

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 124**

51 Int. Cl.:

A61K 38/37 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 47/62 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2013 PCT/US2013/021330**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13106787**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2013 E 13735649 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2804623**

54 Título: **Polipéptidos quiméricos de factor VIII y usos de los mismos**

30 Prioridad:

12.01.2012 US 201261586099 P

13.01.2012 US 201261586654 P

03.07.2012 US 201261667901 P

07.12.2012 US 201261734954 P

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

07.04.2020

73 Titular/es:

BIOVERATIV THERAPEUTICS INC. (100.0%)

225 Second Avenue

Waltham, MA 02451, US

72 Inventor/es:

CHHABRA, EKTA, SETH;

LIU, TONGYAO;

PETERS, ROBERT y

JIANG, HAIYAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 753 124 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

Polipéptidos quiméricos de factor VIII y usos de los mismos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La coagulación es un proceso complejo por el que la sangre forma coágulos. Es una parte importante de la hemostasia, el cese de la pérdida de sangre de un vaso dañado, en donde la pared de un vaso sanguíneo dañado se cubre por un coágulo que contiene plaquetas y fibrina para detener el sangrado y empezar a reparar el vaso dañado. Los trastornos de la coagulación pueden conducir a un riesgo elevado de sangrado (hemorragia) o coagulación obstructiva (trombosis).

10 La coagulación empieza casi instantáneamente después de que una lesión al vaso sanguíneo haya dañado el revestimiento de endotelio del vaso. La exposición de la sangre a proteínas tales como factor tisular inicia cambios en las plaquetas sanguíneas y el fibrinógeno de la proteína plasmática, un factor de coagulación. Las plaquetas forman inmediatamente un tapón en el sitio de lesión; esto se denomina hemostasia primaria. La hemostasia secundaria ocurre simultáneamente: Las proteínas en el plasma sanguíneo, denominadas factores de coagulación, responden en una compleja cascada para formar cadenas de fibrina, que refuerzan el tapón de plaquetas. Los factores de la coagulación no limitantes incluyen, pero no se limitan a, factor I (fibrinógeno), factor II (protrombina), factor tisular, factor V (proacelerina, factor lábil), factor VII (factor estable, proconvertina), factor VIII (factor anti-hemofílico A), factor IX (factor anti-hemofílico B o factor de Christmas), factor X (factor de Stuart-Prower), factor XI (antecedente de la tromboplastina plasmática), factor XII (factor Hageman), factor XIII (factor estabilizador de la fibrina), VWF, precalicreína (factor de Fletcher), cininógeno de alto peso molecular (HMWK) (factor de Fitzgerald), fibronectina, antitrombina III, cofactor II de heparina, proteína C, proteína S, proteína Z, plasminógeno, alfa 2-antiplasmina, activador tisular del plasminógeno (tPA), urocinasa, inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI1) e inhibidor 2 del activador del plasminógeno (PAI2).

25 La hemofilia A es un trastorno hemorrágico provocado por defectos en el gen que codifica el factor de coagulación VIII (FVIII) y afecta a 1-2 en 10.000 varones nacidos. Graw et al., Nat. Rev. Genet. 6(6): 488-501 (2005). Los pacientes afectados con hemofilia A se pueden tratar con infusión de FVIII purificado o recombinantemente producido. Todos los productos de FVIII comercialmente disponibles, sin embargo, son conocidos por tener una semivida de aproximadamente 8-12 horas, que requiere la frecuente administración intravenosa a los pacientes. Véase Weiner M.A. and Cairo, M.S., Pediatric Hematology Secrets, Lee, M.T., 12. Disorders of Coagulation, Elsevier Health Sciences, 2001; Lillicrap, D. Thromb. Res. 122 Supl 4:S2-8 (2008). Además, varios enfoques han intentado prolongar la semivida de FVIII. Por ejemplo, los enfoques en el desarrollo para prolongar la semivida de los factores de coagulación incluyen pegilación, glucopegilación, y conjugación con albúmina. Véase Dumont et al., Blood. 119(13): 3024-3030 (publicado en línea el 13 de enero de 2012). Independientemente de la ingeniería de proteínas usada, sin embargo, los productos de FVIII de acción prolongada actualmente en desarrollo tienen semividas mejoradas, pero se informa que las semividas están limitadas - solo a aproximadamente 1,5 a 2 veces de mejora en modelos animales preclínicos. Véase ídem. Se han demostrado resultados coherentes en seres humanos, por ejemplo, se informó que rFVIIIc mejoraba la semivida hasta ~1,7 veces en comparación con ADVATE® en paciente con hemofilia A. Véase ídem. Por tanto, los aumentos en la semivida, a pesar de mejoras menores, pueden indicar la presencia de otros factores limitantes de T1/2. Véase Liu, T. et al., reunión de ISTH de 2007, resumen N° P-M-035; Henrik, A. et al., reunión de ISTH de 2011, resumen N° P=MO-181; Liu, T. et al., reunión de ISTH de 2011, resumen N° P-WE-131.

40 El factor von Willebrand plasmático (VWF) tiene una semivida de aproximadamente 12 horas (que varía desde 9 hasta 15 horas). http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd/2_scientificoverview.htm (visitado por última vez el 22 de octubre de 2011). La semivida de VWF se puede afectar por varios factores: patrón de glucosilación, ADAMTS-13 (una desintegrina y metaloproteasa con motivo-13 de trombospondina), y diversas mutaciones en VWF.

45 En plasma, el 95-98 % de FVIII circula en un estrecho complejo no covalente con VWF de longitud completa. La formación de este complejo es importante para el mantenimiento de niveles apropiados en plasma de FVIII *in vivo*. Lenting et al., Blood. 92(11): 3983-96 (1998); Lenting et al., J. Thromb. Haemost. 5(7): 1353-60 (2007). El FVIII no mutante de longitud completa está principalmente presente como un heterodímero que tiene una cadena pesada (MW 200 kd) y una cadena ligera (MW 73 kd). Cuando FVIII se activa debido a la proteólisis en las posiciones 372 y 740 en la cadena pesada y en la posición 1689 en la cadena ligera, se retira el VWF unido a FVIII de FVIII activado. El FVIII activado, junto con el factor IX activado, calcio y fosfolípido ("complejo de tenasa"), implica la activación de factor X, generando grandes cantidades de trombina. La trombina, a su vez, escinde entonces el fibrinógeno para formar monómeros de fibrina solubles, que entonces se polimerizan espontáneamente para formar el polímero soluble de fibrina. La trombina también activa el factor XIII que, junto con el calcio, sirve para reticular y estabilizar el polímero soluble de fibrina, que forma fibrina reticulada (insoluble). El FVIII activado se elimina rápidamente de la circulación por proteólisis.

Debido a la frecuente dosificación y molestia provocada por el programa de dosificación, todavía existe la necesidad de desarrollar productos de FVIII que requieran administración menos frecuente, es decir, un producto de FVIII que tenga una semivida más larga que la limitación de semivida de 1,5 a 2 veces.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

Basándose en la divulgación que está contenida en el presente documento, la presente invención proporciona una proteína quimérica que comprende una proteína de factor VIII ("FVIII") y un fragmento de factor de von Willebrand (VWF),

5 en donde la proteína FVIII comprende un dominio A1, un dominio A2, un dominio A3, un dominio C1, y un dominio C2;

en donde el fragmento de VWF comprende un dominio D' y un dominio D3 de VWF; y

en donde el fragmento de VWF y la proteína FVIII están unidos por un enlace covalente, que previene la disociación del fragmento de VWF de la proteína FVIII en presencia de VWF endógeno,

10 en donde el fragmento de VWF inhibe o previene que VWF endógeno se una a la proteína FVIII por protección o bloqueo de un sitio de unión de VWF sobre la proteína FVIII.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un polinucleótido o un conjunto de polinucleótidos que codifica la proteína quimérica de la invención.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende el polinucleótido o el conjunto de polinucleótidos de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína quimérica de la invención, el polinucleótido o el conjunto de polinucleótidos de la invención, o la célula hospedadora la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona la proteína quimérica de la invención, el polinucleótido o el conjunto de polinucleótidos de la invención, la célula hospedadora de la invención, o la composición de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección hemorrágica en un sujeto en necesidad del mismo, en donde la enfermedad hemorrágica o trastorno se selecciona del grupo que consiste en un trastorno hemorrágico de la coagulación, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia dentro de los músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo craneal, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de huesos, sangrado del sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, sangrado en la vaina del iliopsoas, y cualquier combinación de los mismos.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de preparación de la proteína quimérica de la invención, que comprende transfectar una o más células hospedadoras con el polinucleótido o el conjunto de polinucleótidos de la invención, y expresar la proteína quimérica en la célula hospedadora.

30 La presente invención y las realizaciones de la misma se explican en las reivindicaciones adjuntas

35 En ciertas realizaciones, el fragmento de VWF se asocia con la proteína FVIII por un enlace no covalente, además del enlace covalente entre la proteína FVIII y el resto auxiliar (fragmento de VWF). En un ejemplo, el fragmento de VWF es un monómero. En otro ejemplo, el fragmento de VWF comprende dos, tres, cuatro, cinco o seis fragmentos de VWF unidos a uno o más entre sí.

40 En un aspecto, la proteína quimérica comprende el fragmento de VWF, y al menos un resto heterólogo (H1) y un conector opcional entre el fragmento de VWF y el resto heterólogo (H1). En una realización, el resto heterólogo (H1) puede comprender un resto que prolonga la semivida de la proteína FVIII, por ejemplo, un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, y cualquier combinación de los mismos o un resto no de polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), ácido polisialico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, y cualquier combinación de los mismos. En una realización, el resto heterólogo (H1) comprende una primera región Fc. En otra realización, el resto heterólogo (H1) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 45 aproximadamente 50 aminoácidos, al menos aproximadamente 100 aminoácidos, al menos aproximadamente 150 aminoácidos, al menos aproximadamente 200 aminoácidos, al menos aproximadamente 250 aminoácidos, al menos aproximadamente 300 aminoácidos, al menos aproximadamente 350 aminoácidos, al menos aproximadamente 400 aminoácidos, al menos aproximadamente 450 aminoácidos, al menos aproximadamente 500 aminoácidos, al menos aproximadamente 550 aminoácidos, al menos aproximadamente 600 aminoácidos, al menos aproximadamente 650 aminoácidos, al menos aproximadamente 700 aminoácidos, al menos aproximadamente 750 aminoácidos, al menos aproximadamente 800 aminoácidos, al menos aproximadamente 850 aminoácidos, al menos aproximadamente 900 aminoácidos, al menos aproximadamente 950 aminoácidos, o al menos aproximadamente 1000 aminoácidos. En otras realizaciones, la proteína quimérica comprende un conector entre el resto auxiliar, por ejemplo, un fragmento de VWF, y el resto heterólogo (H1), que es un conector escindible.

En otro aspecto, la proteína FVIII en la proteína quimérica comprende FVIII y al menos un resto heterólogo (H2). En una realización, el resto heterólogo (H2) es capaz de prolongar la semivida de la proteína FVIII, por ejemplo, un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, y cualquier combinación de los mismos, o un resto no de polipéptido que comprende polietilenglicol (PEG), ácido polisialílico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, y cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, el resto heterólogo (H2) comprende una segunda región Fc.

En algunas realizaciones, la proteína quimérica comprende una primera cadena de polipéptidos que comprende el fragmento de VWF, un primer resto heterólogo, y un conector y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la proteína FVIII y un segundo resto heterólogo, en donde la primera cadena de polipéptidos y la segunda cadena de polipéptidos se unen entre sí por un enlace covalente. En un ejemplo, el primer resto heterólogo y el segundo resto heterólogo se unen entre sí por el enlace covalente, por ejemplo, un enlace disulfuro, un enlace peptídico, o un conector, en donde el enlace covalente previene la sustitución del fragmento de VWF en la primera cadena de polipéptidos con VWF endógeno *in vivo*. En algunas realizaciones, el conector entre la proteína FVIII y el segundo resto heterólogo es un conector escindible.

En ciertas realizaciones, el primer resto heterólogo (H1) unido al fragmento de VWF y el segundo resto heterólogo (H2) unido a la proteína FVIII se unen por un conector, por ejemplo, un conector scFc, que es un conector procesable.

Aún en otras realizaciones, la proteína FVIII en la proteína quimérica comprende además un tercer resto heterólogo (H3), un cuarto resto heterólogo (H4), un quinto resto heterólogo (H5), un sexto resto heterólogo (H6), o cualquier combinación de los mismos. En una realización, uno o más del tercer resto heterólogo (H3), el cuarto resto heterólogo (H4), el quinto resto heterólogo (H5), el sexto resto heterólogo (H6) son capaces de prolongar la semivida de la proteína FVIII. En otras realizaciones, el tercer resto heterólogo (H3), el cuarto resto heterólogo (H4), el quinto resto heterólogo (H5) y el sexto resto heterólogo (H6) se unen al extremo C o extremo N de FVIII o se insertan entre dos aminoácidos de FVIII. En otras realizaciones, uno o más del tercer resto heterólogo (H3), el cuarto resto heterólogo (H4), el quinto resto heterólogo (H5) o el sexto resto heterólogo (H6) comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende al menos aproximadamente 50 aminoácidos, al menos aproximadamente 100 aminoácidos, al menos aproximadamente 150 aminoácidos, al menos aproximadamente 200 aminoácidos, al menos aproximadamente 250 aminoácidos, al menos aproximadamente 300 aminoácidos, al menos aproximadamente 350 aminoácidos, al menos aproximadamente 400 aminoácidos, al menos aproximadamente 450 aminoácidos, al menos aproximadamente 500 aminoácidos, al menos aproximadamente 550 aminoácidos, al menos aproximadamente 600 aminoácidos, al menos aproximadamente 650 aminoácidos, al menos aproximadamente 700 aminoácidos, al menos aproximadamente 750 aminoácidos, al menos aproximadamente 800 aminoácidos, al menos aproximadamente 850 aminoácidos, al menos aproximadamente 900 aminoácidos, al menos aproximadamente 950 aminoácidos, o al menos aproximadamente 1000 aminoácidos.

En algunas realizaciones, el conector entre la proteína FVIII y el segundo resto heterólogo o el conector entre el fragmento de VWF y el primer resto heterólogo comprende además un primer sitio de escisión (P1) en la región del extremo N del conector, un segundo sitio de escisión (P2) en la región del extremo C del conector, o ambos. En otras realizaciones, uno o más del conector entre la proteína FVIII y el resto auxiliar, el conector entre la proteína FVIII y el segundo resto heterólogo, y el conector entre el fragmento de VWF y el primer resto heterólogo, tienen una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 aminoácidos.

En otros casos, la proteína quimérica comprende una proteína FVIII y un resto auxiliar, que están unidos por un conector entre la proteína FVIII y el resto auxiliar, en donde el conector comprende además un motivo de reconocimiento de sortasa, por ejemplo, la secuencia de LPXTG (SEQ ID NO: 106).

La presente divulgación se refiere a un fragmento de factor de von Willebrand (VWF) que comprende el dominio D' y el dominio D3 de VWF, en donde el fragmento de VWF se une al factor VIII (FVIII) e inhibe la unión de VWF endógeno a una proteína FVIII. En un caso, el fragmento de VWF de la divulgación no es los aminoácidos 764 a 1274 de SEQ ID NO: 2. En un caso, la proteína FVIII, sin el fragmento de VWF, tiene una semivida comparable a FVIII no mutante. En otro caso, la proteína FVIII es una proteína de fusión que comprende FVIII y un resto heterólogo que es capaz de prolongar la semivida de FVIII. El resto heterólogo puede ser un polipéptido, un resto no de polipéptido, o ambos. El resto heterólogo de polipéptido se puede seleccionar del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, y cualquier combinación de los mismos. En otros casos, el resto heterólogo es una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, por ejemplo, una región Fc. Aún en otros casos, el resto no de polipéptido se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), ácido polisialílico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, y cualquier combinación de los mismos. En ciertos casos, la proteína FVIII comprende una primera cadena de polipéptidos y una segunda cadena de polipéptidos, en donde la primera cadena de polipéptidos comprende FVIII y una primera región Fc y la segunda cadena de polipéptidos comprende una segunda región Fc sin FVIII.

En otro caso, el fragmento de VWF prolonga la semivida de FVIII. La secuencia de aminoácidos del dominio D' puede ser al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a los aminoácidos 764 a 866 de SEQ ID NO: 2. Por tanto, la secuencia de aminoácidos del dominio D3 puede ser al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a los aminoácidos 867 a 1240 de SEQ ID NO: 2. En ciertos casos, el fragmento de VWF contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un resto correspondiente al resto 1099, resto 1142, o ambos, de SEQ ID NO: 2. En un caso particular, un fragmento de VWF comprende, consiste esencialmente en, o consiste en los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 2. El fragmento de VWF puede comprender además el dominio D1, el dominio D2, o los dominios D1 y D2 de VWF. En algunos casos, el fragmento de VWF comprende además un dominio de VWF seleccionado del grupo que consiste en el dominio A1, el dominio A2, el dominio A3, el dominio D4, el dominio B1, el dominio B2, el dominio B3, el dominio C1, el dominio C2, el dominio CK, uno o más fragmentos de los mismos, y cualquier combinación de los mismos. En otros casos, el fragmento de VWF está pegilado, glucosilado, hesilado, o polisialilado.

