqvdfqktmkvtgvtgqvklltsmyvkefliss-  
qdghqwtlffqngkvkvfqnqdsftpvvnslpplltrylrihpqsvwhqialrmevlgceaqty

R2215A (SEQ ID NO 6)

atrryylgavelswdymqsdlgelpvdarfprrvpksfpntsvvykktlfveftdhlf-  
niakprppwmgllgptiqaevydtvitlknmashpvsilhavgvsyw-  
kasegaeyddqtsqrekeddkvfpggshtywwqvlkengpmasdpicltysylsh-  
vdlvkdlnsgligallvcreglakektqtlhkfillfavfdegkswhsetknsImqdrdaa-  
sarawpkmhtvngyvnrslppligchrksvywhvigmgtpvehsifleghtflvrnhr-  
qasleispitfitaqtlImdlgqflfchisshqhdgmeayvkvdscpeepqlrmkn-  
neeaedyddldtdsemdivrdddnpsfiqirsvakhhpktwvhyiaaeed-  
wdyaplvlapddrsyqsqylnggpqrigrykkvrfmaytdetfktreaiqhesgilgply-  
gevgdtliifknqasrpyinyphgitdvprplysrll-  
pkgvkhikdfpilpgeifykwtvtedgptksdprcltryssfvnmerdiasglig-  
pllicykesvdqrgnqimsdkrnvifsvfdenrswyteniqrflpnpagvqledpefqas-  
nimhsingyvfdslqlsvclhevaywylsigaqtdflsvffsgytkhkmvyedtlif-  
pfsgetVfmsmenpgwilgchnsdfrngmtalkvsscdkntgdyedyedisayllskn-  
naieprsfqsqrhpseqkliseedlsqnpvvlkrhqrreitrltqsdqeidydtis-  
vemkkedfdiydedenqsprsfqkkrhyfiaaverlwdygmssspvhlrnraqsgsvpqfkkvfvqeftdgsftqplyrgelneh  
raqsgsvpqfkkvfvqeftdgsftqplyrgelneh-  
lgllgpyiraevednimvtfmqasrpysfyslisyeedqrqgaepkrnfvkpnetk-  
tyfwkqhmaptkdefdckawayfsdvdekdvhsgligpllvchtntlnpahgrqvtvqe-  
falftifdetkswyftenmemncrapcniqmedptfkenyrfaingyim-  
dtlpglvmaqdrinryllsmgsnenihsfghvftvrkkeeykmalylypgvvetem-  
lpskagiwrvecligehlhagmstlflvysnkcqtplgmasghirdfqtasgqyqwap-  
klarhysgsinawstkepfswikvdlapmihgiltqgarqkfslyisqfiimysld-  
gkkwqtyrgnstglmvffgnvdssgikhnifnppiiaryirlhphthysirstlr-  
melmgodlnscsmplgmeskaisdaqitassyfntmfatwspskarhlhlggasnawrpqvnnp-  
kewlqvdqktmktvgtvtqgklltsmyvkefiiss-  
qdghqwlffqngkvkfvqgnqdsftpvvnslppllrylrihpqsvvhqialrmevlgecaqdly

K2065A-R2215A (SEQ ID NO 7)

atrryylgavelswdymqsdlgelpvdarfprrvpksfpntsvvykktlfveftdhlf-  
niakprppwmgllgptiqaevydtvitlknmashpvsilhavgvsyw-  
kasegaeyddqtsqrekeddkvfpggshtywwqvlkengpmasdpicltysylsh-  
vdlvkdlnsgligallvcreglakektqtlhkfillfavfdegkswhsetknsImqdrdaa-  
sarawpkmhtvngyvnrslppligchrksvywhvigmgtpvehsifleghtflvrnhr-  
qasleispitfitaqtlImdlgqflfchisshqhdgmeayvkvdscpeepqlrmkn-  
neeaedyddldtdsemdivrdddnpsfiqirsvakhhpktwvhyiaaeed-

wdyaplvlapddrsyksqylnggpqrigrykkrvmaytdefktraiqhesgilgply-  
gevgdtliifknqasrpyniyphgitdvrplysrrl-  
pkgvkhkldfipilpgeifykwtvtvedgptksdprcltryssfvnmerdlasglig-  
pllicykesvdqrgnqimsdkrnvilsvfdenrswylteniqrflpnpagvqledpefqas-  
nimhsingyvfdslqsvclhevaywyilsigaqtdflsvffsgytfkhkmvyedtltlf-  
pfsgetvfmsmenpgwilgchnsdfrnrgmtallkvsscdkntgdyedyedisayllskn-  
naieprsfqsnsrhpseqkliseedsqnppvlkrhqrreitrttlqsdqeeidyddtis-  
vemkkedfdiydedenqsprsfqkktrhyfiaaverlwdygmssspvhlrnraqsgsvpqfkkvfvqeftdgsftqplyrgelneh-  
raqsgsvpqfkkvfvqeftdgsftqplyrgelneh-  
lgllgpyiraavednimvtrnqasrpyssyflsyssyeeedqrqgaepkrnfvkpnetk-  
tyfwkvqhmaptkdefdckawayfsdvdekdvhsiglipllvchtntlnpahgrqvtvqe-  
falfftifdetkswyftenmerncrapcniqmedptfkenyrfaingyim-  
dtlpglvmaqdrirwylsmgsnenihsihsgfvtrkkeykmalylnyppgvfetvem-  
lpskagiwrvecligehlhagmstlflvysnkcqtplgmasghirdfqtasggyqwap-  
klarlhysgsinawstaepfwikvdlapmiihgiktqgarqkfslyisqfiimysld-  
gkkwqyrgnstgtlmvffgnvdssgikhnifnppiiaryirlhphthisirstlr-  
melmgcdlnscsmpgmeskaisdaqitassyfntmfatwspkarlhlggasnawrpqvnnp-  
kewlqvdfqtkmvtgvtqgvkslltsmyvkefliss-  
qdghqwtlffqngkvfvqgnqdsftpvnsldppllrylrihpqswvhqialrmevlgceaadly

R2090A-R2215A (SEQ ID NO 8)

atryylgavelswdymqsdlgelpvdarfpprvpksfpntsvvykktlfeftdhlf-  
niakprppwmgllgptiqaevydvtvitknmashpvsilhavgvsyw-  
kasegaeyddqtsqrekeddkvfpggshyvwqvlkengpmasdplctysylsh-  
vdlvkdlnsgligallvcreglakektqtlhkfillfavdegkswhsetknsmlqdrdaa-  
sarawpkmhtvngyvnrslppligchrksvywhvigmttpevhshifleghtflvmhr-  
qasleispitftaqtllmdlgqflfchisshqhdgmeayvkvdsceepqlrmkn-  
neeaedydddtdsemvvrfdndnspsfqirsavkkhpkttwvhyiaaeed-  
wdyaplvlapddrsyksqylnggpqrigrykkrvmaytdefktraiqhesgilgply-  
gevgdtliifknqasrpyniyphgitdvrplysrrl-  
pkgvkhkldfipilpgeifykwtvtvedgptksdprcltryssfvnmerdlasglig-  
pllicykesvdqrgnqimsdkrnvilsvfdenrswylteniqrflpnpagvqledpefqas-  
nimhsingyvfdslqsvclhevaywyilsigaqtdflsvffsgytfkhkmvyedtltlf-  
pfsgetvfmsmenpgwilgchnsdfrnrgmtallkvsscdkntgdyedyedisayllskn-  
naieprsfqsnsrhpseqkliseedsqnppvlkrhqrreitrttlqsdqeeidyddtis-

vemkkedfdiydedenqsprsfqkktrhyfiaaverlwdygmssspvhlrnraqsgsvpqfkkvfvqeftdgsftqplyrgelneh-  
raqsgsvpqfkkvfvqeftdgsftqplyrgelneh-  
lgllgpyiraavednimvtrnqasrpyssyflsyssyeeedqrqgaepkrnfvkpnetk-  
tyfwkvqhmaptkdefdckawayfsdvdekdvhsiglipllvchtntlnpahgrqvtvqe-  
falfftifdetkswyftenmerncrapcniqmedptfkenyrfaingyim-  
dtlpglvmaqdrirwylsmgsnenihsihsgfvtrkkeykmalylnyppgvfetvem-  
lpskagiwrvecligehlhagmstlflvysnkcqtplgmasghirdfqtasggyqwap-  
klarlhysgsinawstkepfwikvdlapmiihgiktqgaqkfslyisqfiimysld-  
gkkwqyrgnstgtlmvffgnvdssgikhnifnppiiaryirlhphthisirstlr-  
melmgcdlnscsmpgmeskaisdaqitassyfntmfatwspkarlhlggasnawrpqvnnp-  
kewlqvdfqtkmvtgvtqgvkslltsmyvkefliss-  
qdghqwtlffqngkvfvqgnqdsftpvnsldppllrylrihpqswvhqialrmevlgceaadly

K2092A-R2215A (SEQ ID NO 9)

atrrrylgavelswdymqsdgelpvdarpprvpksfpntsvvykktlfevtdhlf-  
 niakprppwmgllgptiqaevydtvitlknmashpvsilhavgvsyw-  
 kasegaeyddqtsqrekeddkvfggshtyvwqvlkengpmasdpclctysylsh-  
 vdlvkdlnsgligallvcreglakektqtlhkfillfavfdegkswhsetknsImqdrdaa-  
 sarawpkmhvtngyvnrsplglicchrksvywhvigmgtpevhsifleghtflvrnhr-  
 qasleispitftaqtllmdlgqfllchisshqhdgmeayvkvdscpeepqlrmkn-  
 neeaedydddldsemdvvrfdndnpsfqiirsvakkhpkthvwhyaeeed-  
 wdyaplvlapddrsyqsqylngpqrigrkykkrvmaytdetfktreaiqhesgilgply-  
 gevgtllifknqasrpyniyphgtdvrplysrri-  
 pkgvkhkldfpilpgeifykwtvtvedgptksdprcltryssfvnmerdlasglig-  
 pllicykesvdqrgnqimsdkrnviilsvfdenrswyleniqrfpnpagvqledpefqas-  
 nimhsingyvfdslqlsvclhevaywiilsigaqtdflsvffsgytfkxkmvyedttif-  
 pfsgetvfmsmenpglwiigchnsdfnrgmtalkkvsscdkntgdyedyedisayllskn-  
 naieprfsqnsrhpseqkliseedsqnppvlkrhqrreitrtllqsdqeeidyddtis-  
 vemkkedfdiydedenqsprsfqkkrthyaaverlwdygmssspvlnraqsqsvpqkqvfeftdgsftqplyrgelneh  
 raqsgsvpqkqvfeftdgsftqplyrgelneh-  
 lgllgpyiraavednimvfrnqasrpyssyssliseedqrqgaepkrnfvkpnatk-  
 tyfwkvqhhmaptkdefdckawayfsdvlekdvhsgligpllvchntlnpahgrqvtvqe-  
 falfftifdetkswyftenmerncrapcniqmedptfkenyrfhaingyim-  
 dtlpglvmaqdrirvylsmgsnenihshfghvftvrkkeeykmalylnypgvfetvem-  
 lpskagiwrvecligehlhagmstflvysnkcqtplgmasghirdfqtasgqyqwap-

klarlhysgsinawstkepfswikvdllapmiihgiktqgarqafsslyisqfiimysld-  
 gkkwqytrgnstgtlmvffgnvdssgikhnifnppiaryirlhphthysirstlr-  
 melmgcdlnscsmplgmeskaisdaqitassyftnmfatwspskarhlhgqasnawrpqvnnp-  
 kewlqvdfqktmkvtgvtqgvkslltsmyvkefliss-  
 qdghqwtlffngkvkfvqgnqdsftpvvnslpplltrylrihpqswvhqialrmevlgceaqdly

5 Cadena lateral/grupo lateral/fracción: las variantes de FVIII de acuerdo con la presente invención pueden conjugarse covalentemente con un grupo lateral (resto de vida media) mediante una modificación postraducciona

10 l o en forma de una proteína de fusión. Una o más de las siguientes modificaciones de grupo lateral de FVIII pueden llevarse a cabo de este modo: alquilación, acilación, formación de éster, disulfuro o formación de amida o similares. Esto incluye FVIII PEGilado, FVIII PEGilado con cisteína y variantes del mismo. Las variantes de FVIII de acuerdo con la invención también pueden conjugarse con ácidos grasos biocompatibles y derivados de los mismos, polímeros hidrófilos

15 (hidroxietil etil almidón, polietilenglicol, ácido hialurónico, polímeros de heparosan, polímeros a base de fosforilcolina, flexímeros, dextrano, ácidos poliiséricos), polipéptidos (anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, dominios Fc, transferrina, albúmina, péptidos similares a Elastina (MacE-wan SR, Chilkoti A. Biopolímeros. 2010; 94:60), Polímeros XTEN (Schellenberger V et al, Nat Biotechnol. 2009; 27:1186), PASilación o HAPilación (Schlapschy M et al. Protein Eng Des Sel. 2007; 20:273) péptidos de unión a albúmina (Dennis M S et al. J Biol Chem. 2002, 277: 35035)), etc.

20 El FVIII de acuerdo con la presente invención se puede acilar mediante una o más vidas medias que extienden los grupos/fracciones laterales hidrófobos, opcionalmente a través de un enlazador. Los compuestos que tienen una fracción  $-(CH_2)_{12}^-$  son posibles aglutinantes de albúmina en el contexto de la presente invención. Los grupos laterales hidrófobos a veces pueden denominarse "aglutinantes de albúmina" debido al hecho de que dichos grupos laterales

25 pueden ser capaces de formar complejos no covalentes con albúmina, promoviendo así la circulación de la variante de FVIII acilado en la corriente sanguínea, debido a hecho de que los complejos de la variante de FVIII acilado y la albúmina se desintegran lentamente para liberar la variante de FVIII. El FVIII se puede acilar utilizando métodos químicos, así como métodos enzimáticos de "glicoacilación" siguiendo esencialmente los procesos descritos en el documento WO03031464. Los métodos enzimáticos tienen las ventajas de evitar el uso de cualquier solvente orgánico, además de ser muy específicos del sitio en general.

El término "FVIII PEGilado" significa FVIII, conjugado con una molécula de PEG. Debe entenderse que la molécula de PEG puede unirse a cualquier parte de FVIII, incluyendo cualquier resto de aminoácido o fracción de hidrato de carbono. El término "FVIII PEGilado con cisteína" significa FVIII que tiene una molécula de PEG conjugada a un grupo sulfhidrilo de una cisteína introducida en FVIII.

5 El PEG es una molécula de polímero adecuada, ya que solo tiene pocos grupos reactivos capaces de entrecruzamiento en comparación con polisacáridos como el dextrano. En particular, PEG monofuncional, por ejemplo, el metoxipolietilenglicol (mPEG) es interesante ya que su química de acoplamiento es relativamente simple (solo un grupo reactivo está disponible para conjugarse con los grupos de unión en el polipéptido). En consecuencia, se elimina el riesgo de entrecruzamiento, los conjugados polipeptídicos resultantes son más homogéneos y la reacción de las moléculas de polímero con el polipéptido es más fácil de controlar.

10 Para efectuar la unión covalente de la o las moléculas de polímero al polipéptido, los grupos terminales hidroxilo de la molécula de polímero se proporcionan en forma activada, es decir, con grupos funcionales reactivos. La PEGilación puede dirigirse hacia la conjugación con todos los grupos de unión disponibles en el polipéptido (es decir, dichos grupos de unión que están expuestos en la superficie del polipéptido) o puede dirigirse hacia uno o más grupos de unión específicos, por ejemplo, el grupo amino N-terminal (Patente de Estados Unidos No. 5,985,265), glicanos ligados a N y/u O, etc. Además, la conjugación se puede lograr en una etapa o de manera gradual (por ejemplo, como se describe en el documento WO 99/55377). Un enfoque enzimático para acoplar grupos/fracciones laterales a glicanos ligados en O y/o N se divulga en el documento WO03031464.

15 Proteína de fusión: las proteínas de fusión/proteínas quiméricas, son proteínas creadas a través de la unión de dos o más genes que originalmente codificaron proteínas separadas. La traducción de este gen de fusión da como resultado un único polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales. La cadena lateral de las variantes de FVIII según la presente invención puede, por lo tanto, estar en forma de un polipéptido fusionado a FVIII. El FVIII de acuerdo con la presente invención puede así fusionarse con péptidos que pueden conferir una vida media prolongada al FVIII tal como, por ejemplo, anticuerpos y "derivados de fusión de Fc" o "proteínas de fusión de Fc".

20 La proteína de fusión Fc en este documento pretende abarcar FVIII fusionado con un dominio Fc que puede derivarse de cualquier isotipo de anticuerpo, aunque a menudo se preferirá un dominio Fc de IgG debido a la vida media circulatoria relativamente larga de los anticuerpos IgG. Además, el dominio Fc puede modificarse para modular ciertas funciones efectoras como, por ejemplo, complemento de unión y/o unión a ciertos receptores Fc. La fusión de FVIII con un dominio Fc, que tiene la capacidad de unirse a los receptores FcRn, generalmente dará como resultado una vida media circulatoria prolongada de la proteína de fusión en comparación con la vida media de la proteína WVIFVI. Las mutaciones en las posiciones 234, 235 y 237 en un dominio Fc de IgG generalmente darán como resultado una unión reducida al receptor FcγRI y posiblemente también a los receptores FcγRIIIa y FcγRIIIb. Estas mutaciones no alteran la unión al receptor FcRn, que promueve una larga vida media circulatoria mediante una vía de reciclaje endocítico. Preferiblemente, un dominio Fc de IgG modificado de una proteína de fusión de acuerdo con la invención comprende una o más de las siguientes mutaciones que darán como resultado una afinidad disminuida a ciertos receptores Fc (L234A, L235E y G237A) y una fijación del complemento mediada por C1q reducida (A330S y P331S), respectivamente.

35 Factor Von Willebrand (vWF): el vWF es una glicoproteína mono/multimérica grande presente en el plasma sanguíneo y producida de forma constitutiva en el endotelio (en los cuerpos de Weibel-Palade), megacariocitos ( $\alpha$ -gránulos de plaquetas) y tejido conectivo subendotelial. Su función principal es la unión a otras proteínas, particularmente el FVIII y es importante en la adhesión de las plaquetas a los sitios de la herida.

40 FVIII está ligado a vWF mientras está inactivo en circulación; El FVIII se degrada rápidamente o se borra cuando no está vinculado a vWF. Por lo tanto, se deduce que la reducción o supresión de la capacidad de unión de vWF en FVIII se consideraría un enfoque altamente indeseable para obtener variantes de FVIII con vida media circulatoria prolongada. Sin embargo, puede ser posible reducir o anular el vWF mediante mutagénesis dirigida al sitio si la molécula se conjuga con una fracción/grupo lateral de vida media protectora.

45 La región en FVIII responsable de la unión a vWF es la región que abarca los residuos 1670-1684 como se describe en el documento EP0319315. Se prevé que los mutantes de eliminación y puntos del FVIII que involucran esta área modificarán la capacidad de unirse a vWF. Los ejemplos de mutaciones puntuales particularmente preferidas de acuerdo con la presente invención incluyen variantes que comprenden una o más de las siguientes mutaciones puntuales: Y1680F, Y1680R, Y1680N-E1682T, y Y1680C.

50 Glicoproteína: el término "glicoproteína" pretende abarcar péptidos, oligopéptidos y polipéptidos que contienen uno o más oligosacáridos (glicanos) unidos a uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la "estructura principal". Los glicanos pueden estar ligados a N o ligados a O.

El término "ácido siálico terminal" o, "ácido neuramínico terminal" intercambiable pretende abarcar los residuos de ácido siálico unidos como el residuo de azúcar terminal en una cadena de glicano u oligosacárido, es decir, el azúcar terminal de cada antena es ácido N-acetilneuramínico unido a galactosa a través de un enlace  $\alpha 2 \rightarrow 3$  o  $\alpha 2 \rightarrow 6$ .

55 El término "galactosa o derivado de la misma" significa un residuo de galactosa, tal como D-galactosa natural o un derivado de la misma, tal como un residuo de N-acetilgalactosamina.

El término “galactosa terminal o derivado de la misma” significa la galactosa o derivado de la misma unido como el residuo de azúcar terminal en una cadena de glicano u oligosacárido, por ejemplo, el azúcar terminal de cada antena es galactosa o N-acetilgalactosamina.

- 5 El término “glicoproteína asialo” pretende incluir glicoproteínas en las que se han eliminado uno o más residuos de ácido siálico terminales, por ejemplo, mediante tratamiento con una sialidasa o por tratamiento químico, exponiendo al menos un residuo de galactosa o N-acetilgalactosamina de la “capa” subyacente de galactosa o N-acetilgalactosamina (“residuo de galactosa expuesto”).

10 En general, los glicanos unidos a N, que no son parte del FVIII de tipo silvestre, pueden introducirse en las moléculas de FVIII de la invención, introduciendo mutaciones de aminoácidos para obtener motivos N-X-S/T. Las moléculas de FVIII de la presente invención contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, o más, glicanos unidos a N. La estructura de los glicanos unidos a N es de forma alta o compleja. Los glicanos de alto contenido de manosa contienen residuos terminales de manosa en el extremo no reductor del glicano. Los N-glicanos complejos contienen ácido siálico terminal, galactosa o N-acetilglucosamina en el extremo no reductor. Los sitios de glicosilación unidos a N pueden insertarse en las variantes de FVIII de acuerdo con la presente invención usando técnicas recombinantes.

15 Sialiltransferasa: las sialiltransferasas son enzimas que transfieren un ácido siálico a un oligosacárido naciente. Cada sialiltransferasa es específica para un sustrato donante de nucleótidos de azúcar particular. Las sialiltransferasas agregan ácido siálico a la galactosa terminal en glicolípidos (gangliósidos), o glicanos de glicoproteínas unidos a N u O. La sialiltransferasa es adecuada para su uso en la conjugación enzimática de grupos/fracciones laterales a glicanos presentes en la molécula de FVIII.

20 Composición farmacéutica. Una composición farmacéutica en este documento significa preferiblemente abarcar composiciones que comprenden moléculas de FVIII de acuerdo con la presente invención adecuadas para administración parenteral, tal como, por ejemplo, Composiciones acuosas estériles listas para usar o composiciones estériles secas que pueden reconstituirse, por ejemplo, agua o un tampón acuoso. Las composiciones de acuerdo con la invención pueden comprender diversos excipientes, estabilizantes, etc. farmacéuticamente aceptables.

25 Los ingredientes adicionales en tales composiciones pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero humano, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido), tales como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, por supuesto, no deberían afectar adversamente a la estabilidad general de la formulación farmacéutica de la presente invención. La administración parenteral se puede realizar mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa similar a una pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión.

35 Las células hospedadoras adecuadas para producir la proteína FVIII recombinante de acuerdo con la invención son preferiblemente de origen mamífero para garantizar que la molécula se procese adecuadamente durante el plegado y la modificación postraduccional, por ejemplo, glicosilación, sulfatación, etc. Al poner en práctica la presente invención, las células son células de mamífero, más preferiblemente una estirpe celular de mamífero establecida, que incluye, sin limitación, estirpes celulares CHO, COS-1, riñón de hámster bebé (BHK) y HEK293. Una célula preferida es la estirpe celular BHK tk-ts13, en lo sucesivo denominada células BHK 570. Una estirpe celular CHO preferida es la estirpe celular CHO K1, así como las estirpes celulares CHO-DXB11 y CHO-DG44. Otras estirpes celulares adecuadas incluyen, sin limitación, Rata Hep I, Rata Hep II, TCMK, NCTC 1469; Células DUKX (estirpe celular CHO) y DG44 (estirpe celular CHO). También son útiles las células 3T3, células Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células. Las células actualmente preferidas son células HEK293, COS, ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de hámster bebé (BHK) y células de mieloma, en particular células de ovario de hámster chino (CHO).

45 El término “tratamiento”, como se usa en este documento, se refiere a la terapia médica de cualquier sujeto humano o animal que lo necesite. Se espera que dicho sujeto haya sido sometido a un examen físico por parte de un médico que haya dado un diagnóstico provisional o definitivo que indicaría que el uso de dicho tratamiento específico es beneficioso para la salud de dicho sujeto humano o animal. El tiempo y el propósito de dicho tratamiento pueden variar de un individuo a otro, de acuerdo con el estado actual de la salud del sujeto. Por lo tanto, dicho tratamiento puede ser profiláctico, paliativo, sintomático y/o curativo.

50 En un primer aspecto, la presente invención se relaciona así con una variante de FVIII recombinante que tiene actividad de FVIII, en el que dicha variante comprende 2-10, sustituciones de residuos de aminoácidos cargados positivamente accesibles en la superficie, por ejemplo Los residuos de lisina y/o arginina, en el pie de C1 y/o el pie de C2 de FVIII, en los que los residuos de aminoácidos cargados accesibles en la superficie están sustituidos con alanina o glutamina, y en el que las sustituciones resultan en una absorción celular reducida de dicha variante FVIII, y en el que dicha variante comprende una sustitución R2215 combinada con una sustitución K2092.

En una realización, la variante de FVIII de acuerdo con la invención comprende además una sustitución K2092A.

En otra realización, la variante de FVIII recombinante de acuerdo con la invención comprende además una sustitución R2215A.

En otra realización, la variante de FVIII de acuerdo con la invención comprende además una sustitución de R2090.

En otra realización, la variante de FVIII de acuerdo con la invención comprende una sustitución de K2065.

En otra realización, la variante de FVIII de acuerdo con la invención comprende una sustitución K2065 combinada con una sustitución de R2215.

- 5 En otra realización, la variante de FVIII según la invención comprende una sustitución K2065 combinada con una sustitución de K2249.

En otra realización, la variante de FVIII de acuerdo con la invención ha disminuido la unión de LRP.

En otra realización, la variante de FVIII de acuerdo con la invención tiene una inmunogenicidad disminuida.

- 10 En otra realización, la variante de FVIII de acuerdo con la invención se conjuga con una fracción que prolonga la vida media.

En otra realización, la variante de FVIII según la invención comprende además la mutación F2093A.

Otro aspecto se refiere a una composición farmacéutica que comprende una variante de FVIII de acuerdo con la invención.

- 15 Un aspecto final se relaciona con el uso de una variante de FVIII de acuerdo con la invención, o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, para uso en el tratamiento de la hemofilia.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Generación de variantes de FVIII

- 20 Se insertó un fragmento que codifica la etiqueta cMyc en el terminal C de la cadena pesada en el constructo de expresión que codifica FVIII con un enlazador de dominio B de 21 aminoácidos (Haemophilia 2010; 16: 349-48). El nivel de expresión y la actividad de este FVIII-cMyc2 fueron similares a los del FVIII sin etiquetar. FVIII-cMyc2 se usó como plantilla para las variantes y como control en los ensayos descritos en el ejemplo 3-5. Se agregaron sitios de restricción adicionales al constructo de expresión FVIII-cMyc2 para facilitar el intercambio de dominios entre variantes. El dominio A1 está flanqueado por Sa/I y PshAI/MfeI, A2 está flanqueado por PshAI/MfeI y AvrII/NruI, A3 está flanqueado por AgeI/MluI y BstZ17I/BstAPI, C1 por BstZ17I/BstAPI y SwaI/SphI y C2 por SwaI/SphI y SfiI. La mutagénesis dirigida de los aminoácidos básicos expuestos (lisina o arginina) fue realizada por Genearth AG (Regensburg, Alemania).

- 25 Los mutantes con afinidad reducida a LRP1 se localizaron especialmente en los pies de los dominios C1 y C2 (ver la Figura 2 y la tabla 1 y 2). Las combinaciones de mutantes C1 y C2 se clonaron transfiriendo fragmentos SphI/SfiI de 520 pb de R2215A, R2220Q, K2249A y R2320Q a los mutantes C1 K2065A, R2090A y K2092A (tabla 2).

- 30 Ejemplo 2: Expresión de los mutantes de FVIII

- La transfección sin suero se realizó utilizando células HKB11 (Cho M-S et al. J Biomed Sci 2002; 9: 631-63) y 293fectin (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células en suspensión HKB11 se cultivaron en medio de expresión comercial Freestyle 293 (Invitrogen # 12338-018) suplementado con 50 U mL<sup>-1</sup> de penicilina y 50 µg mL<sup>-1</sup> de estreptomina. Las células se cultivaron como células en suspensión en agitadores y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. Las células se sembraron a una densidad de 3x10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup> y se pasaron cada 3 a 4 días. Las concentraciones de células viables y totales se evaluaron mediante el análisis de Cedex (Innovatis) utilizando un software de análisis de imágenes para el conteo automático de células. Las células viables se destacaron por su capacidad para excluir el colorante azul de tripano. Las células se recogieron 96 horas después de transfección y el sedimento celular se aisló mediante centrifugación suave. Posteriormente, el sedimento celular se resuspendió en el medio de expresión Freestyle 293 que contenía NaCl 0.5M. Después de una centrifugación suave, los sobrenadantes que contenían FVIII se recolectaron y almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

- 35 Ejemplo 3: FVIII: C medida en ensayo cromogénico

- La actividad de FVIII (FVIII: C) del compuesto rFVIII se evaluó en un ensayo de FVIII cromogénico utilizando reactivos Coatest SP (Chromogenix) de la siguiente manera: muestras de FVIII y un estándar de FVIII (plasma de calibración humano, Chromogenix) se diluyeron en tampón de ensayo Coatest (50 Tris mM, NaCl 150 mM, BSA al 1%, pH 7.3, con conservante). Cincuenta µL de muestras (sobrenadante de cultivo o variantes de FVIII purificadas) diluidas previamente de 100, 400, 1600 y 6400 veces, se añadieron estándares y control de tampón negativo a las placas de microtitulación Spectramax de 96 pozos por duplicado. El reactivo factor IXa/factor X, el reactivo fosfolípido y el CaCl<sub>2</sub> del kit Coatest SP se mezclaron 5:1:3 (vol:vol:vol) y se agregaron 75 µL a los pozos. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 50 µL de la mezcla I-2581 del inhibidor de trombina/S-2765 del sustrato Xa del factor y la reacción se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de agregar 25 µL de ácido cítrico 1 M, pH 3. La absorbancia a 405 nm se midió en un lector de placas Envision (Perkin Elmer) con una

absorbancia a 620 nm utilizada como longitud de onda de referencia. El valor para el control negativo se restó de todas las muestras y se preparó una curva de calibración mediante regresión lineal de los valores de absorbancia de los estándares trazados vs. concentración de FVIII. La actividad específica se calculó dividiendo la actividad de las muestras con la concentración de proteína determinada por ELISA (ejemplo 4). La actividad relativa a la plantilla FVIII-cMyc2 se calculó dividiendo la actividad específica para la variante FVIII con la actividad específica para la plantilla FVIII. Los datos en la tabla 1 demuestran una gran variación en la actividad de FVIII: C entre las diferentes variantes de FVIII. Los datos en la tabla 2 demuestran que la actividad de FVIII: C se mantuvo en las variantes de FVIII seleccionadas.