La presente divulgación también se refiere a una proteína quimérica que comprende un fragmento de VWF descrito en el presente documento, un resto heterólogo, y un conector opcional entre el fragmento de VWF y el resto heterólogo. El resto heterólogo puede ser un polipéptido, un resto no de polipéptido, o ambos. En un caso, el resto heterólogo de polipéptido se selecciona del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, y cualquier combinación de los mismos. En otro caso, el resto no de polipéptido heterólogo se selecciona de grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), ácido polisialílico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, y cualquier combinación de los mismos. En un caso particular, el resto heterólogo es una primera región Fc. La proteína quimérica puede comprender además una segunda región Fc, en donde la segunda región Fc se une o asocia a la primera región Fc o se une o asocia al fragmento de VWF.

En un aspecto, una proteína quimérica de la divulgación comprende una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:

- (aa) V-L1-H1-L2-H2,
- (bb) H2-L2-H1-L1-V,
- (cc) H1-L1-V-L2-H2, y
- (dd) H2-L2-V-L1-H1,

en donde V es uno o más de los fragmentos de VWF descritos en el presente documento,

cada uno de L1 y L2 es un conector opcional;

H1 es un primer resto heterólogo;

(-) es un enlace peptídico o uno o más aminoácidos; y

H2 es un segundo resto heterólogo opcional.

En un caso, H1 es un primer resto heterólogo, por ejemplo, una molécula que prolonga la semivida que se conoce en la técnica. En un caso, el primer resto heterólogo es un polipéptido. El primer resto heterólogo de polipéptido se selecciona del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, y cualquier combinación de los mismos. En otro caso, H1 es un resto no de polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), ácido polisialílico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, y cualquier combinación de los mismos. H2 es un segundo resto heterólogo opcional, por ejemplo, una molécula que prolonga la semivida que se conoce en la técnica. En un caso, el segundo resto heterólogo se puede seleccionar del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, y cualquier combinación de los mismos. En otro caso, H2 es un resto no de polipéptido, que se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), ácido polisialílico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, y cualquier combinación de los mismos. En ciertos casos, H1 es una primera región Fc y H2 es una segunda región Fc. La primera región Fc y la segunda región Fc pueden ser iguales o diferentes y se pueden unir entre sí por un conector o un enlace covalente, por ejemplo, un enlace disulfuro. En otro caso, la segunda región Fc se une o asocia a una proteína factor VIII. Opcionalmente, también podría ser un tercer resto heterólogo, H3, que es un prolongador de la semivida, que se une al fragmento de VWF, el primer resto heterólogo, o el segundo resto heterólogo. Los ejemplos no limitantes del tercer resto heterólogo pueden incluir un polipéptido o un resto no de polipéptido, o ambos. En un caso, el tercer resto heterólogo de polipéptido se puede seleccionar del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, o cualquier combinación de los mismos. En otro

caso, H2 es un resto no de polipéptido, que se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), ácido polisiálico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, y cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, H3 se une al fragmento de VWF o el primer o el segundo resto heterólogo por un conector escindible, por ejemplo, un conector escindible de trombina. Los ejemplos no limitantes de los conectores se desvelan en cualquier parte en el presente documento.

En una realización, la proteína quimérica comprende un fragmento de VWF descrito en el presente documento, que se une a un resto heterólogo. El resto heterólogo puede ser un resto que prolonga la semivida de la proteína, que comprende un polipéptido, un resto no de polipéptido, o ambos. Los ejemplos de dicho resto heterólogo de polipéptido incluyen, por ejemplo, una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, cualquier derivado o variante de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de un resto no de polipéptido incluyen, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), ácido polisiálico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el resto heterólogo es una primera región Fc unida al fragmento de VWF. En otras realizaciones, la proteína quimérica comprende además una segunda región Fc unida a la proteína FVIII. El fragmento de VWF o la proteína FVIII se pueden unir a la primera región Fc o la segunda región Fc, respectivamente, por un conector. En otras realizaciones más, una proteína quimérica comprende un fragmento de VWF descrito en el presente documento unido a un primer resto heterólogo, por ejemplo, primera región Fc, y una proteína FVIII unida a un segundo resto heterólogo, por ejemplo, segunda región Fc, en donde el fragmento de VWF se une además al segundo resto heterólogo (por ejemplo, segunda región Fc) o la proteína FVIII por un conector o por enlace covalente, o el primer resto heterólogo (por ejemplo, región Fc) se une además a la proteína FVIII o el segundo resto heterólogo (por ejemplo, segunda región Fc) por un conector o un enlace covalente. En algunas realizaciones, el FVIII de la proteína quimérica tiene un dominio B parcial. En algunas realizaciones, la proteína FVIII con un dominio B parcial es FVIII198 (SEQ ID NO: 105). En otras realizaciones, la proteína quimérica comprende además un motivo de reconocimiento de sortasa.

En algunas realizaciones, como resultado de la invención, la semivida de la proteína FVIII se prolonga en comparación con una proteína FVIII sin el fragmento de VWF o FVIII no mutante. La semivida de la proteína FVIII es al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, o al menos aproximadamente 12 veces más larga que la semivida de una proteína FVIII sin el fragmento de VWF. En una realización, la semivida de FVIII es aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 20 veces, aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 15 veces, o aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 10 veces más larga que la semivida de FVIII no mutante. En otra realización, la semivida de FVIII se prolonga aproximadamente 2 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 3 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 7 veces, o aproximadamente 6 veces a aproximadamente 8 veces en comparación con FVIII no mutante o una proteína FVIII sin el fragmento de VWF. En otras realizaciones, la semivida de FVIII es al menos aproximadamente 17 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 19 horas, al menos aproximadamente 20 horas, al menos aproximadamente 21 horas, al menos aproximadamente 22 horas, al menos aproximadamente 23 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 25 horas, al menos aproximadamente 26 horas, al menos aproximadamente 27 horas, al menos aproximadamente 28 horas, al menos aproximadamente 29 horas, al menos aproximadamente 30 horas, al menos aproximadamente 31 horas, al menos aproximadamente 32 horas, al menos aproximadamente 33 horas, al menos aproximadamente 34 horas, al menos aproximadamente 35 horas, al menos aproximadamente 36 horas, al menos aproximadamente 48 horas, al menos aproximadamente 60 horas, al menos aproximadamente 72 horas, al menos aproximadamente 84 horas, al menos aproximadamente 96 horas, o al menos aproximadamente 108 horas. En otras realizaciones más, la semivida de FVIII es aproximadamente 15 horas a aproximadamente dos semanas, aproximadamente 16 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 17 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 18 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 19 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 20 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 21 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 22 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 23 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 24 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 36 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 48 horas a

aproximadamente una semana, aproximadamente 60 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 24 horas a aproximadamente seis días, aproximadamente 24 horas a aproximadamente cinco días, aproximadamente 24 horas a aproximadamente cuatro días, aproximadamente 24 horas a aproximadamente tres días, o aproximadamente 24 horas a aproximadamente dos días.

- 5 En algunas realizaciones, la semivida promedio de la proteína FVIII por sujeto es aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas (1 día), aproximadamente 25 horas, aproximadamente 26 horas, aproximadamente 27 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 29 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 33 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 44 horas, aproximadamente 48 horas (2 días), aproximadamente 54 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas (3 días), aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas (4 días), aproximadamente 108 horas, aproximadamente 120 horas (5 días), aproximadamente seis días, aproximadamente siete días (una semana), aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, o aproximadamente 14 días.

En otro aspecto, una proteína quimérica de la invención comprende una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) V-L1-H1-L3- C-L2-H2,
 20 (b) H2-L2-C- L3- H1-L1-V,
 (c) C-L2-H2- L3- V-L1-H1,
 (d) H1-L1-V- L3-H2-L2-C,
 (e) H1-L1-V-L3-C-L2-H2,
 (f) H2-L2-C- L3- V-L1-H1,
 25 (g) V-L1-H1-L3- H2-L2-C,
 (h) C-L2-H2- L3- H1-L1-V,
 (i) H2-L3-H1-L1-V-L2-C,
 (j) C-L2-V-L1-H1-L3-H2,
 (k) V-L2-C-L1-H1-L3-H2, y
 30 (l) H2-L3-H1-L1-C-L2-V,

en donde V es un fragmento de VWF descrito en el presente documento;

cada uno de L1 o L2 es un conector opcional, por ejemplo, un conector escindible de trombina;

L3 es un conector opcional, por ejemplo, conector scFc, por ejemplo, un conector procesable;

cada uno de H1 o H2 es un resto heterólogo opcional; y

- 35 C es una proteína FVIII; y

(-) es un enlace peptídico o uno o más aminoácidos.

En otros aspectos, una proteína quimérica de la invención comprende una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:

- (m) V-L1-H1: H2-L2-C,
 40 (n) V-L1-H1:C-L2-H2,
 (o) H1-L1-V:H2-L2-C,
 (p) H1-L1-V:C-L2-H2,
 (q) V:C-L1-H1:H2,
 (r) V:H1-L1-C:H2,

(s) H2:H1-L1-C:V,

(t) C:V-L1-H1:H2, y

(u) C:H1-L1-V:H2,

en donde V es un fragmento de VWF descrito en el presente documento;

5 cada uno de L1 o L2 es un conector opcional, por ejemplo, un conector escindible de trombina;

cada uno de H1 o H2 es un resto heterólogo opcional; y

C es una proteína FVIII;

(-) es un enlace peptídico o uno o más aminoácidos; y

(:) es un enlace covalente entre H1 y H2, entre V y C, y entre V y H1 y C y H2. (:) representa al menos un
 10 enlace no peptídico. En ciertas realizaciones, la asociación química, es decir, (:) es un enlace covalente. En
 algunas realizaciones, la asociación entre H1 y H2 es un enlace covalente, por ejemplo, un enlace disulfuro.
 En otras realizaciones, (:) es un enlace covalente no peptídico. En otras realizaciones más, (:) es un enlace
 15 peptídico. En una realización, H1 es un primer resto heterólogo. En una realización, el primer resto
 heterólogo es capaz de prolongar la semivida de la actividad de FVIII. En otra realización, el primer resto
 heterólogo es un polipéptido, un resto no de polipéptido, o ambos. En una realización, el primer resto
 heterólogo de polipéptido se puede seleccionar del grupo que consiste en una región constante de
 20 inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o fragmento de la misma, un resto de unión a
 albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, y
 cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el resto no de polipéptido se selecciona del grupo
 que consiste en polietilenglicol (PEG), ácido polisialico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los
 25 mismos, y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, H2 es un segundo resto
 heterólogo. El segundo resto heterólogo también puede ser un prolongador de la semivida conocido en la
 técnica y puede ser un polipéptido, un resto no de polipéptido, o una combinación de ambos. En una
 realización, el segundo resto heterólogo se selecciona del grupo que consiste en una región constante de
 30 inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o fragmento de la misma, un resto de unión a
 albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, y
 cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el resto no de polipéptido se selecciona del
 grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), ácido polisialico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los
 35 mismos, y cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, H1 es una primera región
 Fc. En algunas realizaciones, H2 es una segunda región Fc. Opcionalmente, también podría ser un tercer
 resto heterólogo, H3, que es un prolongador de la semivida. H3 se puede unir a uno o más de V, C, H1 o
 H2 por un conector opcional, por ejemplo, un conector escindible, por ejemplo, un conector escindible de
 trombina. Los ejemplos no limitantes del tercer resto heterólogo pueden incluir una región constante de
 inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, polietilenglicol (PEG),
 una secuencia de PAS, y hidroxietilalmidón (HES) o un derivado del mismo.

En ciertas realizaciones, uno o más de los conectores usados para conectar el fragmento de VWF, la proteína FVIII,
 el primer resto heterólogo, y/o el segundo resto heterólogo de las fórmulas (a) a (u) entre sí es un conector
 escindible. Uno o más de los sitios de escisión usados en la proteína química se pueden escindir por una proteasa
 40 seleccionada del grupo que consiste en factor XIa, factor XIIa, calicreína, factor VIIa, factor IXa, factor Xa, factor IIa
 (trombina), elastasa-2, granzima-B, TEV, enterocinasa, proteasa 3C, sortasa A, MMP-12, MMP-13, MMP-17 y MMP-
 20. En otras realizaciones, uno o más conectores usados en las fórmulas (a) a (l) (por ejemplo, L3) comprenden un
 conector procesable. Los conectores procesables se pueden escindir por una enzima intracelular tras la secreción.
 El conector procesable puede comprender un primer sitio de escisión (P1) en la región del extremo N del conector,
 un segundo sitio de escisión (P2) en la región del extremo C del conector, o ambos.

45 En algunas realizaciones, uno o más de los conectores usados en la invención tienen una longitud de al menos
 aproximadamente 1 a 2000 aminoácidos. En una realización específica, uno o más de los conectores usados en la
 invención tienen una longitud de al menos aproximadamente 20, 35, 42, 48, 73, 98, 144, 288, 324, 576 u 864
 aminoácidos. En una realización particular, uno o más de los conectores comprenden un péptido gly/ser. El péptido
 gly/ser puede ser (Gly4 Ser)₃ o (Gly4 Ser)₄.

50 En otros aspectos, una proteína FVIII en una proteína química es una proteína funcional factor VIII. La proteína
 FVIII puede comprender uno o más dominios de FVIII seleccionados del grupo que consiste en el dominio A1, el
 dominio A2, el dominio B, el dominio A3, el dominio C1, el dominio C2, uno o más fragmentos de los mismos, y
 cualquier combinación de los mismos. En una realización, la proteína FVIII comprende el dominio B o una porción
 del mismo. En otra realización, la proteína FVIII es SQ FVIII de dominio B delecionado. En otras realizaciones, la
 55 proteína FVIII comprende FVIII de cadena sencilla. En otras realizaciones más, la proteína FVIII comprende una
 cadena pesada de FVIII y una cadena ligera de factor VIII, en donde la cadena pesada y la cadena ligera se asocian
 entre sí por un enlace metálico. En ciertas realizaciones, la proteína FVIII tiene una baja afinidad por o no se une a

una proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP). Por ejemplo, una proteína FVIII útil para la invención puede contener al menos una sustitución de aminoácidos que reduce la afinidad por o elimina la unión a la LRP. Los ejemplos no limitantes de la al menos una sustitución de aminoácidos es en un resto correspondiente al resto 471, resto 484, resto 487, resto 490, resto 497, resto 2092, resto 2093, o dos o más combinaciones de los mismos, de FVIII maduro de longitud completa. En algunas realizaciones, la proteína FVIII en una proteína quimérica de la presente invención contiene al menos una sustitución de aminoácidos, que induce que la proteína FVIII sea más estable que una proteína FVIII sin la sustitución. En otras realizaciones, la proteína FVIII contiene al menos una sustitución de aminoácidos en el dominio A2 y al menos una sustitución de aminoácidos en el dominio A3, en donde el dominio A2 y el dominio A3 se asocian entre sí por un enlace covalente. Los ejemplos no limitantes de la sustitución de aminoácidos en el dominio A2 es en un resto correspondiente al resto 662 o 664 de FVIII maduro de longitud completa. Además, los ejemplos no limitantes de la sustitución de aminoácidos en el dominio A3 es en un resto correspondiente al resto 1826 o 1828 de FVIII maduro de longitud completa que está polisialilado.

En aspectos adicionales, la divulgación proporciona un polinucleótido que codifica un fragmento de VWF descrito en el presente documento o una proteína quimérica descrita en el presente documento, o un conjunto de polinucleótidos que comprende una primera cadena de nucleótido y una segunda cadena de nucleótido, en donde la primera cadena de nucleótido codifica el fragmento de VWF y la segunda cadena de nucleótido codifica la segunda región Fc o el factor de coagulación o fragmento del mismo de la proteína quimérica. En un caso, el conjunto de polinucleótidos comprende además una tercera cadena de polinucleótido, que codifica una proproteína convertasa que pertenece a la familia de proproteínas convertasa de tipo subtilisina. Los ejemplos no limitantes de la proproteína convertasa incluyen proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 3 (PACE o PCSK3), proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 5 (PCSK5 o PC5), proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 7 (PCSK7 o PC7), o una levadura Kex 2. Aún en otros aspectos, la divulgación incluye un vector que comprende el polinucleótido o el conjunto de polinucleótidos y uno o más promotores operativamente unidos al polinucleótido o el conjunto de polinucleótidos o un conjunto de vectores que comprende un primer vector y un segundo vector, en donde el primer vector codifica la primera cadena de polinucleótido del conjunto de polinucleótidos y el segundo vector codifica la segunda cadena de polinucleótido del conjunto de polinucleótidos. El conjunto de vectores puede comprender además un tercer vector, que comprende una tercera cadena de polinucleótido que codifica PC5 o PC7. En algunos casos, el vector comprende además PACE. En algunos casos, PACE escinde los dominios D1D2 del fragmento de VWF.

En algunos aspectos, la divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende el fragmento de VWF, la proteína quimérica, el polinucleótido, el conjunto de polinucleótidos, el vector, o el conjunto de vectores, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición de la presente divulgación puede prolongar la semivida del factor VIII. En otros aspectos, la divulgación incluye una célula hospedadora que comprende el polinucleótido, el conjunto de polinucleótidos, el vector, o los conjuntos de vectores.

En otros aspectos, la presente divulgación se refiere a una proteína quimérica que comprende una proteína FVIII, un resto auxiliar y un conector opcional, en donde el resto auxiliar inhibe o previene que VWF endógeno se una a la proteína FVIII y tiene al menos una propiedad protectora de FVIII de tipo VWF. La propiedad protectora de FVIII de tipo VWF comprende proteger la proteína FVIII de una o más escisiones de proteasa, proteger la proteína FVIII de la activación, estabilización de la cadena pesada y/o la cadena ligera de la proteína FVIII, o prevenir la eliminación de la proteína FVIII por uno o más receptores depuradores.

El resto auxiliar en la proteína quimérica puede inhibir o prevenir que VWF endógeno se una a la proteína FVIII por protección o bloqueo de un sitio de unión de VWF sobre la proteína FVIII. En algunos casos, el sitio de unión de VWF se localiza en el dominio A3 o el dominio C2 de la proteína FVIII, o ambos, el dominio A3 y el dominio C2 de la proteína FVIII. En otro caso, el sitio de unión de VWF es la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 1669 a 1689 y 2303 a 2332 de SEQ ID NO: 16. En algunos casos, el resto auxiliar es un polipéptido, un resto no de polipéptido, o ambos. El polipéptido útil como resto auxiliar puede comprender una secuencia de aminoácidos de al menos 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, el polipéptido útil como resto auxiliar se puede seleccionar del grupo que consiste en un fragmento de VWF, una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, otras tecnologías que prolongan la semivida, y cualquier combinación de los mismos. El resto no de polipéptido útil como resto auxiliar se puede seleccionar del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico, hidroxietilalmidón (HES) o un derivado del mismo, y cualquier combinación de los mismos. En un caso, el resto auxiliar es el fragmento de VWF descrito en el presente documento. El resto auxiliar y la proteína FVIII se pueden unir, por ejemplo, por un conector, o asociarse entre sí. El conector puede comprender un conector escindible, por ejemplo, un conector escindible de trombina.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método de prevención o inhibición de la unión de una proteína FVIII con VWF endógeno que comprende añadir una cantidad eficaz del fragmento de VWF, la proteína quimérica, el polinucleótido, o el conjunto de polinucleótidos, a una célula que comprende una proteína FVIII o un polinucleótido que codifica la proteína FVIII, en donde el fragmento de VWF se une a la proteína FVIII. En otro aspecto, la divulgación incluye un método de prevención o inhibición de la unión de la proteína FVIII con VWF endógeno que comprende añadir una cantidad eficaz de la proteína quimérica, el polinucleótido, o el conjunto de polinucleótidos, a

un sujeto en necesidad del mismo, en donde el fragmento de VWF se une a la proteína FVIII y así previene o inhibe la unión de la proteína FVIII. En algunos aspectos, la divulgación incluye un método de prolongación o aumento de la semivida de una proteína FVIII, en donde el método comprende añadir una cantidad eficaz del fragmento de VWF, la proteína quimérica, el polinucleótido, o el conjunto de polinucleótidos, a una célula que comprende una proteína FVIII o un polinucleótido que codifica la proteína FVIII, o a un sujeto en necesidad del mismo, en donde el fragmento de VWF se une a la proteína FVIII. En otros aspectos, la divulgación se refiere a un método de prevención o inhibición de la eliminación de una proteína FVIII de una célula, en donde el método comprende añadir una cantidad eficaz del fragmento de VWF, la proteína quimérica, el polinucleótido, o el conjunto de polinucleótidos, a una célula que comprende una proteína FVIII o un polinucleótido que codifica la proteína FVIII, o a un sujeto en necesidad del mismo, en donde el fragmento de VWF se une a la proteína FVIII.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad hemorrágica o trastorno en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar una cantidad eficaz del fragmento de VWF, la proteína quimérica, el polinucleótido, o el conjunto de polinucleótidos, en donde la enfermedad hemorrágica o trastorno se selecciona del grupo que consiste en un trastorno hemorrágico de la coagulación, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia dentro de los músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo craneal, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de huesos, sangrado del sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal y sangrado en la vaina del iliopsoas. En otros casos, el tratamiento es profiláctico o a demanda. Aún en otros casos, la divulgación es un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a enfermedad de von Willebrand de tipo 2N para un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar una cantidad eficaz del fragmento de VWF, la proteína quimérica, el polinucleótido, o el conjunto de polinucleótidos, en donde se trata la enfermedad o trastorno.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

Figura 1A-F. Diagramas esquemáticos de proteínas VWF. La Fig. 1A muestra dos fragmentos de VWF que contienen los aminoácidos 1 a 276 de SEQ ID NO: 73 (aminoácidos 764 a 1039 de SEQ ID NO: 2). VWF-001 se sintetiza sin las secuencias de pre/propéptidos de VWF, mientras que VWF-009 se sintetiza con las secuencias de pre/propéptidos (dominios D1 y D2). El propéptido de VWF-009 se escinde durante la síntesis, y VWF-009 contiene el propéptido con las secuencias de los dominios D' y D3. La Fig. 1B muestra tres fragmentos de VWF que contienen los aminoácidos 1 a 477 de SEQ ID NO: 73 (aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 2). VWF-002 se sintetiza sin las secuencias de pre/propéptidos. VWF-010 contiene los dominios D1D2, además de los dominios D'D3. VWF-013 contiene los dominios D1D2D'D3, además de restos de alanina que sustituyen cisteínas en los restos 336 y 379 de SEQ ID NO: 72. La Fig. 1C muestra dos fragmentos de VWF que contienen los dominios D'D3 y una porción del dominio A1. VWF-003 tiene los aminoácidos 764 a 1274 de SEQ ID NO: 2). VWF-011 contiene los dominios D1D2, además de los dominios D'D3. La Fig. 1D muestra dos construcciones, VWF-004 y VWF-012. VWF-004 contiene los dominios D'D3 y la secuencia completa del dominio A1. VWF-012 contiene los dominios D1D2D'D3 y la secuencia completa del dominio A1. La Fig. 1E muestra tres construcciones. VWF-006 contiene los dominios D1D2D'D3 y el dominio CK de VWF (dominio de nudo de cisteína). VWF-008 es VWF de longitud completa. VWF-031 (VWF-Fc) muestra una construcción que contiene los dominios D1D2D'D3 unidos a una única región Fc por un conector escindible. VWF-053 es los dominios D1D2. La Fig. 1F muestra la proteína VWF de longitud completa que comprende propéptido (los dominios D1 y D2) y subunidades maduras (los dominios D', D3, A1, A2, A3, D4, B1-3, C1-2). La proteína VWF es proteína de aproximadamente 250 kDa y forma los multímeros (> 20 MDa) por enlace disulfuro. La proteína VWF se asocia con FVIII (95-98 %) en un complejo no covalente y entonces prolonga la semivida de FVIII protegiendo FVIII de la escisión/activación por proteasa, estabilizando la cadena pesada y ligera, y previniendo la eliminación de FVIII por receptores depuradores. La proteína VWF también puede limitar la semivida de FVIII por eliminación del complejo FVIII-VWF mediante receptores de VWF y prevenir la pinocitosis y recirculación de rFVIII-Fc.

Figura 2. Diagramas esquemáticos de los ejemplos de construcciones de heterodímeros VWF:FVIII. La construcción izquierda muestra un fragmento de VWF que tiene los dominios D'D3 de VWF de longitud completa (aminoácidos 1-477 de SEQ ID NO: 73) y que contiene sustituciones de alanina en los restos 336 y 379 de SEQ ID NO: 72. La construcción de proteína quimérica (FVIII 064/065) comprende el extremo C de un fragmento de VWF unido a una primera región Fc por un conector y FVIII se une a una segunda región Fc, en donde la segunda región Fc se une además al extremo N de un fragmento de VWF por un conector (por ejemplo, fórmula C-H1-L1-V-L2-H2, en donde V es un fragmento de VWF, C es FVIII, H1 y H2 son regiones Fc, y L1 y L2 son conectores escindibles). La construcción en la Figura 2b es una construcción de heterodímero VWF:FVIII intracelularmente procesada donde se ha escindido el conector entre la segunda Fc y el extremo N del fragmento de VWF. FVIII-064 contiene los dominios D'D3 de VWF (aminoácidos 1 a 477 de SEQ ID NO: 73 con sustituciones C336A y C379). FVIII-065 contiene los dominios D'D3 de VWF (aminoácidos 1 a 276 de SEQ ID NO: 73). FVIII-136 contiene FVIII-Fc unido al fragmento Fc de D'D3 por un conector que se puede procesar por una enzima proteasa intracelular. Cuando se expresa FVIII-136, la enzima escinde el conector entre la segunda Fc (fusionada con FVIII-LC) y el fragmento D'D3 de VWF (fusionado con la primera Fc), mientras que la región Fc fusionada con (o unida a) FVIII-LC forma un enlace covalente (por ejemplo, un enlace disulfuro) con la primera Fc fusionada con (o unida a) el fragmento de VWF. FVIII-148 es FVIII-Fc de cadena

sencilla con el fragmento D'D3 (un FVIII de cadena sencilla introduciendo la mutación R1645A/R1648A dentro del gen FVIII).

Figura 3. Diagramas esquemáticos de los ejemplos de construcciones de heterodímeros VWF:FVIII que contienen ejemplos de conectores variables entre VWF y Fc. Las construcciones (FVIII-064, FVIII-159, FVIII-160, FVIII-178 y FVIII-179) tienen la estructura común representada como la fórmula C-H1-L1-V-L2-H2, pero contienen ejemplos de diferentes conectores o sustituciones de aminoácidos. Las construcciones mostradas contienen el mismo fragmento de VWF, que es los dominios D' y D3 de VWF (es decir, aminoácidos 1 a 477 de SEQ ID NO: 73 con sustituciones de aminoácidos C336A y C379A). La construcción FVIII 64 tiene un conector escindible de trombina (es decir, L2) entre el fragmento de VWF y Fc (es decir, H2), que tiene 20 aminoácidos. La construcción FVIII 159 tiene un conector escindible de trombina (es decir, L2) entre el fragmento de VWF y Fc (es decir, H2), que tiene 35 aminoácidos. La construcción FVIII 160 tiene un conector escindible de trombina (es decir, L2) entre el fragmento de VWF y Fc (es decir, H2), que tiene 48 aminoácidos. Las construcciones FVIII-180, FVIII-181 y FVIII-182 son derivados de FVIII-160 que contienen la mutación K2092A en el dominio C1 de FVIII, la mutación K2093A en el dominio C1 de FVIII, y las mutaciones K2092A/K2093A en el dominio C1 de FVIII, respectivamente. La construcción FVIII-178 tiene un conector escindible de trombina (es decir, L2) entre el fragmento de VWF y Fc (es decir, H2), que tiene 73 aminoácidos. La construcción FVIII-179 tiene un conector escindible de trombina (es decir, L2) entre el fragmento de VWF y Fc (es decir, H2), que tiene 98 aminoácidos.

Figura 4: Diagramas esquemáticos de los ejemplos de construcciones FVIII-VWF, en las que VWF es el fragmento D1D2D'D3 de VWF, el conector es un conector de longitud variable que contiene un sitio de escisión, por ejemplo, un sitio de escisión de trombina, SCFVIII es FVIII de cadena sencilla, que contiene las sustituciones R1645A/R1648A, H es un resto heterólogo, por ejemplo, una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, un resto para conjugar polietilenglicol (PEG) y/o PEG, una albúmina o fragmento de albúmina, un resto de unión a albúmina, una secuencia de HAP, un resto para polisialilación y/o ácido polisialílico, un resto para hidroxietilalmidón (HES) y/o HES, o una secuencia de PAS, etc., FVIII HC es una cadena pesada de FVIII, FVIII LC es una cadena ligera de FVIII, y Fc es una región Fc de una región constante de inmunoglobulina. La Figura 4A tiene una fórmula de VWF-Conector-SCFVIII. La Figura 4B tiene una fórmula de VWF-Conector-H-Conector-SCFVIII. Los conectores (el primer conector entre VWF y H y el segundo conector entre H y SCFVIII) pueden ser idénticos o diferentes. La Figura 4C tiene una fórmula de VWF-Conector-SCFVIII-Conector-H. Los conectores (el primer conector entre VWF y SCFVIII y el segundo conector entre SCFVIII y H) pueden ser idénticos o diferentes. La Figura 4D tiene una fórmula de VWF-Conector-FVIII HC-H-Conector-FVIII LC. Los conectores (el primer conector entre VWF y FVIII HC y el segundo conector entre H y FVIII LC) pueden ser idénticos o diferentes. La Figura 4E tiene una fórmula de FVIII HC-H-FVIII LC-Conector-primera Fc-Conector-VWF-Conector-segunda Fc. Los conectores (el primer conector entre FVIII LC y la primera Fc, el segundo conector entre la primera Fc y VWF, y el tercer conector entre VWF y la segunda Fc) pueden ser idénticos o diferentes. Los conectores pueden ser un conector escindible. Por ejemplo, el conector entre la primera Fc y VWF puede ser un conector escindible que comprende un sitio de escisión en el extremo N y/o el extremo C del conector. La primera Fc y la segunda Fc pueden ser idénticas o diferentes. La Figura 4F tiene una fórmula de FVIII HC-H-FVIII LC-Conector-primera Fc-Conector-VWF-Conector-segunda Fc. Los conectores (el primer conector entre FVIII LC y primera Fc, el segundo conector entre primera Fc y VWF, y el tercer conector entre VWF y segunda Fc) pueden ser idénticos o diferentes. Uno o más conectores pueden ser un conector escindible. Por ejemplo, el conector entre la primera Fc y VWF puede ser un conector escindible que comprende un sitio de escisión en el extremo N y/o el extremo C del conector. La primera Fc y la segunda Fc pueden ser idénticas o diferentes. La Figura 4G tiene una fórmula de SCFVIII-Conector-Fc-Conector-VWF-H-Conector-Fc. La Figura 4H tiene una fórmula de SCFVIII pegilado o hesilado-Conector-Fc-Conector-VWF-H-Conector-Fc. Los conectores (el primer conector entre SCFVIII y primera Fc, el segundo conector entre primera Fc y VWF, y el tercer conector entre H y segunda Fc) pueden ser idénticos o diferentes. Uno o más conectores pueden ser un conector escindible. Por ejemplo, el conector entre la primera Fc y VWF puede ser un conector escindible que comprende un sitio de escisión en el extremo N y/o el extremo C del conector. La primera Fc y la segunda Fc pueden ser idénticas o diferentes.

Figura 5. Diagramas esquemáticos del sistema de co-transfección de heterodímeros FVIII-VWF. La construcción FVIII-155 contiene la secuencia de FVIII de longitud completa (sustituyendo un resto de alanina los restos de arginina en 1645 y 1648) unida a una región Fc. VWF-031 contiene el fragmento D1D2D'D3 (sustituyendo un resto de alanina los restos de cisteína en 336 y 379) que se une a otra región Fc con un conector escindible de trombina de 48. Después del procesamiento intracelular, la construcción FVIII-155 produce un FVIII de cadena sencilla (SCFVIII) de longitud completa fusionado con un fragmento Fc, la construcción VWF-031 produce un fragmento D'D3 de 477 aminoácidos unido a otro fragmento Fc. Se pueden formar dos enlaces covalentes entre los fragmentos Fc que se unen a SCFVIII o el fragmento D'D3, esto permite a su vez una asociación covalente de FVIII y D'D3, que es el carácter principal del producto final deseado.

La Figura 6 es una SDS-PAGE no reductora y reductora de VWF-009 (D1D2D'D3 1-276 aa x 6 HIS), que muestra que VWF-009 existe como un monómero. Sin procesar significa VWF-009 con el propéptido (los dominios D1D2).

5 La Figura 7 es la SDS-PAGE no reductora y reductora de VWF-002 (D'D3 1-477 aa x 6 his) o VWF-010 (D1D2D'D3 1-477 aa x 6 his), que muestra que VWF-002 existe como un monómero y VWF-010 existe como un dímero.

10 La Figura 8 muestra la digestión con trombina del heterodímero FVIII-VWF mostrado en la Figura 2(b). El carril 1 muestra marcador. El carril 2 es rFVIII-Fc sin trombina. El carril 3 es rFVIII-Fc con trombina. El carril 5 es FVIII-Fc-VWF. El carril 6 muestra FVIII-Fc-VWF y trombina. A1 indica dominio A1 de FVIII, A2 indica dominio A2 de FVIII, y Δa3 LC indica la cadena ligera de FVIII.

La Figura 9A-B muestra la actividad de FVIII medida por un ensayo cromogénico de FVIII. La Fig. 9A muestra el perfil farmacocinético de rFVIII y rFVIII-Fc en ratón HemA. La Fig. 9B muestra el perfil PK de rFVIII y rFVIII-Fc en el ratón doblemente inactivado (DKO) en FVIII/VWF. El eje Y muestra la actividad de FVIII en mUI/mL, y el eje X muestra el tiempo.

15 La Figura 10A-B muestra la protección de FVIII por los fragmentos D'D3 como se muestra por el nivel de mFVIII en plasma (mUI/mL) y el nivel de expresión de VWF (nM/mL) 48 horas después de la inyección de plásmido. Los fragmentos de VWF usados para mostrar la protección de FVIII son VWF-001 (276 aa, monómero), VWF-009 (276 aa, monómero), VWF-002 (477 aa, monómero), VWF-010 (477 aa, dímero), VWF-003 (511 aa, monómero), VWF-011 (511 aa, dímero), VWF-004 (716 aa, monómero), VWF-012 (716 aa, dímero), VWF-006 y VWF-008.

20 La Figura 11 muestra el perfil farmacocinético de rBDD-FVIII en ratones DKO FVIII-VWF cuando se co-administran con fragmentos D'D3. La Figura 11A muestra la actividad de FVIII (mUI/mL) medida por un ensayo cromogénico de FVIII después de la co-administración de rBDD-FVIII y VWF-002 o rBDD-FVIII y VWF-010 o rBDD-FVIII solo en ratones DKO FVIII/VWF. La Fig. 11B muestra el nivel de VWF-002 y VWF-010 en plasma (ng/mL) después de la administración. El eje X representa el tiempo en horas.