#### Ejemplo 4: Antígeno total de FVIII medido en ELISA

La cantidad de variantes de FVIII se evaluó en un ELISA de Affinity Biologicals (# F8C-EIA) de la siguiente manera: las placas de microtitulación (Nunc) se recubrieron con 100  $\mu$ L/pozo de anticuerpo de recubrimiento en PBS (fosfato de sodio 0.10 M; NaCl 0.145 M, pH 7.2). Las placas se sellaron y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron 5 veces en tampón de lavado (fosfato sódico 0.01 M, NaCl 0.145 M, Tween 20 al 0.05%, pH 7.2) y se bloquearon en tampón de lavado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron en tampón de ensayo (Hepes 0.1 M; NaCl 0.1 M; BSA 10 g/l; Tween 20 al 0.1%, pH 7.2) y se transfirieron muestras diluidas 10  $\mu$ l (o calibrador/control diluido) a cada pozo. Se añadió anticuerpo de detección (100  $\mu$ L) a la placa y se incubó 1½ horas en un agitador a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se agregaron 100  $\mu$ L de sustrato (sustrato monocomponente TMB, Kem-en-Tec) y se incubaron en un agitador hasta que se desarrolló un color suficiente. La reacción se detuvo agregando 100  $\mu$ L de tampón de parada (4M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). La absorbancia a 450 nm se midió en un lector de placas Envision (PerkinElmer) con una absorbancia a 620 nm utilizada como longitud de onda de referencia.

#### Ejemplo 5: Unión de LRP en ELISA

Las variantes de FVIII se evaluaron adicionalmente para determinar su capacidad para unirse a LRP de la siguiente manera: todas las muestras se diluyeron 40 veces y 80 veces en tampón sin NaCl (Hepes 0.1 M, 10 g/L BSA; Tween 20 al 0.1%, pH 7.2). El estándar (FVIII-cMyc2) se diluyó a 3000; 1000; 333; 111; 37; 12.3; 4.12 y 0 ng/mL. Las placas de microtitulación se recubrieron con LRP (1  $\mu$ g/ml, BioMac, Leipzig, Alemania) en PBS (100  $\mu$ L/pozo) y se sellaron y se incubaron durante al menos 72 horas a 4°C. Las placas se lavaron 5 veces en tampón sin NaCl, y se bloquearon en el tampón durante al menos 15 min. La muestra estándar/diluida (50  $\mu$ L/pozo) y el tampón (150  $\mu$ L/pozo) se agregaron a las placas y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Las placas se lavaron y se agregaron 100  $\mu$ L/pozo de 1  $\mu$ g/ml de anticuerpo anti-FVIII A2 biotinilado (BDD-FVIII-1F5\*biotina, preparado en casa utilizando técnicas estándar) y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en un agitador. Las placas se lavaron 5 veces y 100  $\mu$ L/pozo de Streptavidin\*HRP (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) diluidas 1:20000 en tampón y las placas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en un agitador. Las placas se lavaron 5 veces y se agregaron 100  $\mu$ L/pozo de monosustrato TMB (Kem-en-Tec) y las placas se incubaron en un agitador hasta obtener el color suficiente. La reacción se detuvo con 100  $\mu$ L/pozo de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 4M antes de medir la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Envision (PerkinElmer) con una absorbancia a 620 nm utilizada como longitud de onda de referencia. La unión específica a LRP se calculó dividiendo la unión a LRP de las variantes con la concentración de proteína determinada por ELISA (ejemplo 4). La unión de LRP en relación con la plantilla de FVIII-cMyc2 se calculó dividiendo la unión de LRP específica para las variantes con la unión de LRP específica para la plantilla de FVIII-cMyc2. La Tabla 1 muestra el nivel de expresión, la actividad de FVIII: C y la unión a LRP de las variantes de FVIII donde se mutaron los residuos de lisina o arginina expuestos en la superficie. Para algunas de las variantes de FVIII, la actividad y la unión de LRP no pudieron detectarse debido al bajo nivel de expresión. Estos están marcados "low conc" en la tabla. La mayoría de las variantes de FVIII en las que el nivel de expresión era lo suficientemente alto como para permitir el análisis de la unión de LRP mostró una unión de LRP cercana a la del "plantilla FVIII" de control de FVIII sin sustituciones. Algunas variantes de FVIII, por ejemplo, K523A y K1972Q mostraron una disminución de la unión de LRP concomitante con una reducción de la actividad. Sin embargo, algunas de las variantes de FVIII con sustituciones en el dominio C1 y C2, es decir, K2065A, R2090A, K2092A, R2215A, R2220Q y K2249A habían reducido la unión de LRP (<0.53 con relación al control con FVIII) mientras que la actividad se mantuvo (>0.78 con relación al control con FVIII). Estas mutaciones están ubicadas en el pie C1 y en el pie C2 descritos anteriormente. Cuando se combinó una mutación dentro de esta región del dominio C1 con una mutación del dominio C2 (tabla 2), se observó una reducción adicional de la unión de LRP para las mutaciones dobles donde se incluyó R2215A. También el mutante doble R2090A-K2249A mostró una mayor reducción de la unión de LRP que la observada para las mutaciones únicas. Para algunas de las mutaciones en las que el nivel de expresión fue inferior a  $\approx$ 350 ng/ml, no fue posible analizar la unión de LRP utilizando el ensayo descrito. La unión a LRP de variantes de FVIII purificadas seleccionadas, incluidas las sustituciones de lisina y argina combinadas con F2093A, se analizaron adicionalmente aplicando un rango de concentraciones (hasta 18 nM) en el ensayo, y los valores de K<sub>d</sub> se calcularon mediante regresión no lineal de las curvas de unión usando la ecuación para un enlace total de sitio en Prism versión 5.01 Software. La Tabla 3 muestra el aumento de veces en K<sub>d</sub> en relación con FVIII sin las mutaciones insertadas. Cuanto mayor sea el aumento de veces en K<sub>d</sub>, más se reduce la unión de LRP. Los datos muestran que si dos o más, es decir, hasta cuatro, de los residuos de aminoácidos en el C1 (K2065, R2090, K2092, F2093) y C2 pies (R2215, R2220 y K2249) fueron sustituidos, una reducción sustancial de la unión de LRP fue observado.

Tabla 1. Unión y actividad de los mutantes únicos del FVIII

ES 2 712 575 T3

Variante FVIII	Concentración (ng/ml)	Específico		Relativo a la plantilla	
		LRP (Unión U/ng)	Actividad (mU/ng)	LRP	Actividad
Plantilla FVIII	3433	0.28	14.5	1.00	1.00
R3A	< STD	baja conc.	baja conc.	baja conc.	baja conc.
R4A	332	0.34	5.39	1.22	0.37
R29A	757	0.29	8.24	1.04	0.57
R33A	940	0.27	8.17	0.97	0.56
K36A	802	0.29	8.20	1.02	0.57
K47A	279	0.33	5.96	1.19	0.41
K48Q	30	baja conc.	baja conc.	baja conc.	baja conc.
K63A	548	0.34	9.04	1.22	0.62
R65A	293	0.36	7.33	1.31	0.51
K89Q	476	0.31	7.67	1.11	0.53
K107Q	525	0.10	< STD	0.37	< STD
R121A	317	0.33	6.02	1.17	0.42
K123Q	901	0.14	2.40	0.49	0.17
K127A	925	0.28	8.01	0.99	0.55
K142A	781	0.26	6.49	0.95	0.45
K166A	332	0.32	7.07	1.15	0.49
R180A	422	0.33	5.03	1.19	0.35
K186A	786	0.29	8.05	1.04	0.56
K188A	651	0.29	7.28	1.05	0.50
K194A	770	0.32	8.50	1.15	0.59
K206A	669	0.27	6.44	0.97	0.44
K213A	699	0.27	7.90	0.96	0.55
R220A	629	0.34	7.30	1.21	0.50
R226A	447	0.32	7.71	1.13	0.53
K230A	1069	0.24	5.90	0.88	0.41
R240A	864	0.27	6.61	0.96	0.46
R250A	1252	0.20	5.17	0.71	0.36
K251A	2539	0.16	4.75	0.57	0.33

ES 2 712 575 T3

Variante FVIII	Concentración (ng/ml)	Específico		Relativo a la plantilla	
		LRP (Unión U/ng)	Actividad (mU/ng)	LRP	Actividad
R279A	2237	0.19	3.14	0.67	0.22
R282Q	481	0.11	0.18	0.41	0.01
K325A	895	0.26	7.09	0.94	0.49
R336A	2123	0.21	8.42	0.76	0.58
K338A	1934	0.22	5.37	0.78	0.37
R359A	2410	0.18	6.24	0.63	0.43
R372A	3426	0.14	0.04	0.51	0.00
K376A	1811	0.19	0.14	0.67	0.01
K377A	3369	0.13	2.82	0.46	0.19
K380A	2116	0.18	4.94	0.64	0.34
R405A	3193	0.15	6.19	0.54	0.43
K408A	2165	0.18	9.45	0.64	0.65
R418A	1334	0.23	10.12	0.83	0.70
R421A	1504	0.23	8.53	0.83	0.59
K422A	1735	0.16	6.07	0.57	0.42
K424A	1075	0.14	7.78	0.50	0.54
K425Q	< STD	baja conc.	baja conc.	baja conc.	baja conc.
R427Q	1252	0.21	5.81	0.77	0.40
K437A	1495	0.12	8.20	0.44	0.57
R439A	881	0.30	8.30	1.09	0.57
K466Q	1082	0.20	10.16	0.70	0.70
R471A	284	baja conc.	3.39	baja conc.	0.23
R484A	6037	0.15	5.05	0.54	0.35
R489A	5928	0.18	4.79	0.64	0.33
R490A	3441	0.13	3.90	0.48	0.27
K493A	5584	0.06	4.70	0.20	0.32
K496A	2718	n.d.*	0.08	n.d.*	0.01
K499A	2245	0.25	6.89	0.89	0.48
K510A	3441	0.25	3.11	0.89	0.22
K512A	4527	0.16	4.58	0.58	0.32

ES 2 712 575 T3

Variante FVIII	Concentración (ng/ml)	Específico		Relativo a la plantilla	
		LRP (Unión U/ng)	Actividad (mU/ng)	LRP	Actividad
K523A	10028	0.08	2.33	0.27	0.16
R527A	4806	0.12	5.95	0.42	0.41
R531Q	1946	0.15	0.64	0.53	0.04
R541A	1233	0.16	10.46	0.58	0.72
K556A	2612	0.21	5.35	0.75	0.37
R562A	2361	0.25	11.20	0.91	0.77
K570A	2208	0.34	12.86	1.23	0.89
R571A	2974	0.18	9.00	0.66	0.62
R583A	1959	0.21	8.65	0.75	0.60
R593A	1845	0.12	10.00	0.45	0.69
K659Q	2306	0.26	8.08	0.92	0.56
K661A	1522	0.35	6.71	1.25	0.46
R698A	1602	0.23	6.04	0.82	0.42
R700Q	759	0.38	12.16	1.36	0.84
K707A	2708	0.17	9.46	0.63	0.65
K713A	1934	0.21	9.25	0.75	0.64
R1689A	835	baja conc.	1.68	baja conc.	0.12
K1693A	4298	0.13	6.79	0.45	0.47
K1694A	2929	0.16	7.02	0.56	0.48
R1696Q	1233	0.11	5.64	0.41	0.39
R1705A	231	baja conc.	4.87	baja conc.	0.34
R1719A	2321	0.13	8.61	0.45	0.59
R1721A	2051	0.20	7.93	0.70	0.55
K1731A	60	baja conc.	baja conc.	baja conc.	baja conc.
K1732Q	< STD	baja conc.	baja conc.	baja conc.	baja conc.
R1749Q	1879	0.11	4.87	0.39	0.34
R1764Q	582	0.26	8.09	0.92	0.56
R1776A	1415	0.16	9.16	0.59	0.63
R1781Q	644	0.10	16.11	0.36	1.11

ES 2 712 575 T3

Variante FVIII	Concentración (ng/ml)	Específico		Relativo a la plantilla	
		LRP (Unión U/ng)	Actividad (mU/ng)	LRP	Actividad
R1797A	1748	0.23	13.06	0.81	0.90
R1803A	1867	0.18	5.98	0.65	0.41
K1804Q	2974	0.15	6.74	0.55	0.47
K1808A	2269	0.17	13.74	0.63	0.95
K1813A	2341	0.16	13.20	0.56	0.91
K1818A	1557	0.28	14.10	1.00	0.97
K1827A	2949	0.14	8.93	0.49	0.62
K1833Q	390	baja conc.	0.09	baja conc.	0.01
K1845A	1063	0.22	11.11	0.79	0.77
R1869A	741	0.14	7.18	0.49	0.50
K1887A	665	0.19	13.64	0.68	0.94
R1897A	1809	0.15	10.89	0.54	0.75
R1900A	1675	0.17	11.24	0.62	0.78
K1913A	1493	0.21	8.28	0.75	0.57
R1917A	866	0.16	5.34	0.59	0.37
R1939A	980	0.17	10.46	0.61	0.72
R1941Q	348	baja conc.	1.23	baja conc.	0.08
R1966Q	692	0.15	3.21	0.52	0.22
K1967A	1462	0.16	7.00	0.59	0.48
K1968A	585	0.17	15.72	0.62	1.09
K1972Q	1804	0.07	1.51	0.27	0.10
K1992A	1394	0.13	4.50	0.46	0.31
R1997Q	75	baja conc.	baja conc.	baja conc.	baja conc.
K2020A	171	baja conc.	9.48	baja conc.	0.65
R2033A	1399	0.25	12.62	0.91	0.87
K2049A	1063	0.17	13.80	0.62	0.95
R2052A	171	0.49	7.94	1.75	0.55
K2065A	1581	0.14	11.68	0.49	0.81
K2072A	1354	0.16	9.08	0.58	0.63

ES 2 712 575 T3

Variante FVIII	Concentración (ng/ml)	Específico		Relativo a la plantilla	
		LRP (Unión U/ng)	Actividad (mU/ng)	LRP	Actividad
K2085A	1765	0.14	11.20	0.50	0.77
R2090A	1832	0.10	16.24	0.35	1.12
K2092A	1056	0.14	12.54	0.51	0.87
K2110A	1424	0.26	13.93	0.92	0.96
K2111A	1378	0.16	8.65	0.58	0.60
R2116Q	1776	0.20	11.52	0.71	0.80
K2136A	1436	0.17	10.81	0.63	0.75
R2147A	245	baja conc.	6.67	baja conc.	0.46
R2150Q	896	0.23	7.36	0.84	0.51
R2159A	1095	0.15	6.40	0.54	0.44
R2163Q	483	baja conc.	8.61	baja conc.	0.59
K2183A	1175	0.13	11.81	0.48	0.82
K2207A	87	baja conc.	baja conc.	baja conc.	baja conc.
R2209Q	78	baja conc.	baja conc.	baja conc.	baja conc.
R2215A	1480	0.15	13.72	0.53	0.95
R2220Q	589	0.09	13.46	0.33	0.93
K2227A	1781	0.23	10.21	0.82	0.71
K2236A	789	0.22	11.90	0.79	0.82
K2239Q	1172	0.14	8.56	0.51	0.59
K2249A	1832	0.13	11.28	0.45	0.78
K2258A	1069	0.32	14.63	1.14	1.01
K2279A	371	baja conc.	16.34	baja conc.	1.13
K2281A	1069	0.16	15.86	0.58	1.10
R2304A	173	baja conc.	6.79	baja conc.	0.47
R2307Q	135	baja conc.	3.63	baja conc.	0.25
R2320Q	576	0.09	12.89	0.34	0.89

\*) n.d. representa datos no detectables, ya que K496 se incluye en el epítipo del anticuerpo anti FVIII A2 de detección biotinilada BDD-FVIII-1F5\*biotina (ejemplo 5). Por lo tanto, la unión de LRP no se puede detectar para K496A en el ensayo utilizado.

Tabla 2. Mutantes individuales y dobles del FVIII seleccionados con unión LRP reducida

ES 2 712 575 T3

Variante FVIII	Concentración (ng/ml)	Específico		Relativo a la plantilla	
		LRP (Unión U/ng)	Actividad (mU/ng)	LRP	Actividad
Plantilla FVIII	2017	0.51	6.56	1.00	1.00
K2065A	2024	0.29	7.44	0.57	1.13
R2090A	1333	0.30	9.37	0.58	1.43
K2092A	1720	0.32	7.87	0.62	1.20
R2215A	1872	0.16	8.67	0.32	1.32
R2220Q	326	baja conc.	10.72	baja conc.	1.63
K2249A	1984	0.33	6.20	0.64	0.95
R2320Q	386	0.39	9.55	0.77	1.46
K2065A-R2215A	1842	0.11	6.75	0.22	1.03
R2090A-R2215A	917	<límite de detec. (0.13)	11.94	<límite de detec. (0.26)	1.82
K2092A-R2215A	1997	<límite de detec. (0.06)	8.32	<límite de detec. (0.12)	1.27
K2065A-R2220Q	292	baja conc.	10.89	baja conc.	1.66
R2090A-R2220Q	97	baja conc.	13.42	baja conc.	2.05
K2092A-R2220Q	275	baja conc.	9.80	baja conc.	1.49
K2065A-K2249A	1531	0.31	7.17	0.60	1.09
R2090A-K2249A	838	0.15	11.09	0.29	1.69
K2092A-K2249A	833	0.24	7.39	0.47	1.13
K2065A-R2320Q	< STD	baja conc.	baja conc.	baja conc.	baja conc.
R2090A-R2320Q	113	baja conc.	15.24	baja conc.	2.32
K2092A-R2320Q	270	baja conc.	10.13	baja conc.	1.54

Tabla 3. Unión a LRP relativa a FVIII tipo silvestre determinada por titulaciones en ELISA

Variante FVIII	Unión LRP ( $K_d$ relativa a aquel de FVIII tipo silvestre)
K2065A-R2215A	2.45
K2092A-R2215A	3.34
K2092A-F2093A	2.89
K2065A-K2092A-F2093A-R2215A	> 20

## Ejemplo 6: Estudios de unión de LRP por análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR)

El análisis de SPR se realizó empleando un sistema biosensor BIAcore™ 3000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). El LRP de longitud completa (BioMac, Leipzig, Alemania) se acopló covalentemente (10 fmol/mm<sup>2</sup>) a la superficie de dextrano de un chip de sensor CM5 activado a través de grupos amino primarios, utilizando el kit de acoplamiento de amina según lo prescrito por el proveedor. Los derivados de FVIII FVIII-YFP, FVIII-YFP-K2092A, FVIII-YFP-F2093A y FVIII-YFP-K2092A-F2093A se construyeron y expresaron como se describe (Blood 2009; 114: 3938-3945), excepto que el anticuerpo anti-FVIII CLB-CAG 117 fue reemplazado por el fragmento de anticuerpo de cadena simple VK34 (Blood 2000; 96: 540-545) que se construyó en el anticuerpo monoclonal IgG de longitud completa VK34 como se describe (Br J Haematol 2008; 142: 644-652). El FVIII se cargó en la columna VK34 Sepharose en imidazol 50 mM (pH 6.7), CaCl<sub>2</sub> 50 mM, NaCl 0.8 M. Después de cargar, la columna se lavó posteriormente con imidazol 50 mM (pH 6.7), CaCl<sub>2</sub> 50 mM, NaCl 0.8 M e imidazol 50 mM (pH 6.4), CaCl<sub>2</sub> 40 mM, tampón de etilenglicol al 5% (v/v). A continuación, el FVIII se eluyó de la columna de VK34 Sepharose en imidazol 50 mM (pH 6.4), CaCl<sub>2</sub> 40 mM, etilenglicol al 55% (v/v). Las fracciones que contenían FVIII se diluyeron en Tris 50 mM (pH 8.0), NaCl 100 mM, glicerol al 10% (v/v) de CaCl<sub>0</sub> 5 mM y se absorbieron a Q Sepharose FF (Amersham Biosciences, Bélgica). Posteriormente, la columna de Q Sepharose se lavó con Tris 50 mM (pH 8.0), NaCl 100 mM, CaCl<sub>0</sub> 5 mM 10% (v/v) glicerol. El FVII se eluyó de la columna Q Sepharose en Tris 50 mM (pH 7.4), CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 0.8 M, 50% (v/v) de glicerol y se almacenó a -20°C. Las variantes de FVIII purificadas mantuvieron la actividad completa según lo evaluado por la relación de 0.92-1.03 entre la actividad (método de prueba FVIII Coatest, Chromogenix, Milán, Italia) y el antígeno (ELISA FVIII, ver Blood 2009; 114: 3938-3945). Los derivados de FVIII (60 nM) se pasaron sobre LRP inmovilizado, y la respuesta de unión en unidades de resonancia (RU), corregida por la unión no específica, se registró durante 360 segundos de asociación. La Tabla 4 muestra que la unión de LRP de FVIII-K2092A disminuyó aproximadamente 100 RU en comparación con FVIII-YFP sin sustituciones, mientras que la unión de FVIII-F2093A se redujo solo ligeramente (17 RU). Sin embargo, al combinar las dos sustituciones en el pie C1 se observó una disminución sustancial en la unión de LRP (aproximadamente 200 RU).

Tabla 4. Unión LRP de FVIII-YFP y variantes medidas por SPR

Variante FVIII	Respuesta de unión a 360 segundos (RU)
FVIII-YFP	320
FVIII-YFP-K2092A	219
FVIII-YFP-F2093A	303
FVIII-YFP-K2092A-F2093A	116

## Ejemplo 7: Unión LRP de variante de cadena ligera de FVIII

Las mutaciones puntuales K2065R, K2065A, K2092R y K2092A y las mutaciones dobles K2065R-K2092R y K2065A-K2092A se introdujeron en la cadena ligera del FVIII mediante Quick Change Mutagenesis™ (Stratagene, La Jolla, California, EE. UU.) Utilizando cebadores apropiados según lo indica el artículo. La transfección sin suero de las variantes de la cadena ligera del FVIII se realizó utilizando células FreeStyle™ 293-F (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU., No. R790-07) y 293fectin (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células en suspensión FreeStyle™ 293-F se cultivaron en un Medio de Expresión comercial Freestyle 293 (Invitrogen # 12338-018). Las células se cultivaron como células en suspensión en agitadores y se incubaron a 37°C con 8% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. Las células se sembraron a una densidad de 3x10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup> y se pasaron cada 3 a 4 días. Las células se recogieron 120 horas después de la transfección y el sedimento celular se aisló mediante centrifugación suave. Posteriormente, el sedimento celular se resuspendió en el medio de expresión Freestyle 293 que contenía NaCl 0.55 M. Después de una centrifugación suave, la cadena ligera de FVIII que contenía los sobrenadantes se recogió y almacenó a -20°C hasta su posterior análisis. El grupo II de LRP se expresó en células de riñón de hámster bebé (BHK) y se purificó como se describe (J Biol Chem. 2003; 278:9370-7). La asociación y la disociación de Grupo II LRP a las variantes de la cadena ligera de FVIII K2065A, K2092A, K2065A-K2092A, K2065R, K2092R y K2065R-K2092R se evaluaron mediante un análisis de SPR utilizando un biosensor BIAcore 3000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). El anticuerpo anti-C2 CLB-EL14 IgG4 (Br J Haematol 2008; 142: 644-652) se inmovilizó en un chip sensor CM5 a una densidad de 27 fmol/mm<sup>2</sup> utilizando el método de acoplamiento de amina según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las variantes de cadena ligera de FVIII K2065A, K2092A, K2065A-K2092A, K2065R, K2092R y K2065R-K2092R se unieron al anticuerpo anti-C2 a una densidad de 17 fmol/mm<sup>2</sup>. Se pasaron concentraciones variables (0.2-200 nM) de grupo II LRP sobre las variantes de cadena ligera de FVIII K2065A, K2092A, K2065A-K2092A, K2065R, K2092R y K2065R-K2092R en un tampón que contiene 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.005% (v/v) Tween 20 y 20 mM Hepes (pH 7.4) a 25°C con un caudal de 20 µl/min. La superficie del chip

sensor se regeneró tres veces después de cada concentración de grupo LRP II usando el mismo tampón que contenía NaCl 1M. La unión a las variantes de la cadena ligera de FVIII K2065A, K2092A, K2065A-K2092A, K2065R, K2092R y K2065R-K2092R se registró durante 240 segundos de asociación y se corrigió para determinar la unión no específica. Los datos de unión durante la fase de asociación se ajustaron en un modelo de asociación exponencial de una fase. Las respuestas en el equilibrio se representaron en función de la concentración de Grupo II LRP. Las respuestas en equilibrio se ajustaron mediante regresión no lineal utilizando una hipérbola estándar para obtener valores  $K_D$  (software GraphPad Prism 4, San Diego, California, EE. UU.). La Tabla 5 muestra que la unión del Grupo II LRP a la variante de la cadena ligera del FVIII que porta dos reemplazos de lisina en el dominio C1 en las posiciones K2065 y K2092 está más deteriorada que una variante de la cadena ligera del FVIII que porta un reemplazo de la lisina en el dominio C1 en la posición K2065 o K2092.

Tabla 5. Afinidad de las variantes C1 de la cadena ligera de FVIII para el grupo II de LRP medido por SPR.

Variante de cadena ligera de FVIII	$K_D$ para unión Grupo II LRP (nM)
wt FVIII	33 ± 2
K2065R	78 ± 6
K2092R	45 ± 4
K2065R-K2092R	95 ± 8
K2065A	84 ± 7
K2092A	46 ± 4
K2065A-K2092A	248 ± 16

Ejemplo 8: Absorción celular de FVIII

Una variedad de células está expresando LRP y receptores endocíticos relacionados. Estas incluyen las células de la estirpe celular de glioblastoma humano U87 MG que se sabe que expresan altos niveles de LRP (Cancer Res 2000; 60: 2300-2303). Estas células son particularmente útiles para estudiar la absorción celular mediada por LRP de ligandos de unión de LRP tales como FVIII. Las células U87 MG se obtuvieron de ATCC (HTB-14). Las células se cultivaron en placas de 24 pozos durante 48 horas en EMEM complementado con un 10% de FCS inactivado por calor a 37°C en un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se lavaron con un tampón que contenía HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 135 mM, KCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM MgSO<sub>4</sub> 2 mM y se incubaron durante 15 minutos a 37°C con FVIII-YFP 40 nM, FVIII-YFP K2092A, FVIII-YFP-F2093A y FVIII-YFP-K2092A-F2093A (variantes preparadas como se describe en el ejemplo 6). Posteriormente, las células se lavaron respectivamente con el mismo tampón HEPES y TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM). Las células se recogieron empleando tripsina, se neutralizaron con EMEM complementado con FCS inactivado por calor al 10%, se lavaron con TBS y se resuspendieron en TBS + BSA al 0.5% (p/v). La absorción de FVIII se determinó mediante análisis de citometría de flujo. Para los estudios de unión celular, las células se incubaron durante 15 minutos a 4°C con HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 135 mM, KCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM MgSO<sub>4</sub> 2 mM. A continuación, las células se incubaron durante 45 minutos a 4°C con FVIII-YFP 40 nM, FVIII-YFP-K2092A, FVIII-YFP-F2093A y FVIII-YFP-K2092A-F2093A. Las células se lavaron posteriormente con TBS en hielo y luego con TBS en hielo que contenía BSA al 0.5% (p/v). Las células se rasparon y se resuspendieron en TBS + BSA al 0.5% (p/v). La unión y absorción de FVIII se midió utilizando un clasificador de células activadas por fluorescencia (citómetro de flujo Becton Dickinson LSR II). El ruido se redujo durante el análisis al eliminar eventos con valores de dispersión frontal y lateral diferentes de los característicos de las células U87MG. Los datos de citometría de flujo se recopilaron utilizando FacsDiva versión 5.0.3 (Becton Dickinson) y se descargaron en el programa FlowJo para su análisis. La Tabla ± muestra la intensidad de fluorescencia media de las células U87 MG en presencia de FVIII-YFP-K2092A, FVIII-YFP-F2093A y FVIII-YFP-K2092A-F2093A a 4°C (unión celular) y a 37°C (absorción celular). Los datos muestran que la unión celular y la absorción de FVIII-YFP-K2092A, FVIII-YFP-F2093A y FVIII-YFP-K2092A-F2093A mediante células que expresan LRP se redujeron en comparación con FVIII-YFP sin mutaciones.

Tabla 6. Unión y absorción de FVIII-YFP y variantes del mismo por células que expresan LRP

Variante FVIII	FVIII-YFP (intensidad media de fluorescencia)	
	Unión (4°C)	Absorción (37°C)

	FVIII-YFP (intensidad media de fluorescencia)	
FVIII-YFP	11750	5900
FVIII-YFP-K2092A	6500	1230
FVIII-YFP-F2093A	4960	1350
FVIII-YFP-K2092A-F2093A	4750	1310

Ejemplo 9: Actividad específica mantenida de mutantes de FVIII C1 dobles y triples

5 Las variantes de FVIII FVIII-R2090A, FVIII-K2092A-F2093A y FVIII-R2090A-K2092A-F2093A se prepararon como se describe en el ejemplo 6. La actividad de FVIII se midió en un ensayo de FVIII cromogénico como se describe en el ejemplo 6. Las concentraciones de proteína se midieron utilizando el método de Bradford (Anal Biochem 1976; 72: 248-254). Las propiedades de las proteínas purificadas se enumeran en la Tabla 7. La actividad específica se calculó dividiendo la actividad con la concentración de proteína o el antígeno. FVIII con las mutaciones K2092A-F2093A y R2090A-K2092A-F2093A mantuvo la actividad.

Tabla 7. Actividad de FVIII-K2092A-F2093A y FVIII-R2090A-K2092A-F2093A.

Variante FVIII	Proteína (mg/ml)	Actividad FVIII (IU/ml)	Actividad específica (IU/mg)
wt FVIII	3070	19338	6.3
FVIII-K2092A-F2093A	4546	43917	9.7
FVIII-R2090A-K2092A-F2093A	4853	40194	8.3

10

Ejemplo 10: Absorción celular del mutante FVIII C1 doble y triple

15 Se analizaron las endocitosis de los mutantes FVIII-K2092A-F2093A y FVIII-R2090A-K2092A-F2093A sin el compañero de fusión YFP (proteína de fluorescencia amarilla) en células U87MG (ver ejemplo 8). Las células se incubaron durante 15 minutos a 37°C con HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 135 mM, KCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM. A continuación, las células se incubaron durante 45 minutos con diferentes cantidades de FVIII de tipo silvestre, FVIII-K2092A-F2093A o FVIII-R2090A-K2092A-F2093A. Las células se lavaron posteriormente con TBS enfriado con hielo (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM), se rasparon, se resuspendieron en TBS enfriado con hielo y se lavaron una vez con TBS enfriado con hielo. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído libre de metanol ultrapuro recién disuelto al 1% (Polysciences, Eppenheim, Alemania) y se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-FVIII CLB-CAG117 conjugado con FITC en presencia de 0.05% de saponina en TBS que contiene 0.5% de HSA. Las intensidades medias de fluorescencia se determinaron mediante citometría de flujo utilizando LSRII (BD Biosciences, Uppsala, Suecia). Los resultados se resumen en la Tabla 8. El FVIII es endocitado de manera dependiente de la dosis por las células U87MG. La absorción de FVIII-K2092A-F2093A se vio gravemente afectada. La evaluación de la absorción de FVIII-R2090A-K2092A-F2093A reveló que la absorción de esta variante fue aún más reducida en comparación con la de FVIII-K2092A-F2093A. Estos resultados muestran que el reemplazo de R2090, K2092 y F2093 dio como resultado una molécula de FVIII con una absorción reducida en las células que expresan LRP.