30 La Figura 12 muestra el perfil farmacocinético de rFVIII-Fc en ratones que expresan D'D3 de VWF. La Figura 12A muestra la cronología de la inyección hidrodinámica (HDI) del dominio D'D3 que codifica ADN de plásmido (día -5), dosis intravenosa de rFVIII-Fc (día 0) y recogida de muestras PK (día 0 - día 3). La Figura 12B muestra la actividad de FVIII en plasma posterior a la infusión de rFVIII-Fc (mUI/mL) medida por un ensayo cromogénico de FVIII en ratones DKO FVIII/VWF con HDI de los dominios D1D2D'D3 (477 aa) (círculo) y los dominios D1D2D'D3 (477 aa) con sustituciones de cisteína (rectángulo) en ratones DKO FVIII/VWF. La actividad de FVIII en ratones de control sin HDI de los dominios D'D3 se muestra como un triángulo. La Fig. 10C muestra el nivel de D'D3 en plasma (ng/mL) después de la administración por HDI de la construcción de ADN de dímero de D1D2D'D3 o monómero de D1D2D'D3. El eje X representa el tiempo en horas.

35 La Figura 13 muestra la selección de conector de D'D3-Fc por HDI en ratones DKO FVIII/VWF. Se insertaron diferentes longitudes de los conectores (20 aa (FVIII-064), 35 aa (FVIII-159), o 48 aa (FVIII-160)) entre los dominios D'D3 y la región Fc. Se midió la actividad de FVIII (mUI/mL) por un ensayo cromogénico de FVIII después de HDI en ratones DKO FVIII/VWF.

40 La Figura 14 muestra la HDI del heterodímero de FVIII-Fc de cadena sencilla/D'D3 en ratones DKO FVIII/VWF. Se midieron las actividades de FVIII de rFVIII-Fc-D'D3 (pSYN-FVIII-136) procesado (cadena doble) y rFVIII-Fc-D'D3 (pSYN-FVIII-148) de cadena sencilla 24 horas y 48 horas después de HDI.

La Figura 15 muestra la afinidad de unión del heterodímero FVIII-155/VWF-031 por hVWF inmovilizado por ensayo de Octet. También se usaron FVIII-Fc, FVIII e IgG como controles. El eje x muestra el tiempo en segundos, y el eje y muestra la unión en nanómetros (nm).

45 La Figura 16 muestra la farmacocinética de FVIII-155/VWF-031 en ratones deficientes en FVIII/VWF (DKO FVIII/VWF). El eje x indica el tiempo en horas, y el eje y indica la recuperación de FVIII frente a la entrada en porcentaje.

50 Figura 17: Diagramas esquemáticos de los ejemplos de construcciones de fragmentos de VWF, en las que VWF es el fragmento D1D2D'D3 de VWF; el conector es un conector de longitud variable que contiene un sitio de escisión, por ejemplo, un sitio de escisión de trombina; H es un resto heterólogo, por ejemplo, una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, un resto para conjugar polietilenglicol (PEG) y/o PEG, una albúmina o fragmento de albúmina, un resto de unión a albúmina, una secuencia de HAP, un resto para polisialilación y/o ácido polisialílico, un resto para hidroxietilalmidón (HES) y/o HES, o una secuencia de PAS, etc.; y Fc es una región Fc de una inmunoglobulina. La Figura 17A tiene una fórmula de D1D2-D'D3 parcial-H-D3 parcial-Conector-Fc. La Figura 17B tiene una fórmula de D1D2-D' parcial-H-D'D3 parcial-Conector-Fc. La Figura 17C tiene una fórmula de D1D2-D'D3 pegilado o hesilado-Conector-Fc. El conector puede estar opcionalmente escindido.

Figura 18: A) muestra que FVIII_{FC} pierde actividad de FVIII en tanto plasma de HemaA (diamante) como de DKO (cuadrado) con el tiempo. La actividad de FVIII se mide por el ensayo cromogénico. El eje x muestra el tiempo en horas, y el eje y muestra la actividad relativa. B) muestra que la pérdida en la actividad de FVIII es debida a la disociación o degradación de la cadena pesada (HC). El panel izquierdo muestra un ensayo de inmunoprecipitación usando anticuerpo policlonal de oveja anti-FVIII en gel al 4-15 % de Bio-rad. Se redujo el gel y se obtuvieron imágenes por el sistema de Bio-rad. El carril 1 muestra marcador sin tñir de Bio-rad; el carril 2 muestra FVIII_{FC} y PBS; el carril 3 muestra plasma de FVIII_{FC} y DKO; y el carril 5 muestra anticuerpo policlonal de oveja anti-FVIII solo. El panel derecho muestra análisis Western de gel usando anticuerpo de FVIII anti-cadena pesada (GMA012). El carril 1 muestra marcador sin tñir de Bio-rad; el carril 2 muestra FVIII_{FC} y PBS; el carril 3 muestra plasma de FVIII_{FC} y DKO; y el carril 4 muestra anticuerpo policlonal de oveja anti-FVIII solo.

Figura 19: muestra la actividad de FVIII de FVIII_{FC} no mutante (círculo), scFVIII_{FC} (FVIII de cadena sencilla) (triángulo relleno), o heterodímero FVIII:VWF (por ejemplo, FVIII155/VWF31) (triángulo blanco) por ensayo cromogénico en plasma de ratón DKO (panel izquierdo) y plasma de ratón HemaA (panel derecho) en función del tiempo. El eje y muestra la actividad relativa de FVIII. FVIII_{FC} no mutante contiene cadena doble de FVIII (es decir, cadena pesada de FVIII y cadena ligera de FVIII mantenidas juntas no covalentemente) y así tiene tres cadenas, una cadena pesada de FVIII, una cadena ligera de FVIII fusionada con una Fc, y una Fc sola. scFVIII_{FC} contiene un FVIII de cadena sencilla y así tiene dos cadenas, una con FVIII de cadena sencilla fusionada con una Fc y otra con una Fc sola. El heterodímero FVIII:VWF (por ejemplo, FVIII155/VWF31) contiene FVIII de cadena sencilla fusionado con una Fc y un fragmento de VWF (D'D3) fusionado con una Fc.

La Figura 20 muestra el procesamiento del dominio D1D2 del fragmento de VWF (por ejemplo, VWF-031(D1D2D'D3Fc)) por PC5 o PACE (furina) a diferentes concentraciones. El procesamiento de D1D2 se muestra en un gel al 4-15 % de Bio-rad en una condición reducida por generador de imágenes de Bio-rad. El carril 1 muestra VWF031 solo; el carril 2 muestra PC5 solo; el carril 3 muestra PACE solo; el carril 4 muestra VWF031 y PC5 a 2,5 %; el carril 5 muestra VWF031 y PC5 a 5 %; el carril 6 muestra VWF031 y PC5 a 7,5 %; el carril 7 muestra VWF031 y PC5 a 10 %; el carril 8 muestra VWF031 y PACE a 2,5 %; el carril 9 muestra VWF031 y PACE a 5 %; el carril 10 muestra VWF031 a 7,5 %; y el carril 11 muestra VWF031 y PACE a 10 %.

Figura 21: A) muestra que un ensayo de unión de un heterodímero FVIII:VWF (por ejemplo, FVIII-155/VWF-031) por el instrumento Octet de ForteBio. Para el ensayo, se capturó VWF de longitud completa usando sensor de APS. La unión de FVIII_{FC} y FVIII a VWF de longitud completa se muestra en el panel inferior izquierdo. La ausencia de unión de FVIIIY1680 (un mutante que no tiene afinidad por VWF) y el heterodímero FVIII:VWF (FVIII155/VWF031) se muestra en el panel inferior derecho. B) muestra otro ensayo de unión de un heterodímero FVIII:VWF (por ejemplo, FVIII-155/VWF-031). En este ensayo, las construcciones (construcción VWF031, FVIII-155/VWF031, o FVIII) se inmovilizaron sobre sensor de proteína G. Se midió la unión de las construcciones a FVIII.

La Figura 22 muestra la afinidad de unión de dominios D'D3 de VWF con la molécula FVIII medida por un experimento de resonancia plasmática superficial. Se capturó la construcción VWF031 (100 UR) por 1000 UR de anti-IgG humana. Se aplicó FVIII de dominio B delecionado en modo de cinética de ciclo único en ajuste 1:1. El número total fue 4.

La Figura 23 muestra los efectos de diferente longitud de conector en las construcciones de heterodímero FVIII_{FC}/VWF sobre la farmacocinética cuando se administran a ratones DKO FVIII/VWF. Se insertaron tres conectores diferentes (48 aa, 73aa, o 98aa) entre D'D3 y Fc, es decir, VWF031, VWF035 y VWF036. La actividad de FVIII normalizada al valor de 5 min (%) se muestra en el eje y.

La Figura 24 muestra ejemplos de unión de sortasa de un fragmento de VWF con FVIII. A) muestra dos construcciones de unión, (1) un fragmento de VWF fusionado con un motivo de reconocimiento de sortasa (por ejemplo, LPXTG) en el extremo C y (2) FVIII que tiene glicina (n) en el extremo N. Después de la reacción con sortasa, el fragmento de VWF y el motivo de reconocimiento de sortasa se unen al extremo N de FVIII. B) muestra dos construcciones de unión, (1) FVIII que se fusiona con un motivo de reconocimiento de sortasa en su extremo C y (2) un fragmento de VWF que tiene glicina (n) en su extremo N. Después de la reacción con sortasa, FVIII y el motivo de reconocimiento de sortasa se fusionan con el fragmento de VWF en el extremo N del fragmento de VWF. C) muestra dos construcciones de unión, (1) un fragmento de VWF fusionado con un motivo de reconocimiento de sortasa por un conector de longitud variable y (2) FVIII fusionado con glicina (n) en su extremo N. Después de la reacción con sortasa, el VWF fusionado por un conector con el motivo de reconocimiento de sortasa se une al extremo N de FVIII. D) muestra dos construcciones de unión, (1) FVIII fusionado por un conector de longitud variable con un motivo de reconocimiento de sortasa y (2) un fragmento de VWF fusionado con glicina (n) en su extremo N. Después de la reacción con sortasa, FVIII fusionado por un conector con el motivo de reconocimiento de sortasa se une al extremo N de fragmento de VWF. E) muestra una construcción de unión que contiene un fragmento de VWF fusionado por un conector de longitud variable con un motivo de reconocimiento de sortasa, que también se fusiona con un sitio de escisión de proteasa (por ejemplo, sitio de escisión de trombina) fusionado por un conector de longitud variable con una Fc.

La Figura 25 muestra una comparación esquemática de FVIII155 y FVIII198. FVIII155 codifica una proteína FVIII Fc de cadena sencilla. FVIII198 es un dominio B parcial que contiene la molécula de FVIII Fc de cadena sencilla-226N6. 226 representa el aminoácido 226 del extremo N del dominio B de FVIII, y N6 representa seis sitios de N-glucosilación en el dominio B.

- 5 La Figura 26 A) muestra un ensayo de estabilidad que mide la actividad relativa de FVIII155 y FVIII198 en plasma de DKO en función del tiempo. Como se puede apreciar en la figura, la presencia del dominio B parcial en FVIII198 aumentó la estabilidad de FVIII Fc de cadena sencilla en comparación con FVIII155; B) muestra una comparación de las semividas de FVIII198, FVIII155 y cadena doble (dcFVIII Fc) en ratones DKO. Como se puede apreciar en la figura, FVIII de cadena sencilla (FVIII155) tiene un aumento de 1,5 veces en la semivida en comparación con FVIII de cadena doble. FVIII de cadena sencilla con el dominio B de 226N6 (FVIII198) tuvo un aumento adicional de 1,5 veces en la semivida. El gráfico muestra la recuperación de FVIII frente al valor de 10 5 minutos (%) en función del tiempo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

DEFINICIONES

- 15 Se debe observar que el término "un" o "una" entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "una secuencia de nucleótidos" representa una o más secuencias de nucleótidos. Como tal, los términos "un" (o "una"), "uno o más," y "al menos uno", se pueden usar indistintamente en el presente documento.

- El término "polinucleótido" o "nucleótido" pretende englobar un ácido nucleico singular, así como ácidos nucleicos plurales, y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) 20 o ADN de plásmido (ADNp). En ciertas realizaciones, un polinucleótido comprende un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). El término "ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácidos nucleicos, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" está prevista una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha retirado de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido de factor VIII contenido en un vector se considera aislado para los fines de la presente invención. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospedadoras heterólogas o purificados (parcialmente o sustancialmente) de otros polinucleótidos en una disolución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos aislados o ácidos nucleicos 25 según la presente invención incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico pueden incluir elementos reguladores tales como promotores, potenciadores, sitios de unión al ribosoma, o señales de terminación de la transcripción.

- Como se usa en el presente documento, una "región codificante" o "secuencia codificante" es una porción de polinucleótido que consiste en codones traducibles en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA, 35 o TAA) normalmente no se traduce en un aminoácido, se puede considerar que es parte de una región codificante, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión al ribosoma, terminadores transcripcionales, intrones, y similares, no es parte de una región codificante. Los límites de una región codificante normalmente se determinan por un codón de iniciación en el extremo 5', que codifica el extremo amino del polipéptido resultante, y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3', que codifica el extremo carboxilo del polipéptido resultante. Pueden estar presentes dos o más regiones codificantes de la presente invención en una 40 única construcción de polinucleótido, por ejemplo, en un único vector, o en construcciones de polinucleótido separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). De esto resulta, entonces, que un único vector puede contener solo una única región codificante, o comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un único vector puede codificar por separado un dominio de unión A y un dominio de unión B, como se describe más adelante. Además, un vector, polinucleótido, o ácido nucleico, de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, o fusionadas o sin fusionar con un ácido nucleico que codifica un dominio de unión de la invención. Las regiones codificantes heterólogas incluyen sin limitación elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo.

- Ciertas proteínas secretadas por células de mamífero están asociados con un péptido señal secretor que se escinde 50 de la proteína madura una vez se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína en crecimiento a través del retículo endoplasmático rugoso. Los expertos habituales en la técnica conocen que los péptidos señal, en general, se fusionan con el extremo N del polipéptido, y se escinden del polipéptido completo o de "longitud completa" para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En ciertas realizaciones, se usa un péptido señal nativo, por ejemplo, un péptido señal de cadena pesada o cadena ligera de la inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que retiene la capacidad para dirigir la secreción del polipéptido al que está operativamente asociado. Alternativamente, se puede usar un péptido señal de mamífero heterólogo, por ejemplo, un activador de plasminógeno de tejido humano (TPA). O péptido señal de β -glucuronidasa de ratón, o un derivado funcional del mismo.

El término "en la dirección 3'" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se localiza 3' con respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia. En ciertas realizaciones, las secuencias de nucleótidos en la dirección 3' se refieren a secuencias que siguen el punto de inicio de la transcripción. Por ejemplo, el codón de iniciación de la traducción de un gen se localiza en la dirección 3' del sitio de inicio de la transcripción.

- 5 El término "en la dirección 5'" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se localiza 5' con respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia. En ciertas realizaciones, las secuencias de nucleótidos en la dirección 5' se refieren a secuencias que se localizan en el lado 5' de una región codificante o punto de inicio de la transcripción. Por ejemplo, la mayoría de los promotores se localizan en la dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción.

- 10 Como se usa en el presente documento, el término "región reguladora" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas en la dirección 5' (secuencias no codificantes 5'), dentro de, o en la dirección 3' (secuencias no codificantes 3') de una región codificante, y que influyen en la transcripción, procesamiento de ARN, estabilidad, o traducción de la región codificante asociada. Las regiones reguladoras pueden incluir promotores, secuencias conductoras de la traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de la poliadenilación, sitios de procesamiento de ARN, sitios de unión a efector y estructuras de tallo-bucle. Si está prevista una región codificante para la expresión en una célula eucariota, una señal de poliadenilación y secuencia de terminación de la transcripción se localizará normalmente 3' con respecto a la secuencia codificante.

- 20 Un polinucleótido que codifica un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, puede incluir un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o de la traducción operativamente asociados a una o más regiones codificantes. En una asociación operativa, una región codificante de un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más regiones reguladoras de tal forma que pongan la expresión del producto génico bajo la influencia o control de la(s) región (regiones) reguladora(s). Por ejemplo, una región codificante y un promotor están "operativamente asociados" si la inducción de la función de promotor da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico codificado por la región codificante, y si la naturaleza del enlace entre el promotor y la región codificante no interfiere con la capacidad del promotor para dirigir la expresión del producto génico o interferir con la capacidad del molde de ADN a transcribir. También se pueden asociar operativamente otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, a una región codificante para dirigir la expresión del producto génico.

- 30 Los expertos en la técnica conocen una variedad de regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción que funcionan en células de vertebrado, tales como, pero no se limitan a, segmentos de promotores y potenciadores del citomegalovirus (el promotor temprano inmediato, conjuntamente con el intrón A), virus 40 simio (el promotor temprano) y retrovirus (tales como el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovina y β -globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles por linfocinas (por ejemplo, promotores inducibles por interferones o interleucinas).

- 40 Similarmente, los expertos habituales en la técnica conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, pero no se limitan a, sitios de unión al ribosoma, codones de inicio y terminación de la traducción, y elementos derivados de picornavirus (particularmente un sitio interno de entrada al ribosoma, o IRES, también denominada una secuencia CITE).

- 45 El término "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso por el que un polinucleótido produce un producto génico, por ejemplo, un ARN o un polipéptido. Incluye, sin limitación, la transcripción del polinucleótido en ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN de horquilla pequeña (ARNhp), ARN interferente pequeño (ARNip), o cualquier otro producto de ARN, y la traducción de un ARNm en un polipéptido. La expresión produce un "producto génico". Como se usa en el presente documento, un producto génico puede ser o un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido por transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce de un transcrito. Los productos génicos descritos en el presente documento incluyen además ácidos nucleicos con modificaciones postranscripcionales, por ejemplo, poliadenilación o corte y empalme, o polipéptidos con modificaciones postraduccionales, por ejemplo, metilación, glucosilación, la adición de lípidos, asociación con otras subunidades de proteína, o escisión proteolítica.