25

Tabla 8. Absorción de FVIII-K2092A-F2093A y FVIII- R2090A-K2092A-F2093A en células U87MG

Variante FVIII	Absorción FVIII en las concentraciones indicadas añadidas (intensidad de fluorescencia) <sup>1</sup>				
	5 nM	10 nM	20 nM	40 nM	80 nM
wt FVIII	2042	4230	6187	10390	13724
FVIII-K2092A/F2093A	1944	2715	4070	4745	9048

FVIII-R2090A-K2092A-F2093A	1558	1629	1953	3804	3859
1) La intensidad media de fluorescencia obtenida en ausencia de FVIII fue de 737.					

## Ejemplo 11: Absorción celular de mutantes dobles FVIII C1 y C2

Se sembraron placas de 24 pozos recubiertas con colágeno (Blood 2002; 99: 457-462) con células U87MG en DMEM-F12 suplementado con FCS al 10% inactivado por calor a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se cultivaron hasta la confluencia, se lavaron con un tampón que contenía HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 135 mM, KCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM MgSO<sub>4</sub> 2 mM y se incubaron durante 30 minutos a 37°C con FVIII 40 nM. K2065A, FVIII-K2249A, FVIII-K2065A-K2249A, FVIII-K2092A, FVIII-R2215A, o FVIII-K2092A-R2215A (ver ejemplos 1 y 2). Las células se recogieron mediante raspado en TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM) suplementado con BSA al 0.5%. Las células se resuspendieron y se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en un 0.4% de paraformaldehído libre de metanol ultrapuro (Polysciences, Eppelheim, Alemania). Las células fijas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-cMyc de ratón 9E10 (Sigma, M4439) que se diluyó 500 veces en TBS, BSA al 1%, saponina al 0.3%. Las células se lavaron con TBS, BSA al 0.5% y luego se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Anti-ratón de cabra Alexa Flo 488 (Invitrogen, A-11001) que se diluyó 200 veces en TBS, BSA al 1%, 0.3% de saponina. Las células se lavaron y se resuspendieron en TBS, BSA al 0.5% y se analizaron empleando un clasificador de células activadas por fluorescencia (citómetro de flujo Becton Dickinson LSR II) como se describe en el ejemplo 8. La tabla 9 muestra la intensidad media de fluorescencia de las células. Las sustituciones individuales muestran una absorción reducida en comparación con WT FVIII. Sin embargo, el defecto más fuerte en la absorción celular se observa para las variantes que llevan una sustitución tanto en el dominio C1 como en el C2.

Tabla 9. Absorción celular de variantes de FVIII (40 nM) con sustituciones en el dominio C1 y/o el dominio C2.

Variante FVIII	Absorción de variante FVIII relativa a wt FVIII (%)
wt FVIII	100
FVIII-K2092A	65
FVIII-K2065A	75
FVIII-R2215A	77
FVIII-K2249A	57
FVIII-K2065A-K2249A	29
FVIII-K2092A-R2215A	41
FVIII-K2065A-R2215A	48

## Ejemplo 12: Absorción celular de FVIII por las células dendríticas

Las células dendríticas median la absorción de FVIII ante la presentación al sistema inmunitario y potencialmente provocan una respuesta inmunitaria (Blood 2007; 109: 610-612, J Thromb Haemost 2009; 7: 1816-1823). Las células dendríticas expresan LRP, así como otros receptores endocíticos. La absorción celular de variantes de FVIII se investigó más a fondo utilizando células dendríticas derivadas de monocitos humanos, macrófagos derivados de monocitos humanos y células dendríticas derivadas de médula ósea murina. Se aislaron monocitos de células mononucleares de sangre periférica a partir de muestras de aféresis usando microperlas CD14, un separador de células magnético y un sistema de separación de células Elutra™ como se describió anteriormente (Vaccine 2007; 25: 7145-52). Los monocitos se diferenciaron en células dendríticas en medio CellGro DC suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 1000 U/ml de GM-CSF humano recombinante y 800 U/ml de IL-4 humana recombinante. Después de 4-6 días de cultivo celular, se evaluó el fenotipo inmaduro de las células determinando los marcadores de superficie celular CD14, CD80, CD83 y CD86. Para controlar la absorción de variantes de FVIII mediante citometría de flujo, se lavaron primero una vez con 2 x 10<sup>5</sup> de DC inmaduras una vez con medio sin suero y se incubaron con FVIII en 120 µl de medio Cell-Gro DC sin suero durante 30 minutos a 37°C. Después de la absorción de FVIII, las células se lavaron con TBS enfriado con hielo, se fijaron con paraformaldehído recién preparado al 1% y se incubaron con anticuerpo anti-FVIII monoclonal conjugado con FITC CLB-CAg117 en presencia o ausencia de

saponina 0.05% en TBS que contenía 0.5% de albúmina de suero humano. Las intensidades medias de fluorescencia y el porcentaje de células positivas se determinaron mediante citometría de flujo utilizando LSRII (BD Biosciences, Uppsala, Suecia). Los resultados de los experimentos de absorción que emplean FVIII de tipo silvestre purificado, FVIII-K2092A-F2093A y FVIII-R2090A-K2092A-F2093A se muestran en la Tabla 10. Los resultados muestran una absorción dependiente de la dosis de FVIII de tipo silvestre por células dendríticas humanas. La variante FVIII-K2092A-F2093A muestra una absorción fuertemente reducida por las células dendríticas, mientras que FVIII-R2090A-K2092A-F2093A revela una disminución aún más pronunciada en su absorción por las células dendríticas. Estos resultados muestran que el reemplazo de R2090, K2092 y F2093 reduce considerablemente la absorción de FVIII por las células dendríticas.

10 Tabla 10. Absorción de la absorción de FVIII, FVIII-K2092A-F2093A y FVIII-R2090A- K2092A-F2093A en células dendríticas derivadas de monocitos humanos.

Variante FVIII	Absorción FVIII en la concentración indicada añadida (intensidad de fluorescencia) <sup>1</sup>		
	10 nM	20 nM	40 nM
wt FVIII	10950	15550	24550
FVIII-K2092A-F2093A	5912	7448	10800
FVIII-R2090A-K2092A-F2093A	3308	4074	5905

<sup>1</sup>) La intensidad media de fluorescencia obtenida en ausencia de FVIII fue 1635.

Ejemplo 13: Absorción celular de FVIII en macrófagos

Los macrófagos también pueden absorber FVIII en hígado y bazo y presentar FVIII al sistema inmunitario (Blood 2008; 112: 1704-1712, J Thromb Haemost 2009; 7: 1816-1823) y, por lo tanto, la absorción de las variantes del FVIII se evaluó posteriormente utilizando macrófagos derivados de monocitos humanos. Los monocitos se aislaron como se describe en el ejemplo 10 y se diferenciaron en macrófagos incubando durante 5 días en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 50 ng/ml de M-CSF humano recombinante. Para controlar la absorción de variantes de FVIII mediante citometría de flujo, se lavaron primero  $2 \times 10^5$  de macrófagos una vez con medio sin suero y se incubaron con FVIII 15 nM en 120 µl de medio CellGro DC sin suero durante 30 minutos a 37°C. Después de la absorción de FVIII, las células se lavaron con TBS enfriado con hielo, se fijaron con paraformaldehído recién preparado al 1% y se incubaron con anticuerpo anti-FVIII monoclonal conjugado con FITC CLB-CAG117 en presencia o ausencia de saponina 0.05% en TBS que contiene 0.5% de albúmina de suero humano. Las intensidades medias de fluorescencia y el porcentaje de células positivas se determinaron mediante citometría de flujo utilizando LSRII (BD Biosciences, Uppsala, Suecia). Los resultados de los experimentos de absorción que emplean FVIII de tipo silvestre, FVIII-R2090A, FVIII-K2092A-F2093A y FVIII-R2090A-K2092A-F2093A se muestran en la Tabla 11. Los resultados revelan que la absorción de FVIII-R2090A se reduce ligeramente, mientras que se observa una fuerte disminución en la absorción de FVIII-K2092A-F2093A. Se observa una reducción aún más pronunciada en la absorción para FVIII-R2090A-K2092A-F2093A. Estos resultados muestran que la sustitución de R2090, K2092 y F2093 reduce la absorción de FVIII también por los macrófagos.

Tabla 11. Absorción de la absorción de FVIII, FVIII-K2092A-F2093A, y FVIII-R2090A-K2092A-F2093A (15 nM) en macrófagos derivados de monocitos humanos.

Variante FVIII	Absorción FVIII en la concentración indicada añadida (intensidad de fluorescencia) <sup>1</sup>
Control (sin FVIII añadido)	3900 ± 114
wt FVIII	13965 ± 555
FVIII-R2090A	9642 ± 1440
FVIII-K2092A-F2093A	7937 ± 118

Variante FVIII	Absorción FVIII en la concentración indicada añadida (intensidad de fluorescencia) <sup>1</sup>
FVIII-R2090A-K2092A-F2093A	5773 ± 103
<sup>1</sup> ) Los valores son DE y media de al menos 3 experimentos.	

## Ejemplo 14: Absorción celular de FVIII por células dendríticas derivadas de médula ósea murina

Posteriormente, las variantes de absorción de FVIII se abordaron utilizando células dendríticas derivadas de la médula ósea murina. Las células de la médula ósea se aislaron enjuagando los fémures de ratones E17 KO hemofílicos con PBS suplementado con 2% de FCS. La suspensión de médula ósea se incubó en Tris-NH<sub>4</sub>Cl a temperatura ambiente durante 2 minutos para lisar eritrocitos. Finalmente, las células se resuspendieron a 1x10<sup>6</sup> células/ml que contenían 20 ng/ml de GM-CSF recombinante de ratón y se cultivaron durante 7-9 días en medio RPMI 1640 suplementado con HEPES 2.5 mM, 2-mercaptoetanol 55 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, glutamina 5 mM y FCS al 10%. La expresión de CD11c, CD11b, CD80, CD86 y Gr-1 se midió en el día 7-9. La absorción de FVIII se estudió como se describió anteriormente para células dendríticas y macrófagos derivados de monocitos humanos. Los resultados de los experimentos de absorción de FVIII se presentan en la Tabla 12. Los resultados muestran que el FVIII-R2090A se endocita a un nivel ligeramente reducido en comparación con el FVIII de tipo silvestre, mientras que la endocitosis del FVIII-K2092A-F2093A está más gravemente dañada. La endocitosis de FVIII-R2090A-K2092A-F2093A está más severamente dañada en comparación con FVIII-K2092A-F2093A. Estos resultados muestran que el reemplazo de R2090, K2092 y F2093 reduce la absorción de FVIII también por células dendríticas derivadas de la médula ósea murina.

Tabla 12. Absorción de wt FVIII, FVIII-R2090A, FVIII-K2092A- F2093A, y FVIII-R2090A-K2092A-F2093A (15 nM) en células dendríticas derivadas de médula ósea de murino.

Variante FVIII	Absorción de FVII (intensidad de fluorescencia) <sup>1</sup>
Control (son FVIII añadida)	1968 ± 235
wt FVIII	8661 ± 206
FVIII-R2090A	7907 ± 305
FVIII-K2092A-F2093A	5099 ± 275
FVIII-R2090A-K2092A-F2093A	3389 ± 93
<sup>1</sup> ) Los valores son DE y media de al menos 3 experimentos.	

En general, los hallazgos reportados en los ejemplos 8 y 10-14 enseñan cómo definir los residuos que contribuyen a las superficies interactivas en FVIII que median su endocitosis por una variedad de células que expresan LRP, incluyendo células dendríticas humanas y macrófagos, así como células dendríticas murinas.

## Ejemplo 15: Anti FVIII C1 y C2 anticuerpos que bloquean la absorción celular de FVIII

Como un enfoque alternativo para definir los residuos que contribuyen a la absorción celular de FVIII, se aplicó un panel de anticuerpos con epítopos dentro de todos los dominios de FVIII en estudios de unión de células de FVIII que emplean células U87MG (ver ejemplo 8), hepatocitos primarios de rata y macrófagos derivados de monocitos humanos. Los anticuerpos ESH-2, ESH-4, ESH-5 y ESH-8 (Thromb Haemost 1986; 55: 40-46) están disponibles comercialmente en American Diagnostica. KM33 se describe en J Biol Chem 2003; 278: 9370-9377 y WO 03/093313. CLB-CAg117 se describe en Blood 1998; 91: 2347-2352. Los anticuerpos restantes se prepararon en casa después de la inmunización de ratones con FVIII utilizando técnicas estándar para la preparación de anticuerpos monoclonales. Se utilizaron hepatocitos primarios de ratas recién aislados, preparados en casa o adquiridos de Biopredic International (Rennes, Francia). Brevemente, se abrieron ratas Sprague Dawley anestesiadas y se canalizó la vena porta mientras se ataba la vena cava y luego se cortaba después del comienzo de la perfusión con tampón Hepes (25 mM hepes, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.38 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.35 mM, KCl 2.31 mM, 0.3 K M NaCl 22 mM de glucosa, pH 7.4). El tejido se digirió con 120 mg de colagenasa (Sigma C-5138) en tampón hepes y posteriormente se enjuagó con CaCl<sub>2</sub> 5 mM en tampón Hepes. La cápsula de tejido alrededor del hígado se desprendió para liberar las células en el tampón de lavado (D-

MEM/F12 con L-glutamina y 15 mM hepes (Gibco) suplementado con BSA al 1% y hemisuccinato de hidrocortisona 0.1 mM (Sigma) e insulina 1 nM (Sigma)). Las células se centrifugaron a 50 x g y se desechó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en medio E de William (Biopredic International, Rennes, Francia) suplementado con L-glutamina 2 mM, 100 UI/mL de insulina, 100 µg/mL de estreptomycin y hemisuccinato de hidrocortisona 5 µM. Los hepatocitos se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 24 pozos a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células/pozo durante un total de 48 h. Los monocitos se aislaron mediante separación magnética utilizando perlas magnéticas anti-CD14 (Miltenyi) y una columna MACS (Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los monocitos ( $0.5 \times 10^6$  células/ml) se sembraron en matraces de cultivo de tejidos T-75 y se añadieron 3.3 ng/ml de M-CSF (R&D Systems). Se agregaron 3.3 ng/ml adicionales de M-CSF después de tres días de cultivo celular. Después de seis días, los macrófagos se lavaron con PBS y se incubaron 10-20 min a 4°C con EDTA 2.5 mM en PBS con 5% de FCS. Las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 48 pozos a una densidad de  $3.5 \times 10^5$  células/pozo y se incubaron durante la noche. Las células U87 y los macrófagos se lavaron cuidadosamente con tampón A (HEPES 100 mM, NaCl 150 mM, 4 KCl, glucosa 11 mM, pH 7.4) y se incubaron durante 15 min con tampón B (tampón A complementado con  $\text{CaCl}_2$  5 mM y 1 mg/ml BSA). Se agregaron anticuerpos anti FVIII (concentración final 10 µg/ml) a  $^{125}\text{I}$ -FVIII (concentración final 1 nM) y se incubaron 10 min antes de agregarlos a las células e incubar durante la noche a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con tampón B helado y lisado con NaOH 200 mM, SDS al 1%, EDTA 10 mM. Se usó un protocolo similar para los hepatocitos primarios de rata, excepto que se usó medio en lugar de tampón.  $^{125}\text{I}$  en el lisado se contó en un contador  $\gamma$  (Cobra). El límite  $^{125}\text{I}$  en ausencia de anticuerpos anti FVIII se estableció en 100%. La Tabla 13 muestra el efecto de los anticuerpos anti FVIII sobre la unión de  $^{125}\text{I}$ -FVIII a células U87MG, macrófagos y hepatocitos. Los datos muestran que son solo los anticuerpos anti C1 KM33 y 4F30 y algunos de los anticuerpos anti C2, es decir, ESH-4, 4F161 y CLB-CAg117, que inhiben la unión del FVIII a las células. Notablemente, el panel de anticuerpos tiene un efecto similar en los tres tipos de células analizadas, lo que indica que son los mismos epítomos en FVIII los que están involucrados en la absorción celular independientemente del tipo de célula.