- 55 Un "vector" se refiere a cualquier vehículo para la clonación de y/o transferencia de un ácido nucleico en una célula hospedadora. Un vector puede ser un replicón al que se puede unir otro segmento de ácido nucleico de manera que provoque la replicación del segmento unido. Un "replicón" se refiere a cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que actúa como una unidad de replicación autónoma *in vivo*, es decir, capaz de replicación bajo su propio control. El término "vector" incluye tanto vehículos virales como no virales para introducir el ácido nucleico en una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Se conocen un gran número de vectores y se usan en la técnica incluyendo, por ejemplo, plásmidos, virus eucariotas modificados, o virus bacterianos modificados. La inserción de un polinucleótido en un vector adecuado se puede llevar a cabo uniendo los fragmentos de polinucleótidos apropiados en un vector elegido que tiene extremos cohesivos complementarios.

- 60

Los vectores se pueden manipular para codificar marcadores de selección o indicadores que proporcionan la selección o identificación de células que han incorporado el vector. La expresión de marcadores de selección o indicadores permite la identificación y/o selección de células hospedadoras que incorporan y expresan otras regiones codificantes contenidas sobre el vector. Los ejemplos de genes marcadores de selección conocidos y usados en la materia incluyen: genes que proporcionan resistencia a ampicilina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, higromicina, el herbicida bialafos, sulfonamida, y similares; y genes que se usan como marcadores fenotípicos, es decir, genes reguladores de antocianina, gen isopentanol transferasa, y similares. Los ejemplos de indicadores conocidos y usados en la materia incluyen: luciferasa (Luc), proteína verde fluorescente (GFP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), -galactosidasa (LacZ), -glucuronidasa (Gus), y similares. También se puede considerar que los marcadores de selección son indicadores.

El término "plásmido" se refiere a un elemento extracromosómico que frecuentemente lleva un gen que no es parte del metabolismo central de la célula, y normalmente en forma de moléculas de ADN bicatenario circular. Dichos elementos pueden ser secuencias que se replican de forma autónoma, secuencias que se integran en el genoma, secuencias de fagos o nucleótidos, lineales, circulares, o superenrolladas, de un ADN o ARN mono o bicatenario, derivados de cualquier fuente, en las que varias secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una única construcción que es capaz de introducir un fragmento de promotor y secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con secuencia no traducida de 3' apropiada dentro de una célula.

Los vectores virales eucariotas que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, vectores de adenovirus, vectores de retrovirus, vectores de virus adeno-asociado, poxvirus, por ejemplo, vectores de virus de la variolovacuna, vectores de baculovirus, o vectores de virus del herpes. Los vectores no virales incluyen plásmidos, liposomas, lípidos eléctricamente cargados (citofectinas), complejos de ADN-proteína y biopolímeros.

Un "vector de clonación" se refiere a un "replicón", que es una unidad de longitud de un ácido nucleico que se replica secuencialmente y que comprende un origen de replicación, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que se puede unir otro segmento de ácido nucleico de manera que provoque la replicación del segmento unido. Ciertos vectores de clonación son capaces de replicación en un tipo de célula, por ejemplo, bacterias, y expresión en otro, por ejemplo, células eucariotas. Los vectores de clonación normalmente comprenden una o más secuencias que se pueden usar para la selección de células que comprenden el vector y/o uno o más sitios de clonación múltiple para la inserción de secuencias de ácidos nucleicos de interés.

El término "vector de expresión" se refiere a un vehículo diseñado para permitir la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos insertada tras la inserción en una célula hospedadora. La secuencia de ácidos nucleicos insertada se pone en asociación operativa con regiones reguladoras, como se ha descrito anteriormente.

Los vectores se introducen en células hospedadoras por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión de células, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato de calcio, lipofección (fusión de lisosomas), uso de una pistola de genes, o un transportador de vector de ADN.

"Cultivo", "para cultivar" y "cultivar", como se usan en el presente documento, significa incubar células en condiciones *in vitro* que permite el crecimiento o división celular, o mantener las células en un estado vivo. "Células cultivadas", como se usa en el presente documento, significa células que son propagadas *in vitro*.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" pretende englobar un "polipéptido" singular, así como "polipéptidos" plurales, y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) linealmente unidos por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica de producto. Así, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos", o cualquier otro término usado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, están incluidos dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede usar en lugar de, o indistintamente, con cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, que incluyen, sin limitación, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, o modificación por aminoácidos que no existen de forma natural. Un polipéptido se puede obtener de una fuente biológica natural o se produce por tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente de una secuencia de ácidos nucleicos designada. Se puede generar de cualquier manera, incluyendo por síntesis química.

Un polipéptido "aislado" o un fragmento, variante, o derivado del mismo, se refiere a un polipéptido que no está en su ámbito natural. No se requiere nivel de purificación particular. Por ejemplo, un polipéptido aislado se puede retirar simplemente de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas recombinantemente producidos expresados en células hospedadoras se consideran aislados para el fin de la invención, ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido separados, fraccionados, o parcialmente o sustancialmente purificados, por cualquier técnica adecuada.

También se incluyen en la presente divulgación fragmentos o variantes de polipéptidos, y cualquier combinación de los mismos. El término "fragmento" o "variante", cuando se refiere a dominios de unión a polipéptido o moléculas de unión de la presente divulgación, incluye cualquier polipéptido que retenga al menos algunas de las propiedades (por ejemplo, afinidad de unión de FcRn por un dominio de unión de FcRn o variante de Fc, actividad de coagulación para una variante de FVIII, o la actividad de unión de FVIII para el fragmento de VWF) del polipéptido de referencia. Los fragmentos de polipéptidos incluyen fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de delección, además de los fragmentos específicos de anticuerpo tratados en cualquier parte en el presente documento, pero no incluyen el polipéptido de longitud completa que existe de forma natural (o polipéptido maduro). Las variantes de dominios de unión de polipéptido o moléculas de unión de la presente divulgación incluyen fragmentos como se ha descrito anteriormente, y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones de aminoácidos, deleciones, o inserciones. Las variantes pueden existir de forma natural o no existir de forma natural. Las variantes que no existen de forma natural se pueden producir usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Los polipéptidos de variante pueden comprender sustituciones conservativas o no conservativas de aminoácidos, deleciones o adiciones.

El término "fragmento de VWF" o "fragmentos de VWF", usado en el presente documento, significa cualquier fragmento de VWF que interacciona con FVIII y retiene al menos una o más propiedades que normalmente se proporcionan a FVIII por VWF de longitud completa, por ejemplo, previniendo la activación prematura para FVIIIa, previniendo la proteólisis prematura, previniendo la asociación con membranas de fosfolípido que podrían conducir a eliminación prematura, previniendo la unión a receptores de eliminación de FVIII que se pueden unir a FVIII desnudo, pero no a FVIII unido a VWF, y/o estabilizando las interacciones de cadenas pesadas y cadenas ligeras de FVIII. El término "fragmento de VWF", como se usa en el presente documento, no incluye proteína VWF de longitud completa o madura. En una realización particular, el "fragmento de VWF", como se usa en el presente documento, comprende un dominio D' y un dominio D3 de la proteína VWF, pero no incluye el dominio A1, el dominio A2, el dominio A3, el dominio D4, el dominio B1, el dominio B2, el dominio B3, el dominio C1, el dominio C2 y el dominio CK de la proteína VWF.

El término "factor limitante de la semivida" o "factor limitante de la semivida de FVIII", como se usa en el presente documento, indica un factor que previene que la semivida de una proteína FVIII sea más larga de 1,5 veces o 2 veces en comparación con FVIII no mutante (por ejemplo, ADVATE® o REFACTO®). Por ejemplo, VWF de longitud completa o madura puede actuar de factor limitante de la semivida de FVIII induciendo que el complejo de FVIII y VWF se elimine del sistema por una o más vías de eliminación de VWF. En un ejemplo, VWF endógeno es un factor limitante de la semivida de FVIII. En otro ejemplo, una molécula de VWF recombinante de longitud completa no covalentemente unida a una proteína FVIII es un factor limitante de la semivida de FVIII.

El término "VWF endógeno", como se usa en el presente documento, indica moléculas de VWF naturalmente presentes en el plasma. La molécula de VWF endógeno puede ser un multímero, pero puede ser un monómero o un dímero. El VWF endógeno en plasma se une a FVIII y forma un complejo no covalente con FVIII.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, que incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, si un aminoácido en un polipéptido se sustituye por otro aminoácido de la misma familia de cadena lateral, se considera que la sustitución es conservativa. En otra realización, una cadena de aminoácidos se puede sustituir conservativamente con una cadena estructuralmente similar que se diferencia en orden y/o composición de los miembros de familia de la cadena lateral.

Como se conoce en la técnica, la "identidad de secuencia" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Cuando se trata en el presente documento, si cualquier polipéptido particular es al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % idéntico a otro polipéptido, se puede determinar usando métodos y programas informáticos/software conocidos en la técnica tales como, pero no se limitan a, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95 % idéntica a una secuencia de referencia según la presente invención, los parámetros se establecen, por supuesto, de forma que el porcentaje de identidad se calcule con respecto a la longitud completa de la secuencia de polipéptidos referencia y que se permitan huecos en la homología de hasta el 5 % del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Como se usa en el presente documento, un "aminoácido correspondiente a" o un "aminoácido equivalente" en una secuencia de VWF o una secuencia de proteínas de FVIII se identifica por alineamiento para maximizar la identidad

o similitud entre una primera secuencia de VWF o FVIII y una segunda secuencia de VWF o FVIII. El número usado para identificar un aminoácido equivalente en una segunda secuencia de VWF o FVIII se basa en el número usado para identificar el aminoácido correspondiente en la primera secuencia de VWF o FVIII.

5 Una proteína de "fusión" o "quimérica" comprende una primera secuencia de aminoácidos unida a una segunda secuencia de aminoácidos con la que no se une naturalmente en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos que normalmente existen en proteínas separadas se pueden poner juntas en el polipéptido de fusión, o las secuencias de aminoácidos que normalmente existen en la misma proteína se pueden poner en una nueva disposición en el polipéptido de fusión, por ejemplo, fusión de un dominio de factor VIII de la invención con un dominio Fc de inmunoglobulina. Una proteína de fusión se crea, por ejemplo, por síntesis química, o por creación y traducción de un polinucleótido en el que las regiones de péptido están codificadas en la relación deseada. Una proteína quimérica puede comprender además una segunda secuencia de aminoácidos asociada a la primera secuencia de aminoácidos por un enlace no peptídico covalente, o un enlace no covalente.

15 Como se usa en el presente documento, el término "semivida" se refiere a una semivida biológica de un polipéptido particular *in vivo*. La semivida se puede representar por el tiempo requerido para que la mitad de la cantidad administrada a un sujeto sea eliminada de la circulación y/u otros tejidos en el animal. Cuando se construye una curva de eliminación de un polipéptido dado en función del tiempo, la curva es normalmente bifásica con una fase α rápida y una fase β larga. La fase α normalmente representa un equilibrio del polipéptido de Fc administrado en el espacio intra- y extra-vascular y se determina, en parte, por el tamaño del polipéptido. La fase β normalmente representa el catabolismo del polipéptido en el espacio intravascular. En algunas realizaciones, FVIII y las proteínas quiméricas que comprenden FVIII son monofásicas, y así no tienen una fase alfa, sino solo la fase beta individual. Por tanto, en ciertas realizaciones, el término semivida, como se usa en el presente documento, se refiere a la semivida del polipéptido en la fase β . La semivida típica de la fase β de un anticuerpo humano en seres humanos es 21 días.

25 El término "heterólogo", como se aplica a un polinucleótido o un polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido deriva de una entidad distinta de la entidad con la que se compara. Por tanto, un polipéptido heterólogo unido a un fragmento de VWF significa una cadena de polipéptidos que se une a un fragmento de VWF y no es una parte que existe de forma natural del fragmento de VWF. Por ejemplo, un polinucleótido o antígeno heterólogo puede derivar de una especie diferente, tipo diferente de célula de un individuo, o el mismo tipo de célula o tipo diferente de individuos distintos.

30 El término "unido", como se usa en el presente documento, se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos covalentemente o no covalentemente unida a una segunda secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos, respectivamente. El término "covalentemente unido" o "enlace covalente" se refiere a un enlace covalente, por ejemplo, un enlace disulfuro, un enlace peptídico, o uno o más aminoácidos, por ejemplo, un conector, entre los dos restos que se unen juntos. La primera secuencia de aminoácidos o de nucleótidos se puede unir directamente o yuxtaponer con la segunda secuencia de aminoácidos o de nucleótidos, o alternativamente una secuencia intercalada puede unir covalentemente la primera secuencia con la segunda secuencia. El término "unido" significa no solo una fusión de una primera secuencia de aminoácidos con una segunda secuencia de aminoácidos en el extremo C o el extremo N, sino que también incluye la inserción de toda la primera secuencia de aminoácidos (o la segunda secuencia de aminoácidos) en cualesquiera dos aminoácidos en la segunda secuencia de aminoácidos (o la primera secuencia de aminoácidos, respectivamente). En una realización, la primera secuencia de aminoácidos se puede unir a una segunda secuencia de aminoácidos por un enlace peptídico o un conector. La primera secuencia de nucleótidos se puede unir a una segunda secuencia de nucleótidos por un enlace fosfodiéster o un conector. El conector puede ser un péptido o un polipéptido (para cadenas de polipéptidos) o un nucleótido o una cadena de nucleótidos (para cadenas de nucleótidos), o cualquier resto químico (para tanto cadenas de polipéptidos como de polinucleótidos). El enlace covalente se indica algunas veces como (-) o guión.

45 Como se usa en el presente documento, el término "asociado a" se refiere a un enlace covalente o no covalente formado entre una primera cadena de aminoácidos y una segunda cadena de aminoácidos. En una realización, el término "asociado a" significa un enlace no peptídico covalente, o un enlace no covalente. En algunas realizaciones, esta asociación se indica por dos puntos, es decir, (:). En otra realización, significa un enlace covalente, excepto un enlace peptídico. En otras realizaciones, el término "covalentemente asociado", como se usa en el presente documento, significa una asociación entre dos restos por un enlace covalente, por ejemplo, un enlace disulfuro, un enlace peptídico, o uno o más aminoácidos (por ejemplo, un conector). Por ejemplo, el aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace disulfuro o puente con un grupo tiol en un segundo resto de cisteína. En la mayoría de las moléculas de IgG que existen de forma natural, las regiones CH1 y CL están asociadas por un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están asociadas por dos enlaces disulfuro en las posiciones correspondientes a 239 y 242 usando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración EU). Los ejemplos de enlaces covalentes incluyen, pero no se limitan a, un enlace peptídico, un enlace metálico, un enlace de hidrógeno, un enlace disulfuro, un enlace sigma, un enlace pi, un enlace delta, un enlace glucosídico, un enlace agnóstico, un enlace flexionado, un enlace dipolar, un esqueleto pi, un doble enlace, un triple enlace, un cuádruple enlace, un quíntuple enlace, un séxtuple enlace, conjugación, hiperconjugación, aromaticidad, hapticidad, o antienlace. Los ejemplos no limitantes de enlace no covalente incluyen un enlace iónico (por ejemplo, enlace catión-pi o enlace de sal), un enlace metálico, un enlace de hidrógeno (por ejemplo, enlace de

dihidrógeno, complejo de dihidrógeno, enlace de hidrógeno de baja barrera, o enlace de hidrógeno simétrico), fuerza de van der Waals, fuerza de dispersión de London, un enlace mecánico, un enlace halógeno, aurofilicidad, intercalación, apilamiento, fuerza entrópica o polaridad química.

5 El término "híbrido monómero-dímero" usado en el presente documento se refiere a una proteína quimérica que comprende una primera cadena de polipéptidos y una segunda cadena de polipéptidos, que están asociadas entre sí por un enlace disulfuro, en donde la primera cadena comprende un factor de coagulación, por ejemplo, factor VIII, y una región Fc y la segunda cadena comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una región Fc sin el factor de coagulación. La construcción híbrida monómero-dímero es así un híbrido que comprende un aspecto de monómero que tiene solo un factor de coagulación y un aspecto de dímero que tiene dos regiones Fc.

10 Como se usa en el presente documento, el término "sitio de escisión" o "sitio de escisión enzimática" se refiere a un sitio reconocido por una enzima. Ciertos sitios de escisión enzimática comprenden un sitio de procesamiento intracelular. En una realización, un polipéptido tiene un sitio de escisión enzimática escindido por una enzima que se activa durante la cascada de coagulación, de forma que la escisión de dichos sitios ocurre en el sitio de formación del coágulo. A modo de ejemplo, dichos sitios incluyen, por ejemplo, los reconocidos por trombina, factor XIa o factor Xa. A modo de ejemplo, los sitios de escisión de FXIa incluyen, por ejemplo, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 47) y SVSQTSLKTR (SEQ ID NO: 48). A modo de ejemplo, los sitios de escisión de trombina incluyen, por ejemplo, DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 49), TTKIKPR (SEQ ID NO: 50), LVPRG (SEQ ID NO: 55) y ALRPR (aminoácidos 1 a 5 de SEQ ID NO: 51). Se conocen en la técnica otros sitios de escisión enzimática.

20 Como se usa en el presente documento, el término "sitio de procesamiento" o "sitio de procesamiento intracelular" se refiere a un tipo de sitio de escisión enzimática en un polipéptido que es la diana para enzimas que funcionan después de la traducción del polipéptido. En una realización, dichas enzimas funcionan durante el transporte desde la luz de Golgi hasta el compartimento trans-Golgi. Las enzimas de procesamiento intracelular escinden polipéptidos antes de la secreción de la proteína de la célula. Los ejemplos de dichos sitios de procesamiento incluyen, por ejemplo, los dirigidos por la familia PACE/furina (donde PACE es un acrónimo de enzima de escisión de aminoácidos básicos emparejados) de endopeptidasas. Estas enzimas se localizan en la membrana de Golgi y escinden proteínas en el lado del extremo carboxi del motivo de secuencia Arg-[cualquier resto]-(Lys o Arg)-Arg. Como se usa en el presente documento, la familia de "furina" de enzimas incluye, por ejemplo, PCSK1 (también conocida como PC1/Pc3), PCSK2 (también conocida como PC2), PCSK3 (también conocida como furina o PACE), PCSK4 (también conocida como PC4), PCSK5 (también conocida como PC5 o PC6), PCSK6 (también conocida como PACE4), o PCSK7 (también conocida como PC7/LPC, PC8 o SPC7). Se conocen en la técnica otros sitios de procesamiento.

25 El término "furina" se refiere a las enzimas correspondientes a EC nº 3.4.21.75. La furina es una proproteína convertasa de tipo subtilisina, que también se conoce como PACE (enzima de escisión de aminoácidos básicos emparejados). La furina delecta secciones de proteínas precursoras inactivas para convertirlas en proteínas biológicamente activas. Durante su transporte intracelular, se escinde el pro-péptido de la molécula de VWF maduro por una enzima furina en el Golgi.

30 En construcciones que incluyen más de un sitio de procesamiento o de escisión, se entenderá que dichos sitios pueden ser iguales o diferentes.

35 Trastorno hemostático, como se usa en el presente documento, significa una afección genéticamente heredada o adquirida caracterizada por una tendencia a hemorragia, o espontáneamente, o como resultado de traumatismo, debido a una capacidad alterada o incapacidad de formar un coágulo de fibrina. Los ejemplos de dichos trastornos incluyen las hemofilias. Las tres formas principales son hemofilia A (deficiencia de factor VIII), hemofilia B (deficiencia de factor IX o "enfermedad de Christmas") y hemofilia C (deficiencia de factor XI, tendencia a sangrado leve). Otros trastornos hemostáticos incluyen, por ejemplo, enfermedad de von Willebrand, deficiencia de factor XI (deficiencia de PTA), deficiencia de factor XII, deficiencias o anomalías estructurales en fibrinógeno, protrombina, factor V, factor VII, factor X o factor XIII, síndrome de Bernard-Soulier, que es un defecto o deficiencia en GPIb. GPIb, el receptor para VWF, puede ser defectuoso y conducir a una ausencia de formación de coágulos primarios (hemostasia primaria) y elevada tendencia al sangrado, y trombostenia de Glanzman y Naegeli (trombostenia de Glanzmann). En insuficiencia hepática (formas agudas y crónicas), existe producción insuficiente de factores de coagulación por el hígado; esto puede aumentar el riesgo de sangrado.

40 Las moléculas quiméricas de la invención se pueden usar profilácticamente. Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento profiláctico" se refiere a la administración de una molécula antes de un episodio de sangrado. En una realización, el sujeto en necesidad de un agente hemostático general se somete a, o está a punto de someterse a, cirugía. La proteína quimérica de la invención se puede administrar antes o después de la cirugía como un profiláctico. La proteína quimérica de la invención se puede administrar durante o después de la cirugía para controlar un episodio de sangrado agudo. La cirugía puede incluir, pero no se limita a, trasplante de hígado, resección hepática, procedimientos dentales, o trasplante de células madre.

45 La proteína quimérica de la invención también se usa para tratamiento a demanda (también denominado "episódico"). El término "tratamiento a demanda" o "tratamiento episódico" se refiere a la administración de una

molécula quimérica en respuesta a síntomas de un episodio de sangrado o antes de una actividad que puede provocar sangrado. En un aspecto, el tratamiento a demanda (episódico) se puede administrar a un sujeto cuando el sangrado empieza, tal como después de una lesión, o cuando se espera sangrado, tal como antes de cirugía. En otro aspecto, el tratamiento a demanda se puede administrar antes de actividades que aumentan el riesgo de sangrado, tales como deportes de contacto.

Como se usa en el presente documento, el término "sangrado agudo" se refiere a un episodio de sangrado independientemente de la causa subyacente. Por ejemplo, un sujeto puede tener traumatismo, uremia, un trastorno de sangrado hereditario (por ejemplo, deficiencia de factor VII), un trastorno plaquetario, o resistencia debido al desarrollo de anticuerpos contra factores de coagulación.

Tratar, tratamiento, tratando, como se usa en el presente documento, se refiere a, por ejemplo, la reducción en la gravedad de una enfermedad o afección; la reducción en la duración de una evolución de la enfermedad; la mejora de uno o más síntomas asociados a una enfermedad o afección; la provisión de efectos beneficiosos a un sujeto con una enfermedad o afección, sin curar necesariamente la enfermedad o afección, o la profilaxis de uno o más síntomas asociados a una enfermedad o afección. En una realización, el término "tratar" o "tratamiento" significa mantener un nivel valle de FVIII de al menos aproximadamente 1 UI/dL, 2 UI/dL, 3 UI/dL, 4 UI/dL, 5 UI/dL, 6 UI/dL, 7 UI/dL, 8 UI/dL, 9 UI/dL, 10 UI/dL, 11 UI/dL, 12 UI/dL, 13 UI/dL, 14 UI/dL, 15 UI/dL, 16 UI/dL, 17 UI/dL, 18 UI/dL, 19 UI/dL, o 20 UI/dL en un sujeto administrando una proteína quimérica de la invención. En otra realización, tratar o tratamiento significa mantener un nivel valle de FVIII entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 UI/dL, aproximadamente 2 y aproximadamente 20 UI/dL, aproximadamente 3 y aproximadamente 20 UI/dL, aproximadamente 4 y aproximadamente 20 UI/dL, aproximadamente 5 y aproximadamente 20 UI/dL, aproximadamente 6 y aproximadamente 20 UI/dL, aproximadamente 7 y aproximadamente 20 UI/dL, aproximadamente 8 y aproximadamente 20 UI/dL, aproximadamente 9 y aproximadamente 20 UI/dL, o aproximadamente 10 y aproximadamente 20 UI/dL. Tratamiento o tratar de una enfermedad o afección también puede incluir mantener la actividad de FVIII en un sujeto a un nivel comparable a al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % de la actividad de FVIII en un sujeto no hemofílico. El nivel valle mínimo requerido para el tratamiento se puede medir por uno o más métodos conocidos y se puede ajustar (aumentar o reducir) para cada persona.

Proteínas quiméricas

La presente invención se refiere a prolongar la semivida de una proteína factor VIII previniendo o inhibiendo que un factor limitante de la semivida de FVIII (por ejemplo, VWF endógeno) *in vivo* se asocie con la proteína FVIII. VWF endógeno se asocia con aproximadamente 95 % a aproximadamente 98 % de FVIII en complejos no covalentes. Se conoce que los VWF endógenos unidos a una proteína FVIII protegen FVIII de diversas formas. Por ejemplo, VWF de longitud completa (como un multímero que tiene aproximadamente 250 kDa) puede proteger FVIII de la escisión de proteasas y la activación de FVIII, estabilizar la cadena pesada y/o cadena ligera de FVIII, y prevenir la eliminación de FVIII por receptores depuradores. Sin embargo, al mismo tiempo, VWF endógeno limita la semivida de FVIII, previniendo la pinocitosis y eliminando el complejo FVIII-VWF del sistema mediante la vía de eliminación de VWF. Se cree, como se muestra en los ejemplos, que VWF endógeno es el factor limitante de la semivida que previene que la semivida de una proteína FVIII fusionada con un prolongador de la semivida sea más larga de aproximadamente dos veces la de FVIII no mutante. Por tanto, la presente invención previene o inhibe la interacción entre VWF endógeno y una proteína FVIII usando un resto auxiliar, en donde el resto auxiliar es un fragmento de VWF que comprende una dominio D' y un dominio D3 de VWF, previniendo así que la proteína FVIII se elimine mediante la vía de eliminación de VWF y/o induciendo pinocitosis. En una realización, el resto auxiliar es capaz de prevenir o inhibir la unión de la proteína FVIII con VWF endógeno y tiene al menos una propiedad protectora de FVIII de tipo VWF. Además, el resto auxiliar reduce la eliminación de FVIII del sistema previniendo o inhibiendo la interacción con VWF endógeno. Los restos auxiliares de la presente invención se unen a o asocian mediante enlace covalente con una proteína FVIII y/o bloquean física o químicamente el sitio de unión de VWF sobre la proteína FVIII. Así, la proteína FVIII asociada al resto auxiliar se elimina de la circulación más lentamente por uno o más receptores de eliminación de VWF, en comparación con FVIII no mutante o FVIII no asociado a un resto auxiliar.

El resto auxiliar en la presente invención es un fragmento de VWF descrito en el presente documento. En una realización, el resto auxiliar se asocia (o une) con la proteína FVIII por un enlace covalente. Para prevenir la disociación del resto auxiliar con la proteína FVIII, el enlace entre la proteína FVIII y el resto auxiliar es un enlace covalente, por ejemplo, un enlace peptídico, uno o más aminoácidos, o un enlace disulfuro. En ciertas realizaciones, la asociación (es decir, enlace) entre el resto auxiliar y la proteína FVIII es un enlace peptídico o un conector entre la proteína FVIII y el resto auxiliar ("conector de FVIII/AM"). Los ejemplos no limitantes de conector se describen en cualquier parte en el presente documento. El resto auxiliar covalentemente asociado a la proteína FVIII es un fragmento de VWF descrito en cualquier parte en el presente documento.

En ciertas realizaciones, el resto auxiliar se une químicamente (por ejemplo, no covalentemente) a o bloquea físicamente uno o más sitios de unión de VWF sobre una proteína FVIII. El sitio de unión de VWF sobre una proteína FVIII se localiza dentro del dominio A3 o el dominio C2 de la proteína FVIII. En otras realizaciones más, el sitio de unión de VWF sobre una proteína FVIII se localiza dentro del dominio A3 y dominio C2. Por ejemplo, el sitio de unión

de VWF sobre una proteína FVIII puede corresponder a los aminoácidos 1669 a 1689 y/o 2303 a 2332 de SEQ ID NO: 16 [FVIII maduro de longitud completa].

En otras realizaciones, una proteína quimérica de la invención comprende una proteína FVIII unida a un resto auxiliar, en donde el resto auxiliar es un fragmento de VWF que comprende un dominio D' y un dominio D3, pero que no contiene el sitio de unión de receptor de eliminación de VWF, y escuda o protege el sitio de unión de VWF sobre la proteína FVIII, inhibiendo o previniendo así la interacción de la proteína FVIII con VWF endógeno. En ciertas realizaciones, el fragmento de VWF útil para la presente invención contiene el dominio D' y el dominio D3, proporcionando aún una o más ventajas de la propiedad de tipo VWF a la proteína FVIII, pero el fragmento de VWF no se somete a la vía de eliminación de VWF. La proteína FVIII y el resto auxiliar se pueden asociar covalentemente por un conector (por ejemplo, conector de FVIII/AM). En una realización, el conector puede ser un conector escindible. Los ejemplos no limitantes de los conectores se desvelan en cualquier parte en el presente documento.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una proteína quimérica o de fusión o híbrido que comprende uno o más de los fragmentos de VWF desvelados en el presente documento y usos de los mismos. La proteína quimérica o de fusión se puede fusionar o unir a uno o más restos heterólogos (algunas veces indicados en el presente documento como H o H1). En una realización, el resto heterólogo (H1) es un péptido heterólogo o un polipéptido heterólogo que no se produciría naturalmente y/o se une al fragmento de VWF. En otra realización, el resto heterólogo (H1) es un resto no de polipéptido, por ejemplo, modificación química o una combinación de un péptido o polipéptido y un resto no de polipéptido. En algunas realizaciones, los fragmentos de VWF están unidos o conectados al resto heterólogo (H1) por un conector (también denominado en el presente documento "conector de VWF"). En una realización, el conector de VWF es un conector escindible. Los ejemplos no limitantes del conector entre el fragmento de VWF y el resto heterólogo (H1) se desvelan en cualquier parte en el presente documento.

En una realización, el resto heterólogo (H1) útil en la invención mejora una o más propiedades farmacocinéticas de los fragmentos de VWF sin afectar significativamente la actividad biológica o función de los fragmentos de VWF (por ejemplo, su unión a o asociación con una proteína FVIII). En otra realización, el resto heterólogo (H1) unido al fragmento de VWF puede prolongar la semivida de los fragmentos de VWF. Los ejemplos no limitantes del resto heterólogo de polipéptido comprenden una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, o dos o más combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de resto no de polipéptido heterólogo incluyen polietilenglicol (PEG), ácido polisialílico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, se puede usar un resto heterólogo (H1) para conectar el fragmento de VWF y la proteína FVIII por un enlace covalente. Los ejemplos de resto heterólogo que pueden proporcionar el enlace covalente incluyen, pero no se limitan a, una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma que comprende una región bisagra, por ejemplo, una región Fc o un componente de unión de FcRn. En un ejemplo específico, la proteína FVIII se une a una primera región Fc, y el fragmento de VWF se une a una segunda región Fc, en donde la primera región Fc y la segunda región Fc forman uno o más enlaces disulfuro.

En algunas realizaciones, el resto heterólogo (algunas veces indicado en el presente documento por "H" o "H1") es una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma. Los ejemplos no limitantes de la región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma se pueden seleccionar del grupo que consiste en un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3, un dominio CH4, un dominio bisagra, y dos o más combinaciones de los mismos. En una realización, la región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma comprende al menos un dominio CH1, al menos un dominio CH2, al menos un dominio CH3, al menos un dominio CH4, o los fragmentos funcionales de los mismos. En otra realización, la región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma comprende al menos un dominio bisagra o una porción del mismo y al menos un dominio CH2 o una porción del mismo (por ejemplo, en la orientación bisagra-CH2). En otras realizaciones, el dominio constante de la inmunoglobulina o una porción del mismo comprende al menos un dominio CH2 o una porción del mismo y al menos un dominio CH3 o una porción del mismo (por ejemplo, en la orientación CH2-CH3). Los ejemplos de la combinación incluyen, pero no se limitan a, un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio bisagra, que también se conoce como una región Fc (o dominio Fc), por ejemplo, una primera región Fc. En otras realizaciones, el resto heterólogo (H1) se une al fragmento de VWF por un conector. En ciertas realizaciones, el resto heterólogo (H1) es un componente de unión de FcRn como se describe en cualquier parte en el presente documento. En otras realizaciones, el resto heterólogo (H1) es una región bisagra.

En ciertas realizaciones, la proteína quimérica comprende además un segundo resto heterólogo (o adicional) (indicado algunas veces en el presente documento por "H2"). Se observa que el primer resto heterólogo (H1) y el segundo resto heterólogo (H2) se pueden usar indistintamente y pueden ser iguales o diferentes. El segundo resto heterólogo (H2) se puede unir a la proteína FVIII o en cualquier parte en la proteína quimérica por un enlace peptídico, uno o más aminoácidos, o por un conector (por ejemplo, conector de FVIII si se une a FVIII). Dichas construcciones se pueden denominar algunas veces heterodímero FVIII/VWF. En una realización, el resto heterólogo (H2) comprende un polipéptido heterólogo. En otra realización, el resto heterólogo (H2) comprende un resto no de polipéptido. En otras realizaciones, el resto heterólogo (H2) comprende una combinación de un resto heterólogo y un resto no de polipéptido. El segundo resto heterólogo (H2) puede ser un prolongador de la semivida.

Los ejemplos no limitantes del segundo resto heterólogo de polipéptido (H2) incluyen una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, o dos o más combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes del resto no de polipéptido heterólogo incluyen polietilenglicol (PEG), ácido polisialílico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el primer resto heterólogo (H1) y el segundo resto heterólogo son iguales o diferentes. Cualquiera o ambos del primer resto heterólogo (H1) y el segundo resto heterólogo (H2) pueden conferir prolongación de la semivida a la proteína FVIII en una proteína quimérica, proporcionar una conexión más fuerte que la asociación no covalente, es decir, por uno o más enlaces covalentes entre la proteína FVIII y el fragmento de VWF en una proteína quimérica, o ambos. Una vez el fragmento de VWF fusionado o unido al primer resto heterólogo (H1) retira el techo de semivida previniendo o inhibiendo la interacción entre la proteína FVIII y la proteína VWF endógeno, la proteína FVIII fusionada con los restos heterólogos puede llegar a su potencial completo y puede tener una semivida de más de dos veces en comparación con FVIII no mutante.