25 Tabla 13. Inhibición de la unión de las células del FVIII por los anticuerpos anti C1 y anti C2

Anticuerpo	Epítomos <sup>1</sup>	Unión $^{125}\text{I}$ -FVIII (% de control posterior) <sup>2</sup>		
		U87MG	Macrófagos	Hepatocitos
ESH5	A1	159 ± 12	178 ± 42	81
1F4	A2	79 ± 16	99 ± 15	107 ± 29
1F5	A2	87 ± 10	119 ± 13	n/a
1F10	A2	66 ± 5	104 ± 26	97 ± 22
1F2	A2 (720-740)	80 ± 9	110 ± 10	107 ± 14
4F36	A3 (1649-1871)	140 ± 14	219 ± 58	153
4F30	C1	24 ± 2	27 ± 10	3 ± 3
KM33	C1 (K2092-S2094)	23 ± 2	47 ± 17	5 ± 0
4F45	Cadena ligera	110 ± 12	138 ± 34	n/a
ESH2	Cadena ligera	107 ± 28	155 ± 23	n/a
ESH8	C2 (2248-2285)	92 ± 9	115 ± 20	92 ± 14
ESH4	C2 (2173-2222, 2248-2285 y/o 2303-2322)	32 ± 3	50 ± 21	18 ± 4
4F161	C2	35 ± 7	n/a	n/a
CLB-CAg117	C2	40 ± 7	n/a	n/a

<sup>1)</sup> La ubicación del dominio de los epítomos para los anticuerpos internos se determinó mediante transferencia de Western. Para KM33, se ha descrito parcialmente el epítomo (Blood 2009; 114: 3938-3946, J Thromb Haemost 2007; 5 supl. 2: resumen P-M040). Los datos sobre los posibles epítomos de los anticuerpos contra la ESH se describen en la ficha técnica de American Diagnostica y J Biol Chem 1997; 272: 18007-18014, Thromb Haemost 2003; 89: 795-802, J Mol Recognit 2009; 22: 301-306, Blood 1995; 86: 1811-1819, Biochemistry 2005; 44: 13858-13865 (ver Descripción de la Invención).

<sup>2)</sup> Los datos para células U87 MG y macrófagos son la media y la desviación estándar para n = 3 o más, mientras que n = 1-3 para los hepatocitos. n/a = no analizado

Ejemplo 163: Los anticuerpos anti FVIII C1 y C2 prolongan la vida media de FVIII in vivo

El FVIII preparado como se describe (Haemophilia 2010, 16; 349-359) se mezcló con scFv o fragmentos fab de anticuerpos anti C1 y/o anti C2 en una cantidad que garantiza una saturación inicial del  $\geq 98\%$  de FVIII in vivo usando valores de  $K_d$  de experimentos de resonancia de plasmones de superficie y suponiendo una dilución de 20 veces de la sustancia de ensayo in vivo. Esta dilución de 20 veces se basó en un volumen de distribución de 70 ml/kg obtenido para FVIII cuando se administró solo, un peso estimado de los ratones de 28.6 g y un volumen de la sustancia de prueba de 0.1 ml. FVIII solo (280 UI/kg) o mezclado con anticuerpos/anticuerpos se administró por vía intravenosa a ratones con deficiencia de FvW (n =  $\pm$  por grupo). Se extrajo sangre del plexo orbital t = 0.08; 1, 2, 3, 4 y 5 h. Se tomaron tres muestras de cada ratón y se recolectaron 3 muestras en cada punto de tiempo. La sangre se estabilizó inmediatamente con citrato de sodio y se diluyó en cuatro volúmenes de tampón (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, BSA al 1%, pH 7.3, con conservante) antes de la centrifugación a 5 min a 4000 x g. El plasma se congeló en hielo seco y se mantuvo a -80°C antes del análisis del antígeno FVIII. Los valores medios se utilizaron para las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos, utilizando un enfoque no compartimental (Phoenix WinNonlin Pro 6.1). Los valores de PK resultantes se muestran en la Tabla 14. Si bien el FVIII solo tiene una eliminación relativamente rápida en los ratones con deficiencia de VWF, el bloqueo de C1 o C2 produjo una eliminación disminuida y una vida media prolongada ( $T_{1/2}$ ) y un tiempo de residencia promedio. El bloqueo tanto de un epítomo en C1 como de un epítomo en C2 dio como resultado una eliminación más reducida y un  $T_{1/2}$  prolongado y un tiempo de residencia promedio en comparación con la adición de solo uno de los anticuerpos. Esto muestra que los anticuerpos KM33 y 4F161 protegen los epítomos del FVIII implicados en la absorción celular y, por lo tanto, prolongan la vida media del FVIII.

Tabla 14. Farmacocinética de FVIII coadministrado con fragmentos de anticuerpos anti C1 y/o anticuerpos C2 en ratones deficientes en VWF

Compuesto de prueba	Parámetros farmacocinéticos		
	$T_{1/2}$ (h)	Eliminación (mL/h/kg)	Tiempo Medio de Residencia (h)
FVIII	0.47	167	0.3
FVIII + KM33 scFv	1.2	55	1.7
FVIII + 4F161 fab	1.3	76	1.7
FVIII + KM33 scFv + 4F161 fab	2.0	25	3.0

Ejemplo 17: Epítomos de los anticuerpos FVIII C1 y C2 que bloquean la absorción celular y se prolongan en la eliminación in vivo

Los epítomos de los anticuerpos que bloquean la absorción celular descritos en el Ejemplo 13 se mapearon mediante espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno (HX-MS). La tecnología HX-MS explota que el intercambio de hidrógeno (HX) de una proteína puede ser seguido fácilmente por espectrometría de masas (MS). Al reemplazar el solvente acuoso que contiene hidrógeno con solvente acuoso que contiene deuterio, la incorporación de un átomo de deuterio en un sitio dado en una proteína dará lugar a un aumento en la masa de 1 Da. Este aumento de masa puede controlarse como una función del tiempo por espectrometría de masas en muestras apagadas de la reacción de intercambio. La información de etiquetado de deuterio puede ser sub-localizada a regiones en la proteína por digestión con pepsina en condiciones de enfriamiento y después del aumento de masa de los péptidos resultantes. Un uso de HX-MS es explorar sitios involucrados en interacciones moleculares identificando regiones de intercambio reducido

de hidrógeno en la formación de complejos proteína - proteína. Por lo general, las interfaces de unión se revelarán por reducciones marcadas en el intercambio de hidrógeno debido a la exclusión estérica del disolvente. La formación del complejo proteína - proteína puede detectarse por HX-MS simplemente midiendo la cantidad total de deuterio incorporada en cualquiera de los miembros de la proteína en presencia y ausencia de la pareja de unión respectiva en función del tiempo. La técnica HX-MS utiliza los componentes nativos, es decir, proteínas y anticuerpos o fragmentos Fab, y se realiza en solución. Por lo tanto, HX-MS brinda la posibilidad de imitar las condiciones in vivo (Mass Spectrom. Rdo. 25, 158 (2006). El FVIII (Haemophilia 2010, 16; 349-359) y los anticuerpos KM33 y 4F30, (ver ejemplo 14) se intercambiaron en tampón con imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.3, antes del análisis. Los experimentos de HX fueron automatizados por un robot Leap (H/Dx PAL; Leap Technologies Inc.) operado por el software LeapShell (Leap Technologies Inc.), que realizó el inicio de la reacción de intercambio de deuterio, el control del tiempo de reacción, la reacción de apagado, la inyección en el sistema de UPLC y el control del tiempo de digestión. El robot Leap estaba equipado con dos pilas de temperatura controlada mantenidas a 20°C para almacenamiento de tampón y reacciones de HX y mantenidas a 2°C para almacenamiento de proteína y solución de enfriamiento, respectivamente. Además, el robot Leap contenía una unidad Trio VS enfriada (Leap Technologies Inc.) que contiene las columnas de pepsina, pre y analítica, y las válvulas de conmutación y de tubería LC a 1°C. Las válvulas de conmutación se han actualizado de HPLC a Microbore UHPLC válvulas de conmutación (Cheminert, VICI AG). Para la digestión de pepsina en línea, se cargaron 100 µL de la muestra apagada que contenía 0.15 pmol de FVIII y se pasaron sobre un cartucho de pepsina inmovilizado Poroszyme® (2.1 × 30 mm, Applied Biosystems) utilizando un caudal isocrático de 200 µL/min (0.1% ácido fórmico: CH<sub>3</sub>OH 95:5). Los péptidos resultantes se atraparon y desalaron en una precolumna VanGuard BEH C18 de 1.7 µm (2.1 × 5 mm, Waters Inc.). Posteriormente, las válvulas se cambiaron para colocar la precolumna en línea con la columna analítica, UPLC-BEH C18 1.7 µm (2.1 × 100 mm, Waters Inc.), y los péptidos se separaron usando un gradiente de 9 min de 15-40% de B entregado a 150 µl/min desde un sistema AQUITY UPLC (Waters Inc.). Las fases móviles consistieron en A: ácido fórmico al 0.1% y B: ácido fórmico al 0.1% en CH<sub>3</sub>CN. Los datos de ESI MS y los experimentos de energía elevada (MS<sup>E</sup>) se adquirieron en modo de ión positivo utilizando un Q-T de Premier MS (Waters Inc.). Se utilizó leucina-encefalina como masa de bloqueo ([M+H]<sup>+</sup> iones a m/z 556.2771) y los datos se recopilaron en modo continuo. Los péptidos pépticos se identificaron en experimentos separados utilizando métodos de MSE (Waters Inc.). Los datos de MS<sup>E</sup> se procesaron utilizando Biopharma-Lynx 1.2 (versión 017). Los archivos de datos en bruto de HX-MS se sometieron a una corrección de bloqueo continua. El análisis de datos, es decir, la determinación del centroide de péptidos deuterados y el trazado de curvas en intercambio, se realizó utilizando HX-Express (Versión Beta; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2006; 17: 1700).

El intercambio de amida hidrógeno/deuterio (HX) se inició mediante la preparación de soluciones de FVIII en una concentración de 30 µM en ausencia o presencia de 4F30 o KM33 en el correspondiente tampón deuterado, es decir, imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 150 mM NaCl, preparado en D<sub>2</sub>O, 98% D<sub>2</sub>O final, pH 7.3 (valor no corregido)). Todas las reacciones de HX se llevaron a cabo a 20°C y contenían 3 µM de FVIII en ausencia o presencia de exceso de mAbs de FVIII (4.5 µM) para asegurar la saturación de FVIII con el anticuerpo. En intervalos de tiempo apropiados que oscilaron entre 10 y 2 horas y 46 minutos y 40 segundos (10.000 s), se enfriaron partes alícuotas de la reacción de HX con un volumen igual de tampón de extinción enfriado con hielo TCEP 1.35 M clorhidrato de (Tris(2-Carboxietil)-Fosfina (Calbiochem®, EMD Chemicals inc.)) que resulta en un pH final de 2.6 (valor no corregido).

El mapa de péptidos de la digestión con pepsina de FVIII contenía 653 péptidos (>20 puntos de iones), que cubrían el 82% de la secuencia de N8.

La tasa de incorporación de deuterio (curso temporal de HX) de 653 péptidos, que cubren el 82% de la secuencia primaria de FVIII, se monitorizó en presencia y ausencia de KM33 en 4 puntos de tiempo, es decir, 10 s, 100 s, 1,000 s, y 10,000 s (figuras 3A, 4, 5).

El patrón de intercambio observado en presencia o ausencia de KM33 se puede dividir en dos grupos: un grupo de péptidos muestra un patrón de intercambio que no se ve afectado por la unión de 4F30 y KM33 (Figura 4 [aa 2062-2073 y 2163-2168 ]), que comprende el 99.2% de los péptidos. En contraste, otro grupo de péptidos pépticos del FVIII muestra protección frente al intercambio tanto con 4F30 como con KM33 (Figura 4), que incluye el 0.8% de los péptidos pépticos. Por ejemplo, a 100 segundos de intercambio con D<sub>2</sub>O, aproximadamente 1 amida está protegida del intercambio en la región aa 2148-2161 en ambos enlaces 4F30 y KM33 (Figura 4). La región que muestra protección en la unión de KM33 incluye 4 péptidos pépticos que cubren los residuos aa 2075-2095, 2077-2095, 2078-2095 y 2148-2161. Por lo tanto, el epítipo de 4F30 y KM33 se encuentran dentro de las secuencias lineales aa 2075-2095 y 2148-2161 (usando numeración madura). El mapeo de epítipos de 4F30 y KM33 a FVIII reveló que los dos ligandos tienen epítipos idénticos. Si bien anteriormente se ha descrito que K2092-S2094 está involucrado en el epítipo de KM33 (ver referencias en la tabla 13), la parte restante del epítipo no se ha identificado.

Ejemplo 18: Introducción de un glucano en el bloque FVIII-R2159N que se une a un anticuerpo anti-C1 (KM33) que prolonga la absorción celular del FVIII y la vida media in vivo

El reemplazo de R2159 por asparagina en la región del dominio C1 2157-SIRST-2161 introduce una secuencia de consenso para la glicosilación ligada a N (es decir, N-X-S/T, vea la página 22) en la posición 2159 que está involucrada en el epítipo de KM33 (vea el ejemplo 17). FVIII-R2159N se construyó empleando la mutagénesis QuickChange utilizando el ADN de wt FVIII como plantilla (Blood 2009; 133: 3102-3109). FVIII-R2159N y wt FVIII se expresaron como se describe (Plos One 2011; □□(8): e24163. Doi: 10.1371/journal.pone.0024163). La introducción del glicano

unido a N adicional en la cadena ligera de FVIII se confirmó mediante SDS-PAGE, donde se observó una movilidad reducida de la cadena ligera de FVIII. La actividad de FVIII se midió en un ensayo de FVIII cromogénico como se describe en el ejemplo 3. El antígeno FVIII se midió en un ELISA utilizando CLB-EL14 IgG4 (Br J Haematol 2008; 142: 644-652) como anticuerpo de captura, CLB-CAG69 marcado con peroxidasa (Biochem J 1989; 263: 187-94) como un anticuerpo de detección y plasma combinado humano de 40 donantes como estándar. La asociación del anticuerpo KM33 (ver ejemplo 15) a wt FVIII y FVIII-R2159N se evaluó mediante análisis SPR empleando un biosensor BIACore 3000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). El anticuerpo anti-C2 CLB-EL14 IgG4 se inmovilizó en un chip sensor CM5 a una densidad de 33 fmol/mm<sup>2</sup> empleando el método de acoplamiento de amina según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, FVIII-R2159N o wt FVIII se unieron a EL14 IgG4 a una densidad de 3 fmol/mm<sup>2</sup>. KM33 (100 nM) se pasó sobre FVIII-R2159N o wt FVIII en un tampón que contenía NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Tween 20 al 20% (v/v) y Hepes 20 mM (pH 7,4) a 25°C con caudal de 20 µL/min. La respuesta de unión se registró durante 240 segundos de asociación y se corrigió para la unión no específica. La Tabla 15 muestra la respuesta de unión después de 235 segundos de asociación, así como la actividad y la concentración de antígeno de FVIII wt y FVIII-R2159N. Los resultados muestran que la introducción del glicano suprime completamente la unión del FVIII al KM33, mientras que la actividad del FVIII no se ve afectada por la introducción del glicano. Dado que la unión de KM33 a FVIII reduce la absorción celular y prolonga la vida media in vivo, es probable que el FVIII-R2159N que muestra una unión a KM33 abolida también presente una absorción celular reducida y una vida media in vivo prolongada.