En ciertas realizaciones, el primer resto heterólogo (por ejemplo, una primera región Fc) unido al fragmento de VWF y el segundo resto heterólogo (por ejemplo, una segunda región Fc) unido a la proteína FVIII se asocian entre sí de forma que la asociación prevenga la sustitución del fragmento de VWF por VWF endógeno *in vivo*. En una realización, el segundo resto heterólogo es una segunda región Fc, en donde la segunda región Fc se une o asocia al primer resto heterólogo, por ejemplo, la primera región Fc, por un enlace covalente, por ejemplo, enlace disulfuro, un enlace peptídico, o un conector (uno o más aminoácidos). Por ejemplo, el segundo resto heterólogo (por ejemplo, la segunda región Fc) unido a la proteína FVIII en un extremo se puede unir además al primer resto heterólogo (por ejemplo, la primera región Fc) unido al fragmento de VWF por un conector (por ejemplo, conector scFc) o asociar al primer resto heterólogo por un enlace covalente. En otra realización, el segundo resto heterólogo (por ejemplo, la segunda región Fc) se une al fragmento de VWF que ya se une al primer resto heterólogo. En algunas realizaciones, la proteína quimérica comprende una primera cadena de polipéptidos que comprende un fragmento de VWF y un primer resto heterólogo y una segunda cadena de polipéptidos que comprende una proteína FVIII y un segundo resto heterólogo, en donde la primera cadena de polipéptidos y la segunda cadena de polipéptidos se asocian, en donde la asociación entre la primera cadena de polipéptidos que comprende el primer resto heterólogo y la segunda cadena de polipéptidos que comprende el segundo resto heterólogo es un enlace covalente, permitiendo así que el fragmento de VWF y la proteína FVIII mantengan su interacción entre sí. Al mismo tiempo, VWF endógeno, que puede formar un enlace no covalente con la proteína FVIII, no puede sustituir la cadena de polipéptidos covalentemente unida que comprende el fragmento de VWF.

El conector entre el primer resto heterólogo (H1) y el fragmento de VWF (por ejemplo, conector de VWF) puede ser un conector escindible, por ejemplo, un conector escindible de trombina. Los conectores escindibles se pueden escindir por una proteasa seleccionada del grupo que consiste en factor XIa, factor XIIa, calicreína, factor VIIa, factor IXa, factor Xa, factor IIa (trombina), elastasa-2, granzima-B, TEV, enterocinasa, proteasa 3C, sortasa A, MMP-12, MMP-13, MMP-17, MMP-20, y cualquier combinación de los mismos. Estos conectores escindibles permiten que el fragmento de VWF se escinda y disocie de la proteína FVIII tras la activación de la cascada de coagulación, dando como resultado una proteína FVIII con potencial de actividad completa.

En otras realizaciones, la proteína quimérica se produce como una cadena sencilla de polipéptidos que comprende un fragmento de VWF, un conector escindible, un primer resto heterólogo (H1), un conector procesable, una proteína FVIII y un segundo resto heterólogo (H2) en cualquier orden. Después de la síntesis, el conector procesable se puede escindir por una enzima proteasa intracelular antes de la secreción, haciendo así las dos cadenas de polipéptidos como se ha descrito anteriormente. En la construcción de cadena sencilla antes de la secreción, el segundo resto heterólogo (por ejemplo, la segunda región Fc) se puede unir al fragmento de VWF por un conector procesable. En ciertas realizaciones, uno o más conectores pueden comprender uno o más sitios de escisión.

En algunas realizaciones, la proteína quimérica de la invención comprende además un tercer resto heterólogo (algunas veces indicado en el presente documento por "H3"). El tercer resto heterólogo (H3) puede ser un prolongador de la semivida. El resto heterólogo (H3) puede comprender un polipéptido heterólogo, un resto no de polipéptido, o una combinación de ambos. Los ejemplos no limitantes del tercer resto heterólogo (H3) incluyen una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, cualquier derivado o variante de los mismos, o dos o más combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes del resto no de polipéptido incluyen polietilenglicol (PEG), ácido polisialílico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. El primer resto heterólogo (H1) unido al fragmento de VWF, el segundo resto heterólogo (H2) unido a la proteína FVIII y el tercer resto heterólogo (H3) pueden ser iguales o diferentes. En una realización, el primer resto heterólogo (H1) es idéntico al segundo resto heterólogo (H2), pero es diferente del tercer resto heterólogo (H3). En otra realización, el tercer resto heterólogo (H3) se fusiona o une a una proteína FVIII o un fragmento de VWF de la proteína quimérica. En algunas realizaciones, el tercer resto heterólogo se inserta dentro de uno o más dominios de la proteína FVIII o entre dos dominios de la proteína FVIII.

En una realización, una proteína quimérica comprende una primera cadena de polipéptidos y una segunda cadena de polipéptidos, en donde la primera cadena comprende una proteína FVIII unida a un primer resto heterólogo (H1), por ejemplo, una primera región Fc, por un conector opcional (por ejemplo, conector de FVIII) y la segunda cadena

comprende un fragmento de VWF unido a un segundo resto heterólogo (H2), por ejemplo, una segunda región Fc, por un conector opcional (por ejemplo, conector de VWF). La proteína FVIII puede comprender además un tercer resto heterólogo (H3), por ejemplo, cualquier resto prolongador de la semivida, por ejemplo, albúmina, o una secuencia de PAS, entre la cadena pesada de FVIII y la cadena ligera de FVIII (es decir, resto de aminoácido 1648 de SEQ ID NO: 16), siendo así una proteína FVIII de cadena sencilla. Alternativamente, la proteína FVIII puede ser una proteína de cadena doble, es decir, la cadena pesada de FVIII y la cadena ligera de FVIII asociadas entre sí por un enlace covalente o no covalente (por ejemplo, un enlace metálico), en donde la cadena pesada se une además a un tercer resto heterólogo (H3), por ejemplo, un polipéptido prolongador de la semivida no estructural, albúmina o un fragmento de la misma, o una secuencia de PAS. En otra realización, una proteína quimérica comprende una primera cadena de polipéptidos y una segunda cadena de polipéptidos, en donde la primera cadena comprende una proteína FVIII unida a un primer resto heterólogo (H1), por ejemplo, una primera región Fc, por un conector opcional (por ejemplo, conector de FVIII) y la segunda cadena comprende un fragmento de VWF unido a un tercer resto heterólogo (H3), por ejemplo, un polipéptido prolongador de la semivida no estructural, albúmina o una secuencia de PAS, que se une a un segundo resto heterólogo (H2), por ejemplo, una segunda región Fc, por un conector opcional. En algunas realizaciones, el tercer resto heterólogo (H3) (por ejemplo, un polipéptido prolongador de la semivida) se puede unir al extremo C o extremo N de la proteína FVIII o insertar entre dos dominios de la proteína FVIII, o entre dos aminoácidos en un dominio de la proteína FVIII.

En otras realizaciones, la proteína quimérica de la invención comprende además un cuarto resto heterólogo (algunas veces indicado en el presente documento por "H4") y/o un quinto resto heterólogo (algunas veces indicado en el presente documento por "H5"). El cuarto o quinto resto heterólogo también pueden ser un prolongador de la semivida. El cuarto resto heterólogo y/o el quinto resto heterólogo pueden ser iguales o diferentes del tercer resto heterólogo. El resto heterólogo puede comprender un polipéptido heterólogo, un resto no de polipéptido, o una combinación de ambos. Los ejemplos no limitantes del cuarto o quinto resto heterólogo incluyen una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, cualquier derivado o variante de los mismos, o dos o más combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes del resto no de polipéptido incluyen polietilenglicol (PEG), ácido polisialico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. El primer resto heterólogo, el segundo resto heterólogo, el tercer resto heterólogo, el cuarto resto heterólogo y el quinto resto heterólogo pueden ser iguales o diferentes. En algunas realizaciones, el cuarto resto heterólogo (por ejemplo, un polipéptido prolongador de la semivida) se puede unir al extremo C o extremo N de la proteína FVIII o insertar entre dos dominios de la proteína FVIII o entre dos aminoácidos en un dominio de la proteína FVIII. En otras realizaciones, el quinto resto heterólogo (por ejemplo, un polipéptido prolongador de la semivida) también se puede unir al extremo C o extremo N de la proteína FVIII o insertar entre dos dominios de la proteína FVIII o entre dos aminoácidos en un dominio de la proteína FVIII.

En ciertas realizaciones, la proteína quimérica comprende una proteína FVIII, un fragmento de VWF, un primer resto heterólogo, un segundo resto heterólogo, un tercer resto heterólogo, un cuarto resto heterólogo, y un quinto resto heterólogo, en donde el primer resto heterólogo y el segundo resto heterólogo forman un enlace (por ejemplo, un enlace covalente) entre la cadena que comprende la proteína FVIII y la cadena que comprende el fragmento de VWF, y el tercer resto heterólogo, el cuarto resto heterólogo y el quinto resto heterólogo son prolongadores de la semivida, y en donde el enlace entre la cadena que comprende la proteína FVIII y la cadena que comprende el fragmento de VWF es más fuerte que la interacción no covalente entre FVIII y el fragmento de VWF, previniendo así la unión de VWF endógeno a la proteína FVIII *in vivo*, *in vitro*, o *ex vivo*.

En otras realizaciones, la proteína quimérica comprende una proteína FVIII, un fragmento de VWF, un primer resto heterólogo, un segundo resto heterólogo, un tercer resto heterólogo, un cuarto resto heterólogo, un quinto resto heterólogo y un sexto resto heterólogo (algunas veces indicado en el presente documento como "H6"), en donde el primer resto heterólogo y el segundo resto heterólogo forman un enlace entre la cadena que comprende la proteína FVIII y la cadena que comprende el fragmento de VWF, y el tercer resto heterólogo, el cuarto resto heterólogo, el quinto resto heterólogo y el sexto resto heterólogo son prolongadores de la semivida, y en donde el enlace entre la cadena que comprende la proteína FVIII y la cadena que comprende el fragmento de VWF es más fuerte que la interacción entre FVIII y el fragmento de VWF, previniendo así la unión de VWF endógeno a la proteína FVIII *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*.

En algunos casos, una proteína quimérica comprende una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:

- (aa) V-L1-H1-L2-H2,
- (bb) H2-L2-H1-L1-V,
- (cc) H1-L1-V-L2-H2, y
- (dd) H2-L2-V-L1-H1,

en donde V comprende un fragmento de VWF descrito en el presente documento;

cada uno de L1 y L2 comprende un conector opcional; y

H1 comprende un primer resto heterólogo; y

5 H2 comprende un segundo resto heterólogo opcional. Cualquiera o ambos del primer resto heterólogo y el segundo resto heterólogo puede ser un resto prolongador de la semivida. En un caso, H1 comprende un polipéptido, un resto no de polipéptido, o ambos. El polipéptido útil como H1 puede comprender una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, cualquier derivado o variante, o cualquier combinación de los mismos. El resto no de polipéptido puede comprender polietilenglicol (PEG), ácido polisiálico y hidroxietilalmidón (HES), un derivado o variante de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. En otro caso, H2 comprende un polipéptido, un resto no de polipéptido, o ambos. El polipéptido útil como H2 puede comprender una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, cualquier derivado o variante, o cualquier combinación de los mismos. El resto no de polipéptido puede comprender polietilenglicol (PEG), ácido polisiálico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado o variante de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos casos, el conector entre H1 y H2 en las fórmulas (aa) y (bb) es un conector procesable. En otros casos, el conector entre el fragmento de VWF y H1 en las fórmulas (aa) y (bb) es un conector escindible, por ejemplo, un conector escindible de trombina que se puede escindir por trombina.

20 La orientación de las fórmulas de polipéptido en el presente documento se enumera de extremo N (izquierda) a extremo C (derecha). Por ejemplo, la fórmula H-L-V significa la fórmula NH₂-H-L-V-COOH. En un caso, las fórmulas descritas en el presente documento pueden comprender secuencias adicionales entre los dos restos. Por ejemplo, la fórmula V-L1-H1-L2-H2 puede comprender además secuencias en el extremo N de V, entre V y L1, entre L1 y H1, entre H1 o L2, entre L2 o H2, o en el extremo C de H2, a menos que se especifique de otro modo. En otro caso, el guión (-) indica un enlace peptídico o uno o más aminoácidos.

25 En casos específicos, una proteína quimérica comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una o más fórmulas seleccionadas del grupo que consiste en (a1) V-H, (a2) H-V, (a3) V-L-H, (a4) H-L-V, (a5) V-L1-H1-H2, (a6) H2-H1-L1-V, (a7) V-L1-H1:H2, (a8) H2:H1-L1-V, (a9) V-H1:H2, (b1) H2:H1-V, (b2) V-L1-H1-L2-H2, (b3) H2-L2-H1-L1-V, (b4) H1-V-H2, (b5) H1-L1-V-L2-H2, y (b6) H2-L2-V-L1-H1, en donde V comprende uno o más de los fragmentos de VWF descritos en el presente documento, L, L1 o L2 comprende un conector, H o H1 comprende un primer resto heterólogo. En un caso, el primer resto heterólogo (H1) puede ser un polipéptido, un resto no de polipéptido, o ambos. El resto heterólogo de polipéptido puede comprender una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes del resto no de polipéptido útil como H1 incluyen polietilenglicol (PEG), ácido polisiálico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. En otro caso, H2 comprende un segundo resto heterólogo. El segundo resto heterólogo puede ser un polipéptido, un resto no de polipéptido, o ambos. El resto heterólogo de polipéptido puede comprender una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes del resto no de polipéptido útil como H1 incluyen polietilenglicol (PEG), ácido polisiálico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos casos, el conector entre el primer resto heterólogo y el segundo resto heterólogo es un conector procesable. En otros casos, el conector entre el fragmento de VWF y el primer resto heterólogo o el segundo resto heterólogo es un conector escindible, que comprende uno o más sitios de escisión, por ejemplo, un conector escindible de trombina.

45 La proteína quimérica de la presente invención comprende una fórmula seleccionada del grupo que consiste en (aa), (bb), (cc), (dd), (a1), (a2), (a3), (a4), (a5), (a6), (a7), (a8), (a9), (b1), (b2), (b3), (b4), (b5) y (b6) y una proteína FVIII, que se une covalentemente o se asocia covalentemente al fragmento de VWF, el primer resto heterólogo (por ejemplo, una primera región Fc), o el segundo resto heterólogo (por ejemplo, una segunda región Fc) de la fórmula. En una realización, la proteína FVIII se une o asocia al fragmento de VWF por un enlace covalente o por un conector. En otra realización, la proteína FVIII se puede unir al primer resto heterólogo o el segundo resto heterólogo por un enlace covalente o por un conector.

55 En una realización, una proteína quimérica de la presente invención comprende un fragmento de VWF descrito en el presente documento unido covalentemente a o asociado covalentemente a una proteína FVIII. Por ejemplo, la proteína quimérica puede comprender un fragmento de VWF y una proteína FVIII, en donde el fragmento de VWF y la proteína FVIII se unen por un enlace no peptídico covalente, un enlace peptídico, o por un conector, por ejemplo, un conector escindible. En una realización específica, el fragmento de VWF y la proteína FVIII se unen a o interaccionan entre sí por uno o más enlaces disulfuro. En otra realización, el fragmento de VWF unido a o que interacciona con la proteína FVIII se une o fusiona con un primer resto heterólogo. En otras realizaciones, la proteína FVIII unida a o que interacciona con el fragmento de VWF se une además a un segundo resto heterólogo. En algunas realizaciones, el fragmento de VWF unido a o que interacciona con la proteína FVIII se une además a un primer resto heterólogo y la proteína FVIII se une además a un segundo resto heterólogo. En ciertas realizaciones, la primera cadena de polipéptidos que comprende el fragmento de VWF y el primer resto heterólogo y la segunda cadena de polipéptidos que comprende la proteína FVIII y el segundo resto heterólogo se asocian entre sí de forma

que la asociación no permita la interacción de la proteína FVIII con otros restos, por ejemplo, VWF endógeno, en donde la asociación es un enlace covalente, por ejemplo, un enlace disulfuro.

5 Cada uno del fragmento de VWF o la proteína FVIII se puede unir o conectar al primer y segundo resto heterólogo por un conector, por ejemplo, un conector escindible, por ejemplo, un conector escindible de trombina. El conector entre el fragmento de VWF y el primer resto heterólogo se puede indicar en el presente documento como un conector de VWF. El conector entre la proteína FVIII y el segundo resto heterólogo se puede indicar en el presente documento como un conector de FVIII. O ambos del fragmento de VWF o la proteína FVIII se pueden unir o conectar al primer y segundo resto heterólogo por un conector, por ejemplo, un conector escindible, por ejemplo, un conector escindible de trombina. En ciertas realizaciones, el primer resto heterólogo unido al fragmento de VWF comprende un polipéptido, un resto no de polipéptido, o ambos. Los ejemplos no limitantes del primer resto heterólogo de polipéptido incluyen una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, o dos o más combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes del resto no de polipéptido incluyen polietilenglicol (PEG), ácido polisiálico, hidroxietilalmidón (HES o HAES), un derivado o variante de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. En otras realizaciones, el segundo resto heterólogo unido a la proteína FVIII comprende un polipéptido, un resto no de polipéptido, o ambos. Los ejemplos no limitantes del segundo resto heterólogo incluyen una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, o dos o más combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes del resto no de polipéptido incluyen polietilenglicol (PEG), ácido polisiálico, hidroxietilalmidón (HES o HAES), un derivado o variante de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el fragmento de VWF se une a FVIII usando unión de proteínas *in vitro* mediada por sortasa. En algunas realizaciones, se usa un motivo de reconocimiento de sortasa.