Tabla 15. Actividad y unión de KM33 con wt FVIII y FVIII-R2159N

Variante FVIII	Actividad (U/ml)	Antígeno (U/ml)	Relación de Actividad/Antígeno	Respuesta de Unión (RU) de KM33 después de 235 segundos de asociación la variante FVIII.
wt FVIII	1.05	1.71	0.62	154
FVIII-R2159N	0.41	0.52	0.79	0

Ejemplo 19: Prolongación de la depuración hepática de FVIII K2062A-F2093A

La eliminación hepática de FVIII-K2092A-F2093F se evaluó en un modelo de hígado perfundido (Thromb Haemost 2010; 104, 243-251). En resumen, los hígados de ratas Sprague Dawley anestesiadas se canularon a través de la vena porta y la vena cava y se perfundieron con tampón de bicarbonato de Krebs-Henseleit (NaCl 115 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KCl 5.9 mM, MgCl 4.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) a 25 ml/min. Antes de ingresar al hígado, el perfusato fluye a través de un fiberdialyser (Gambro® Scandidact Hemophan® Fiber Dialyzer 100HG, Secon, Dransfeld, Alemania) que está saturado con una mezcla de oxígeno: dióxido de carbono (95:5). FVIII (Haemophilia 2010, 16; 349-359) o FVIII-K2092A-F2093A se agregaron al tampón y se mezclaron antes de tomar muestras de la perfusión de recirculación en puntos de tiempo de 0 a 80 min. El FVIII: C en el perfundido se analizó mediante un ensayo cromogénico como se describe en el ejemplo 3. El T<sub>1/2</sub> de FVIII-K2092A-F2093A se prolongó en comparación con el de FVIII de tipo silvestre (Tabla 16) que demuestra una disminución de la eliminación hepática de FVIII-K2092A-F2093A en comparación con FVIII sin sustituciones C1.

Tabla 16. Eliminación de FVIII y FVIII-K2092A- F2093A en hígados de rata perfundidos.

Variante FVIII	T <sub>1/2</sub> (min) <sup>1</sup>
FVIII tipo silvestre	31 ± 3
FVIII-K2092A-F2093A	113 ± 48
1) Los datos son la media y la desviación estándar de n = 3 experimentos.	

Ejemplo 20: Prolongación de la vida media in vivo de FVIII-K2092A-F2093A

La farmacocinética in vivo del mutante K2093A-F2093A se evaluó adicionalmente en ratones deficientes en FvW. El FVIII tipo silvestre (Haemophilia 2010, 16; 349-359) y FVIII-K2092A-F2093A fueron 40K-PEGilados específicos en un glicano unido a O en el dominio B como se describe en el documento WO09108806. Se administraron FVIII, K2092-F2093A y FVIII PEGilado (40K-PEG-FVIII) y mutante (40K-PEG-K2092A-F2093A) a ratones con deficiencia de FvW a una dosis de 280 UI/kg (n = 3-6 por grupo) como se describe en el ejemplo 16. Se tomaron muestras de sangre en tres puntos de tiempo de cada ratón, es decir, en t = 0.5, 1.25 y 2 h después de la administración de FVIII y K2092-F2093A y 4, 7 y 24 horas después de la administración de las proteínas PEGiladas, y se analizaron para detectar

FVIII: C como se describe en el ejemplo 3. Las mutaciones de C1 K2092A-F20963A dieron como resultado aproximadamente una duplicación de T<sub>1/2</sub> tanto para las proteínas FVIII PEGiladas como para las proteínas de FVIII no PEGiladas (Tabla 17), lo que confirma que la sustitución de K2092-F2093 en FVIII dio como resultado una prolongada vida media in vivo.

5 Tabla 17. Influencia de la mutación K2092-F2093A en la vida media in vivo.

Compuesto de prueba	T <sub>1/2</sub> (h)	
	media	Intervalo de confianza 95%
wt FVIII	0.3	0.3 - 0.4
K2092A-F2093A	0.6	0.5 - 0.8
40K-PEG-FVIII	6.5	4.9 - 9.5
40K-PEG-FVIII-K2092A-F2093A	10.5	9.6 - 11.7

Ejemplo 18: Respuesta reducida de células T de FVIII-R2090A-K2092A-F2093A

10 Está bien establecido que la interacción del FVIII con las células presentadoras de antígenos proporciona un paso crucial en la formación de células T CD4+ específicas para el FVIII que, posteriormente, estimulan la producción de anticuerpos dirigidos hacia el FVIII. Las respuestas de células T CD4+ de esplenocitos de ratones inyectados con FVIII de tipo silvestre (FVIII wt) y FVIII-R2090A-K2092A-F2093A se analizaron de la siguiente manera: los bazo recogidos después de inyecciones semanales de FVIII se agruparon dentro de los grupos. Los eritrocitos se eliminaron y las células CD8+ se agotaron mediante la separación de perlas magnéticas utilizando perlas recubiertas con el anticuerpo CD8 anti-ratón Lyt 1.2 (eBioscience). Las células CD8- restantes se cultivaron en placas de 96 pozos de fondo redondo durante 72 o 96 horas en medio X-VIVO 15 suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina (todas de BioWhittaker; Walkersville, Md.) y β-mercaptoetanol 55 μM (Sigma-Aldrich, Irvine, Reino Unido) en presencia de una concentración de FVIII en aumento (0, 0.1, 0.5 o 1 μg/ml) para generar una proliferación de células T específica de antígeno o concanavalina A (1 μg/ml) para generar una proliferación inespecífica. La proliferación se analizó mediante la adición de 1 μCi/pozo de [<sup>3</sup>H]timidina (ICN Pharmaceuticals, Irvine, California) durante las últimas 18-20 horas. Los resultados mostrados en la Tabla 18 se expresan en valores por recuento por minuto (CPM) (media ± SD) o como el índice de estimulación (SI: CPM de células incubadas con antígeno dividido por CPM de células con medio solo). La inyección de ratones con FVIII-R2090A-K2092A-F2093A condujo a una proliferación reducida de células T CD4+ esplénicas tras la reestimulación in vitro con FVIII cuando se comparó con el FVIII wt, lo que demuestra que la absorción reducida de FVIII-R2090A-K2092A-F2093A en antígeno la presentación de células se traduce en una reducción de las respuestas de las células T CD4+ en ratones.

25 Tabla 18. Respuestas de células T CD4+ de esplenocitos derivados de ratones tratados con 5 inyecciones intravenosas de FVIII WT y FVIII-R2090A-K2092A-F2093A.

	Concentración FVIII (ug/ml)				ConA
	0	0.1	0.5	1.0	
Proliferación después de 72 h (CPM):					
wt FVIII	1169 ± 193	4052 ± 1309	6731 ± 838	8437 ± 865	77892 ± 6623
FVIII-R2090A-K2092A-F2093A			2908 ± 376	3226 ± 656	66944 ± 13127
	1352 ± 383	2464 ± 433			
Proliferación después de 72 h (SI):					
wt FVIII	1.0	4.12 ± 0.01	5.76 ± 0.71	7.22 ± 0.74	48.29 ± 0.74
FVIII-R2090A-K2092A-F2093A	1.0	1.82 ± 0.32	2.15 ± 0.28	2.39 ± 0.49	48.64 ± 9.34

Proliferación después de 96 h (CPM):					
wt FVIII	1496 ± 380	7755 ± 1346	13722 ± 1598	15766 ± 2664	37699 ± 2660
FVIII-R2090A-K2092A-F2093A	1435 ± 229	4069 ± 723	5841 ± 680	6110 ± 300	46531 ± 4917
Proliferación después de 96 h (SI):					
wt FVIII	1.0	4.12 ± 0.01	5.76 ± 0.71	7.22 ± 0.74	48.29 ± 0.74
FVIII-R2090A-K2092A-F2093A	1.0	1.82 ± 0.32	2.15 ± 0.28	2.39 ± 0.49	48.64 ± 9.34

## Ejemplo 22: Nivel reducido de anticuerpos en ratones que reciben FVIII-R2090A-K2092A-F2093A

La consecuencia de la reducción de la absorción de variantes de FVIII por parte de las células presentadoras de antígeno en la inmunogenicidad de estas variantes se evaluó además en un modelo murino para la formación de inhibidores en la hemofilia A. FVIII tipo silvestre y FVIII-R2090A-K2092A-F2093A se diluyeron a 10 µg/ml en PBS estéril y una dosis de 100 µl (1 µg) se administró por vía intravenosa (iv) en 17 ratones KO (n = 8) machos FVIII exón cinco veces por semana. Una semana después de la última inyección, se sacrificaron los animales y se recogieron muestras de sangre. La presencia de anticuerpos anti-FVIII en muestras de plasma de ratones tratados con FVIII-KO se determinó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y un ensayo de Bethesda que mide la capacidad del plasma de los ratones para inhibir la actividad del FVIII. Para el ELISA, se inmovilizó FVIII derivado de plasma (5 µg/ml) en un tampón que contenía NaHCO<sub>3</sub> 50 mM, pH 9.8, en pozos de microtitulación. Las placas se bloquearon con gelatina al 2% en PBS. Las diluciones de plasma de ratón se prepararon en Tris 50 mM, NaCl 150 mM, BSA al 2%, pH 7.4. Se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-FVIII CLB-CAg9 como estándar. Se detectaron anticuerpos anti-FVIII con IgG-HRP anti-ratón de cabra. La concentración de anticuerpos anti-FVIII en plasma murino se muestra en unidades arbitrarias (UA), donde 1 UA corresponde a la señal obtenida por 1 µg de CLB-CAg9. El ensayo Bethesda se realizó esencialmente como se describe (Thromb Diath Haemorrh 1975; 34: 612). Los datos se analizaron utilizando la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica. Los títulos de anticuerpos observados en el plasma de ratón después de 5 inyecciones semanales de FVIII y FVIII-R2090A-K2092A-F2093A se muestran en la Tabla 19. Los resultados muestran que la infusión de FVIII da como resultado la formación de anticuerpos dirigidos hacia FVIII. Se observa una reducción significativa en los títulos de anticuerpos en ratones tratados con FVIII-R2090A-K2092A-F2093A (p <0.05). Además, el título de Bethesda que refleja la presencia de anticuerpos anti-FVIII neutralizantes se redujo significativamente (p <0.05). Estos hallazgos muestran que la absorción reducida de FVIII-R2090A-K2092A-F2093A en las células presentadoras de antígeno y la respuesta reducida de las células T se traduce en una reducción de los títulos de inhibidores en un modelo murino para el desarrollo de inhibidores en la hemofilia A. En conjunto, estos resultados muestran que la modificación específica de FVIII que conduce a la reducción de su endocitosis por las células presentadoras de antígenos, es una forma efectiva de reducir la inmunogenicidad de FVIII in vivo. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las variantes de FVIII que muestran una absorción celular reducida conllevan un riesgo reducido de desarrollo de inhibidores en pacientes con hemofilia A.

Tabla 19. Títulos de anticuerpos en plasma de ratones tratados con 5 inyecciones intravenosas de FVIII y FVIII-R2090A-K2092A-F2093A.

Variante FVIII	ELISA (AU) <sup>1</sup>	Titulación Bethesda (BU/ml) <sup>1</sup>
FVIII WT	252200 ± 81840	364 ± 98
FVIII-R2090A-K2092A-F2093A	81910 ± 11690	118 ± 48
<sup>1</sup> Los resultados son media ± EEM de datos de 8 animales.		

# ES 2 712 575 T3

Lista de secuencias

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Variantes del factor viii que tienen una absorción celular disminuida

<130> 8219.204-WO

<160> 9

5 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2332

<212> PRT

<213> homo sapiens

10 <400> 1

```

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

```

ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

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

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

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

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser 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



ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Asp Leu Tyr  
 2330

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Un dominio FVIII B truncado

<400> 2

ES 2 712 575 T3

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

Lys Arg His Gln Arg  
 20

<210> 3

<211> 1438

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Variante de FVIII humano truncado/eliminado del dominio B que comprende una sustitución K2092

<400> 3

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



ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

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 Pro  
 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

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



ES 2 712 575 T3

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> 4

<211> 1438

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Variante de FVIII humano truncado / eliminado del dominio B que comprende una sustitución F2093.

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

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 Pro 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		
Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile 1130 1135 1140		

ES 2 712 575 T3

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 Ala 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

ES 2 712 575 T3

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> 5

<211> 1438

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Variante de FVIII borrado / truncado del dominio B que comprende las sustituciones K2092A y F2093A.

<400> 5

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

ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

				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		

ES 2 712 575 T3

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 Pro  
 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

Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile  
 1130 1135 1140

ES 2 712 575 T3

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 Ala Ala 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

ES 2 712 575 T3

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> 6

<211> 1456

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Dominio B variante de FVIII humano borrado / truncado que comprende la sustitución R2215A.

<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

ES 2 712 575 T3

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



ES 2 712 575 T3

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

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

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

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

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

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

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

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys  
755 760 765

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

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

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

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

Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser  
835 840 845

Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp  
850 855 860

Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu  
865 870 875 880

Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met  
885 890 895

ES 2 712 575 T3

Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser  
 900 905 910

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys  
 915 920 925

Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln  
 930 935 940

His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala  
 945 950 955 960

Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile  
 965 970 975

Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly  
 980 985 990

Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp  
 995 1000 1005

Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys  
 1010 1015 1020

Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu  
 1025 1030 1035

Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu  
 1040 1045 1050

Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu  
 1055 1060 1065

Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser  
 1070 1075 1080

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

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

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

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

ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

1370 1375 1380

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 1456

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Variante de FVIII humano del dominio B eliminado / truncado que comprende las sustituciones K2065A y R2215A

<400> 7

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

10 Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val



ES 2 712 575 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 712 575 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys  
 755 760 765

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

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

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

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

Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser  
 835 840 845

Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp  
 850 855 860

Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu  
 865 870 875 880

ES 2 712 575 T3

Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met  
885 890 895

Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser  
900 905 910

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys  
915 920 925

Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln  
930 935 940

His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala  
945 950 955 960

Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile  
965 970 975

Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly  
980 985 990

Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp  
995 1000 1005

Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys  
1010 1015 1020

Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu  
1025 1030 1035

Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu  
1040 1045 1050

Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu  
1055 1060 1065

Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser  
1070 1075 1080

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

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

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

ES 2 712 575 T3

1115							1120										1125
His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn			
1130						1135					1140						
Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp			
1145						1150					1155						
Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Lys			
1160						1165					1170						
Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser	Thr			
1175						1180					1185						
Ala	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro	Met			
1190						1195					1200						
Ile	Ile	His	Gly	Ile	Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe	Ser			
1205						1210					1215						
Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly			
1220						1225					1230						
Lys	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu	Met			
1235						1240					1245						
Val	Phe	Phe	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn	Ile			
1250						1255					1260						
Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr			
1265						1270					1275						
His	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly	Cys			
1280						1285					1290						
Asp	Leu	Asn	Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys	Ala			
1295						1300					1305						
Ile	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn	Met			
1310						1315					1320						
Phe	Ala	Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly			
1325						1330					1335						
Ala	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp			
1340						1345					1350						

ES 2 712 575 T3

Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr  
 1355 1360 1365

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 1456

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> variante FVIII humana eliminada/truncada de dominio B que comprende las sustituciones R2090A y R2215A.

<400> 8

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

ES 2 712 575 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 712 575 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 712 575 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys  
755 760 765

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

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

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

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

Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser  
835 840 845

Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp

ES 2 712 575 T3

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

ES 2 712 575 T3

Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu  
 1100 1105 1110  
  
 Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu  
 1115 1120 1125  
  
 His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn  
 1130 1135 1140  
  
 Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp  
 1145 1150 1155  
  
 Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys  
 1160 1165 1170  
  
 Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr  
 1175 1180 1185  
  
 Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met  
 1190 1195 1200  
  
 Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Ala Gln Lys Phe Ser  
 1205 1210 1215  
  
 Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly  
 1220 1225 1230  
  
 Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met  
 1235 1240 1245  
  
 Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile  
 1250 1255 1260  
  
 Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr  
 1265 1270 1275  
  
 His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys  
 1280 1285 1290  
  
 Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala  
 1295 1300 1305  
  
 Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met  
 1310 1315 1320  
  
 Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly  
 1325 1330 1335

ES 2 712 575 T3

Ala Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp  
1340 1345 1350

Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr  
1355 1360 1365

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 1456

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Variante de FVIII humano eliminada/truncada del dominio B que comprende las sustituciones 2092A y R2215A.

<400> 9

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

10

ES 2 712 575 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 712 575 T3

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



ES 2 712 575 T3

Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser  
 835 840 845

Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp  
 850 855 860

Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu  
 865 870 875 880

Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met  
 885 890 895

Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser  
 900 905 910

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys  
 915 920 925

Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln  
 930 935 940

His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala  
 945 950 955 960

Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile  
 965 970 975

Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly  
 980 985 990

Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp  
 995 1000 1005

Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys  
 1010 1015 1020

Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu  
 1025 1030 1035

Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu  
 1040 1045 1050

Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu  
 1055 1060 1065

Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser  
 1070 1075 1080

ES 2 712 575 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

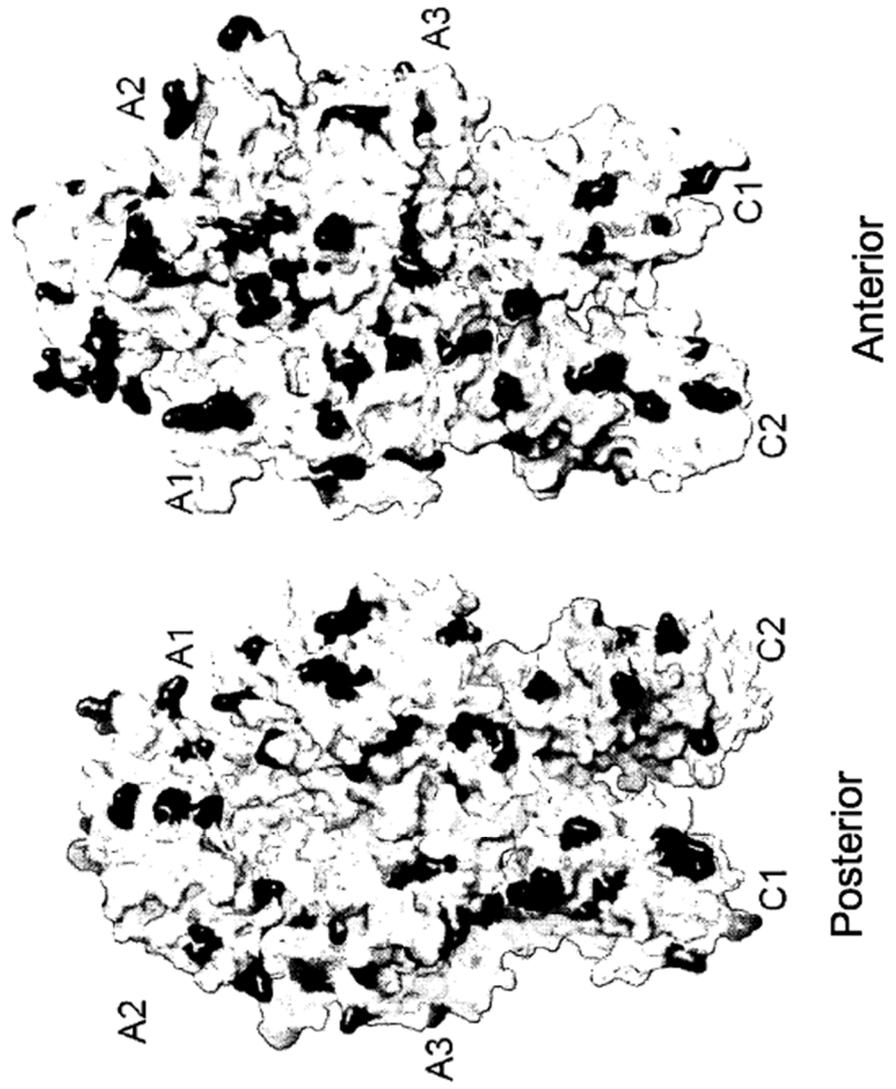
ES 2 712 575 T3

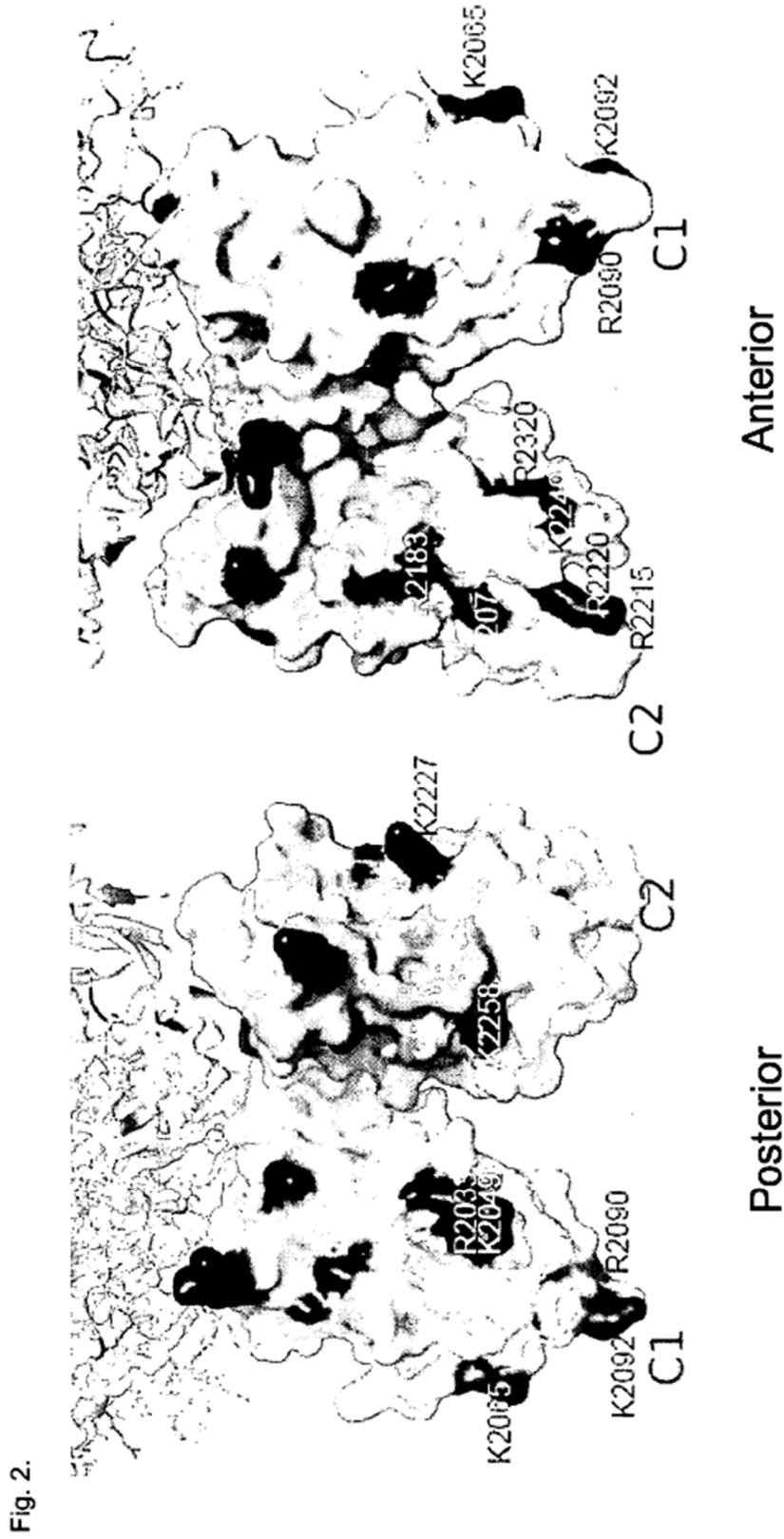
Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly  
 1325 1330 1335  
 Ala Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp  
 1340 1345 1350  
 Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr  
 1355 1360 1365  
 Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una variante de FVIII recombinante que tiene actividad de FVIII, en el que dicha variante comprende 2-10 sustituciones de residuos de aminoácidos cargados positivamente accesibles desde la superficie en el pie C1 y/o el pie C2 de FVIII, en el que dichos residuos de aminoácidos cargados accesibles desde la superficie están sustituidos con alanina o glutamina y en el que las sustituciones dan como resultado una disminución de la absorción celular de dicha variante de FVIII, y en el que dicha variante comprende una sustitución R2215 combinada con una sustitución K2092.
2. Una variante de FVIII recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha variante de FVIII comprende una sustitución K2092A.
- 10 3. Una variante de FVIII recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que dicha variante comprende una sustitución R2215A.
4. Una variante de FVIII recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha variante comprende además una sustitución de R2090.
- 15 5. Una variante de FVIII recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha variante comprende además una sustitución de K2065.
6. Una variante de FVIII recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha variante comprende además una sustitución K2065 combinada con una sustitución de K2249.
7. Una variante de FVIII recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha variante tiene una unión a LRP disminuida.
- 20 8. Una variante de FVIII recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha variante tiene inmunogenicidad disminuida.
9. Una variante de FVIII recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la variante de FVIII se conjuga con una fracción que se extiende en la vida media.
- 25 10. Una variante de FVIII recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha variante además comprende la mutación F2093A.
11. Una composición farmacéutica que comprende una variante de FVIII recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
12. Una variante de FVIII recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 para uso en el tratamiento de hemofilia.
- 30

Fig. 1.





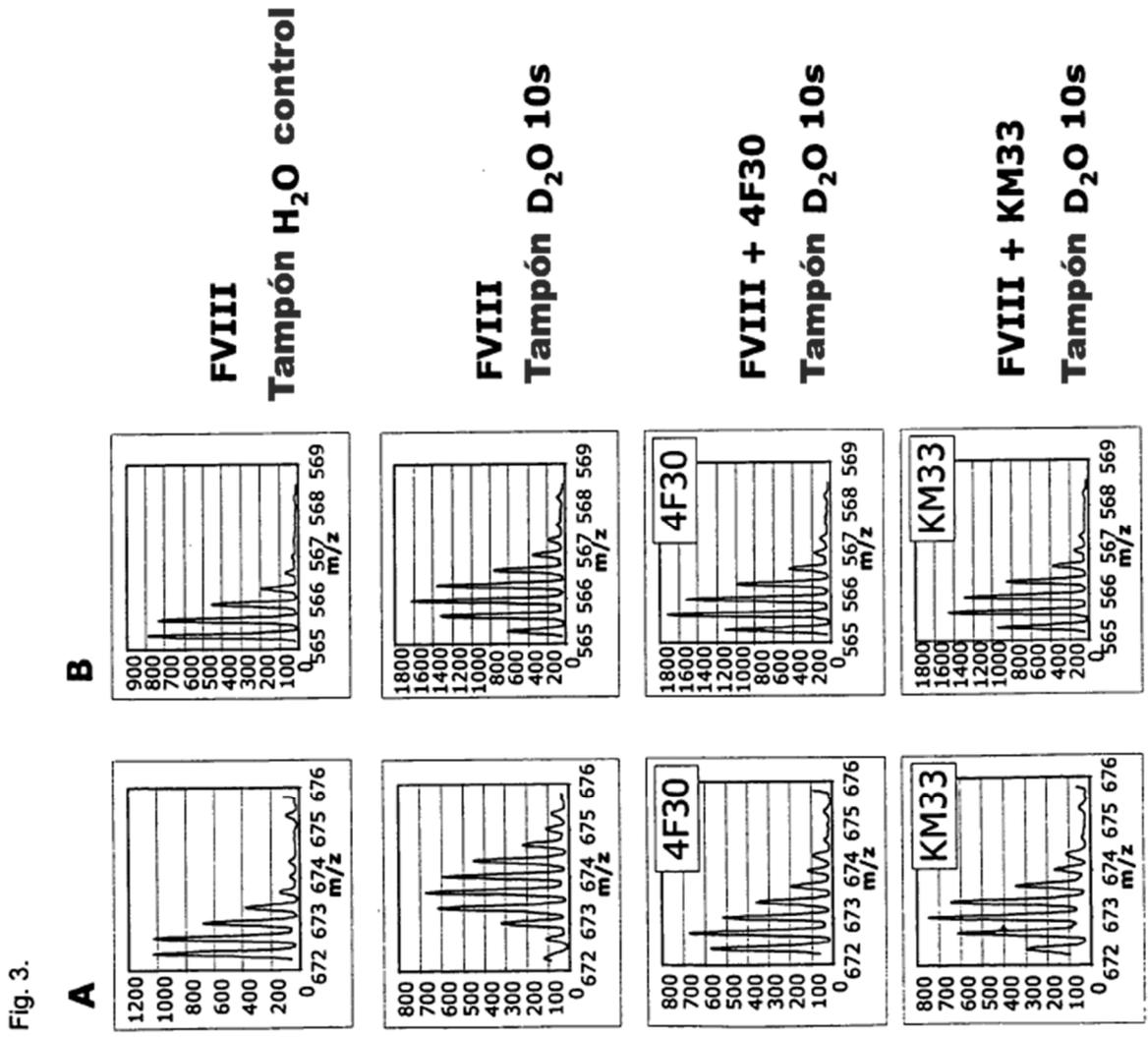


Fig. 4

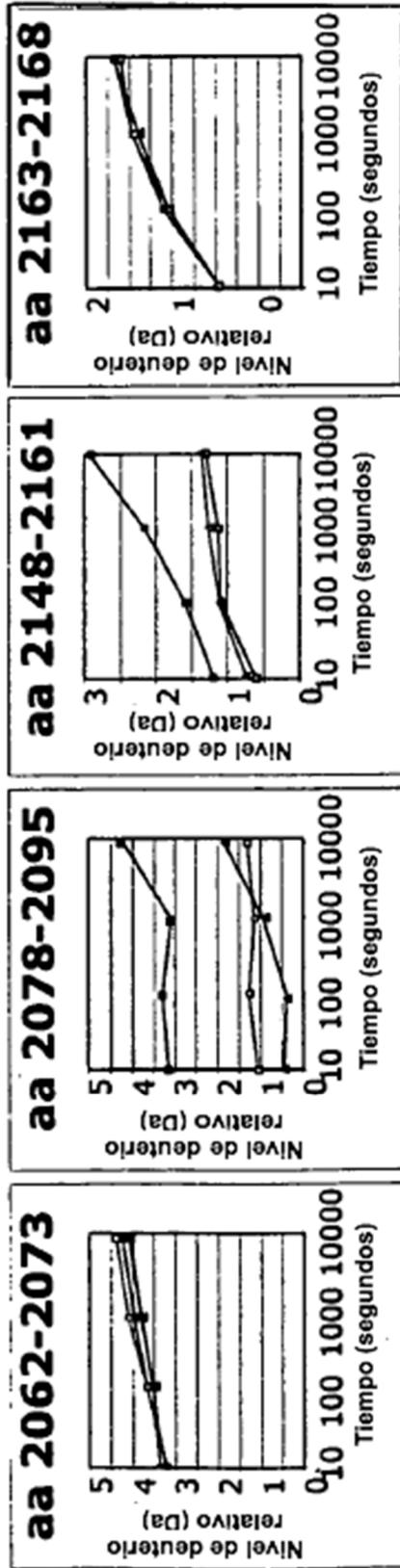


Fig. 5