25 En una realización, el primer resto heterólogo es una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma. En una realización particular, el primer resto heterólogo es una primera región Fc. En algunas realizaciones, el segundo resto heterólogo es una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma. En una realización específica, el segundo resto heterólogo es una segunda región Fc. En una realización particular, la proteína quimérica comprende un fragmento de VWF descrito en el presente documento y una proteína FVIII, en donde el fragmento de VWF se une a una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, que es una región Fc. En otra realización, la proteína quimérica comprende un fragmento de VWF descrito en el presente documento y una proteína FVIII, en donde la proteína FVIII se une a una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, que es una región Fc. En otras realizaciones, una proteína quimérica comprende un fragmento de VWF descrito en el presente documento y una proteína FVIII, en donde el fragmento de VWF se une a una primera región constante de inmunoglobulina, que es una primera región Fc, y la proteína FVIII se une a una segunda región constante de inmunoglobulina, que es una segunda región Fc, y en donde la primera región Fc o la segunda región Fc se asocian entre sí por un enlace covalente. En otras realizaciones más, el fragmento de VWF unido al primer resto heterólogo se une además al segundo resto heterólogo, por ejemplo, una segunda región Fc, por un conector, por ejemplo, un conector procesable. En un aspecto, el fragmento de VWF se une al primer resto heterólogo por un conector, por ejemplo, conector de VWF, por ejemplo, un conector escindible. En otro aspecto, la proteína FVIII se une al segundo resto heterólogo por un conector, por ejemplo, conector de FVIII, por ejemplo, un conector escindible. Los ejemplos no limitantes de restos heterólogos se desvelan en cualquier parte en el presente documento, por ejemplo, región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma en los párrafos [0165] - [0193], albúmina, fragmento o variante de la misma en los párrafos [0194] - [0198], secuencias HAP en el párrafo [0293], transferrina, fragmentos, o variantes de la misma en los párrafos [0204] - [0205], polímero, por ejemplo, polietilenglicol, en los párrafos [0206] - [0213], HES en los párrafos [0214] - [0219], o PSA en el párrafo [0220]- y secuencias PAS en los párrafos [0199] - [0202].

45 En algunas realizaciones, una proteína quimérica de la presente invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) V-L1-H1-L3-C-L2-H2,
- 50 (b) H2-L2-C-L3-H1-L1-V,
- (c) C-L2-H2-L3-V-L1-H1,
- (d) H1-L1-V-L3-H2-L2-C,
- (e) H1-L1-V-L3-C-L2-H2,
- (g) H2-L2-C-L3-V-L1-H1,
- 55 (g) V-L1-H1-L3-H2-L2-C,
- (g) C-L2-H2-L3-H1-L1-V,

- (i) H2-L3-H1-L1-V-L2-C,
- (j) C-L2-V-L1-H1-L3-H2,
- (k) V-L2-C-L1-H1-L3-H2, y
- (l) H2-L3-H1-L1-C-L2-V,

5 en donde V es un fragmento de VWF descrito en el presente documento;

cada uno de L1 o L2 es un conector opcional, por ejemplo, un conector escindible, por ejemplo, un conector escindible de trombina;

L3 es un conector opcional, por ejemplo, un conector procesable

cada uno de H1 y H2 es un resto heterólogo opcional;

10 C es una proteína FVIII; y

(-) es un enlace peptídico o uno o más aminoácidos.

En otros aspectos, una proteína quimérica de la invención comprende una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:

- (m) V-L1-H1:H2-L2-C,
- 15 (n) V-L1-H1:C-L2-H2;
- (o) H1-L1-V:H2-L2-C;
- (p) H1-L1-V:C-L2-H2;
- (q) V:C-L1-H1:H2;
- (r) V:H1-L1-C:H2;
- 20 (s) H2:H1-L1-C:V,
- (t) C:V-L1-H1:H2, y
- (u) C:H1-L1-V:H2.

en donde V es un fragmento de VWF descrito en el presente documento;

cada uno de L1 o L2 es un conector opcional, por ejemplo, un conector escindible de trombina;

25 cada uno de H1 o H2 es un resto heterólogo opcional;

(-) es un enlace peptídico o uno o más aminoácidos; y

C es una proteína FVIII; y (:) es un enlace covalente entre H1 y H2.

30 En una realización, uno o más de los restos heterólogos son un prolongador de la semivida. Los prolongadores de la semivida se conocen en la técnica, y ejemplos no limitantes de dichos prolongadores de la semivida incluyen una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina o un fragmento de la misma, un derivado o variante de los mismos, o dos o más combinaciones de los mismos. El resto no de polipéptido puede comprender polietilenglicol (PEG), ácido polisiálico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

35 En una realización, (:) en las fórmulas (m) a (u) representa al menos un enlace no peptídico. En ciertas realizaciones, la asociación química, es decir, (:) es un enlace covalente. En otras realizaciones más, (:) es un enlace peptídico. Las fórmulas (a) - (u) están incluidas en el presente documento simplemente como ejemplos no limitantes de las construcciones de la presente invención. La orientación de las fórmulas de polipéptido se muestra de extremo N (izquierda) a extremo C (derecha). Por ejemplo, la fórmula V-L1-H1-L3-C-L2-H2 significa la fórmula
40 NH₂-V-L1-H1-L3-C-L2-H2-COOH. Además, (:) puede ser una asociación o interacción entre dos cadenas de polipéptidos por un enlace covalente entre cualquier parte de la primera cadena y cualquier parte de la segunda cadena, a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, la fórmula V-H1:H2-C tiene dos cadenas de polipéptidos, siendo la primera cadena V-H1 y siendo la segunda cadena C-H2, en donde V en la primera cadena interacciona o se asocia con C en la segunda cadena y/o H1 en la primera cadena interacciona o se asocia con H2 en la segunda
45 cadena.

ES 2 753 124 T3

En ciertas realizaciones, una proteína quimérica comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:

- | | |
|--|---|
| <p>(1) V:C,</p> <p>(3) V:C-H o H-C:V,</p> <p>(5) V:C-H1:H2 o H2:H1-C:V,</p> <p>(7) H-L-V:C o C:V-L-H,</p> <p>(9) V-C o C-V,</p> <p>(11) V-H-C o C-H-V,</p> <p>(13) V-H1-C-H2 o H2-C-H1-V,</p> <p>(15) H1-V-H2-C o C-H2-V-H1,</p> <p>(17) V-L-C o C-L-V,</p> <p>(19) H-V-L-C o C-L-V-H,</p> <p>(21) V-H-L-C o C-L-H-V,</p> <p>(23) V-C-L-H o H-L-C-V,</p> <p>(25) V-L-H1:H2-C o C-H2:H1-L-V,</p> <p>(26) V-H1:H2-L-C o C-L-H2:H1-V,</p> <p>(27) V:C-H1-H2 o H2-H1-C:V,</p> <p>(28) H2-H1-V:C o C:V-H1-H2,</p> <p>(29) V:C-L-H1:H2 o H2:H1-L-C:V,</p> <p>(30) H2:H1-L-V:C o C:V-L-H1:H2,</p> <p>(31) V-L1-H1:H2-L2-C o L-L2-H2:H1-L1-V,</p> <p>(32) V:C-L-H1-H2 o H2-H1-L-C:V,</p> <p>(33) V:C-H1-L-H2 o H2-L-H1-C:V,</p> <p>(34) V:C-L1-H1-L2-H2 o H2-L2-H1-L1-C:V,</p> <p>(35) H2-H1-V:C o C:V-H1-H2,</p> <p>(36) H2-H1-L-V:C o C:V-L-H1-H2,</p> <p>(37) H2-L-H1-V:C o C:V-H1-L-H2,</p> <p>(38) H2-L2-H1-L1-V:C o C:V-L1-H1-L2-H2,</p> <p>(39) V-L1-H-L2-C o C-L2-H-L1-V,</p> <p>(40) V-L1-C-L2-H o H-L2-C-L1-V,</p> <p>(41) V-L-H 1-C-H2 o H2-C-H1-L-V,</p> <p>(42) V-H1-C-L-H2 o H2-L-C-H1-V,</p> <p>(43) V-H1-L-C-H2 o H2-C-L-H1-V,</p> <p>(44) H1-L-V-C-H2 o H2-C-V-L-H1,</p> <p>(45) H1-V-L-C-H2 o H2-C-L-V-H1,</p> <p>(46) H1-V-C-L-H o H-L-C-V-H1,</p> <p>(47) H1-L-V-H2-C o C-H2-V-L-H1,</p> | <p>(2) H-V:C o C:V-H,</p> <p>(4) V-H1:H2-C o H1-V:C-H2,</p> <p>(6) H2:H1-V:C o C:V-H1:H2,</p> <p>(8) V:C-L-H o H-L-C:V,</p> <p>(10) H-V-C o C-V-H,</p> <p>(12) V-C-H o H-C-V,</p> <p>(14) H1-V-C-H2 o H2-C-V-H1,</p> <p>(16) V-H1-H2-C o C-H2-H1-V,</p> <p>(18) H-L-V-C o C-V-L-H,</p> <p>(20) V-L-H-C o C-H-L-V,</p> <p>(22) V-L-C-H o H-C-L-V,</p> <p>(24) H-L1-V-L2-C o C-L2-V-L1-H,</p> |
|--|---|

- (48) H1-V-L-H2-C o C-H2-L-V-H1,
- (49) H1-V-H2-L-C o C-L-H2-V-H1,
- (50) V-L-H1-H2-C o C-H2-H1-L-V,
- (51) V-H1-L-H2-C o C-H2-L-H1-V,
- (52) V-H1-H2-L-C o C-L-H2-H1-V,
- (53) V-L1-H1-L2-C-H2 o H2-C-L2-H1-L1-V,
- (54) V-L1-H1-C-L2-H2 o H2-L2-C-H1-L1-V,
- (55) V-L1-H1-L2-C-L3-H2 o H2-L3-C-L2-H1-L1-V,
- (56) V-H1-L1-C-L2-H2 o H2-L2-C-L1-H1-V,
- (57) H1-L1-V-L2-C-H2 o H2-C-L2-V-L1-H1,
- (58) H1-L1-V-C-L2-H2 o H2-L2-C-V-L1-H1,
- (59) H1-L1-V-L2-C-L3-H2 o H2-L3-C-L2-V-L1-H1,
- (60) H1-V-L1-C-L2-H2 o H2-L2-C-L1-V-H1,
- (61) H1-L1-V-L2-H2-C o C-H2-L2-V-L1-H1,
- (62) H1-L1-V-H2-L2-C o C-L2-H2-V-L1-H1,
- (63) H1-L1-V-L2-H2-L3-C o C-L3-H2-L2-V-L1-H1,
- (64) H1-V-L1-H2-L2-C o C-L2-H2-L1-V-H1,
- (65) V-L1-H1-L2-H2-C o C-H2-L2-H1-L1-V,
- (66) V-L1-H1-H2-L2-C o C-L2-H2-H1-L1-V,
- (67) V-L1-H1-L2-H2-L3-C o C-L3-H2-L2-H1-L1-V, y
- (68) V-H1-L1-H2-L2-C o C-L2-H2-L1-H1-V,

V es un fragmento de VWF descrito en el presente documento;

C es una proteína FVIII;

H o H1 es un resto heterólogo o un primer resto heterólogo;

5 H2 es un segundo resto heterólogo; el primer y segundo restos heterólogos pueden ser iguales o diferentes;

cada uno de L, L1 o L2 es un conector opcional;

(-) es un enlace peptídico o uno o más aminoácidos; y

(:) es un enlace covalente. Los conectores pueden cada uno ser iguales o diferentes y pueden cada uno ser un conector escindible, que comprende uno o más sitios de escisión enzimática. Los restos heterólogos pueden ser una tecnología de prolongación de la semivida que se conoce en la técnica, un polipéptido, un resto no de polipéptido, o ambos. Un resto de polipéptido puede comprender una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, cualquier derivado o variante de los mismos, o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, una región Fc). Un resto no de polipéptido puede comprender polietilenglicol (PEG), ácido polisialílico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado o variante de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. Cada uno de H, H1 o H2 se puede seleccionar individualmente basándose en las características y pueden ser todos iguales, o cada uno diferente. Los ejemplos no limitantes de restos heterólogos se desvelan en cualquier parte en el presente documento, por ejemplo, región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma en los párrafos [0126] - [0153], albúmina o fragmento o variante de la misma en los párrafos [0154] - [0157], polímero, por ejemplo, polietilenglicol, en los párrafos [0166] - [0173], y secuencias PAS en los párrafos [0159] - [0162]. Las fórmulas (1) - (68) están incluidas en el presente documento simplemente como ejemplos no limitantes de construcciones de la presente invención.

En una realización, (:) representa al menos un enlace no peptídico. En ciertas realizaciones, la asociación química, es decir, (:) es un enlace covalente. En otras realizaciones más, (:) es un enlace peptídico.

5 En una realización, el primer resto heterólogo (H o H1) unido al fragmento de VWF en la proteína quimérica es una primera región Fc. En otra realización, el segundo resto heterólogo (o H2) unido a la proteína FVIII en la proteína quimérica es una segunda región Fc.

10 En ciertas realizaciones, una proteína quimérica de la invención comprende dos cadenas de polipéptidos, una primera cadena que comprende, consiste esencialmente en, o que consiste en una secuencia de aminoácidos que codifica FVIII (por ejemplo, FVIII de cadena sencilla) y un primer resto heterólogo (por ejemplo, una primera región Fc) y una segunda cadena que comprende, consiste esencialmente en, o que consiste en una secuencia de aminoácidos que codifica un fragmento de VWF que comprende dominio D' y dominio D3, un segundo resto heterólogo (por ejemplo, una segunda región Fc), y un conector entre el fragmento de VWF y el segundo dominio Fc (por ejemplo, conector de VWF). El conector entre el fragmento de VWF y el segundo dominio Fc puede ser un conector escindible de trombina. En algunas realizaciones, la proteína FVIII de cadena sencilla comprende un tercer resto heterólogo, por ejemplo, un prolongador de la semivida, que se une al extremo N, extremo C, o uno o más sitios dentro de la secuencia de FVIII.

15 En otras realizaciones, una proteína quimérica de la invención comprende tres cadenas de polipéptidos, en donde una primera cadena comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una cadena pesada de FVIII, una segunda cadena comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una cadena ligera de FVIII fusionada con un primer resto heterólogo (por ejemplo, una primera región Fc), y una tercera cadena de polipéptidos comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un fragmento de VWF que comprende el dominio D' y el dominio D3, un segundo resto heterólogo (por ejemplo, una segunda región Fc) y un conector. El conector entre el fragmento de VWF y el segundo resto heterólogo puede ser un conector escindible de trombina. En algunas realizaciones, la cadena pesada FVIII se une a un tercer resto heterólogo, por ejemplo, un prolongador de la semivida, que se puede unir al extremo N, extremo C, o uno o más sitios dentro de la secuencia de FVIII.

20 Aún en otras realizaciones, una proteína quimérica de la invención comprende dos cadenas de polipéptidos, una primera cadena que comprende, consiste esencialmente en, o que consiste en una cadena pesada de FVIII y una segunda cadena que comprende, consiste esencialmente en, o que consiste en una cadena ligera de FVIII, un primer resto heterólogo (por ejemplo, una primera región Fc), un primer conector (por ejemplo, un sitio de escisión de proteasa que comprende uno o más sitios de procesamiento intracelular), un fragmento de VWF, un segundo conector (por ejemplo, un conector escindible de trombina), y un segundo resto heterólogo (por ejemplo, una segunda región Fc), en donde la cadena ligera de FVIII se une al primer resto heterólogo (por ejemplo, la primera región Fc), que se une además al fragmento de VWF por el primer conector (por ejemplo, un conector procesable que tiene un sitio de escisión de proteasa que comprende uno o más sitios de procesamiento intracelular), y en donde el fragmento de VWF se une a la segunda región Fc por el segundo conector (por ejemplo, un conector escindible de trombina). En ciertas realizaciones, el primer conector y el segundo conector son idénticos o diferentes.

25 En ciertas realizaciones, una proteína quimérica de la invención comprende una cadena de polipéptidos, que comprende una proteína FVIII de cadena sencilla, un primer resto heterólogo (por ejemplo, una primera región Fc), un primer conector (por ejemplo, un conector escindible de trombina), un fragmento de VWF, un segundo conector (por ejemplo, un conector escindible de trombina), y un segundo resto heterólogo (por ejemplo, una segunda región Fc), en donde la proteína FVIII de cadena sencilla se une al primer resto heterólogo, que también se une al fragmento de VWF por el primer conector, y el fragmento de VWF se une a la segunda región Fc por el segundo conector. En una realización, el primer conector es un conector escindible que comprende un primer sitio escindible y un segundo sitio escindible. En otra realización, el segundo conector es un conector escindible que comprende uno o dos sitios escindibles. En una realización específica, el segundo conector es un conector escindible de trombina. El conector útil en la invención puede ser de cualquier longitud, por ejemplo, al menos 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 o 700 aminoácidos. Por ejemplo, el conector puede ser 20 aminoácidos, 35 aminoácidos, 42 aminoácidos, 73 aminoácidos, o 98 aminoácidos.

30 En ciertas realizaciones, el fragmento de VWF se une directamente a la proteína FVIII por un enlace peptídico o un conector. Como una forma de unir el fragmento de VWF y la proteína FVIII directamente o mediante un conector, se puede emplear una unión enzimática (por ejemplo, sortasa). Por ejemplo, sortasa se refiere a un grupo de enzimas procariotas que modifican las proteínas de la superficie reconociendo y escindiendo una señal de clasificación de extremo carboxilo. Para la mayoría de los sustratos de enzimas sortasas, la señal de reconocimiento consiste en el motivo LPXTG (Leu-Pro-cualquiera-Thr-Gly (SEQ ID NO: 106), luego una secuencia transmembranaria altamente hidrófoba, luego una agrupación de restos básicos tales como arginina. La escisión ocurre entre Thr y Gly, con unión transitoria mediante el resto de Thr debido al resto de Cys de sitio activo de un componente de unión, seguido por transpeptidación que une la proteína covalentemente a la pared celular. En algunas realizaciones, el componente de unión contiene Gly(n).

35 En una realización, un fragmento de VWF unido a un motivo de reconocimiento de sortasa por un conector opcional se puede fusionar con una proteína FVIII unida a Gly(n) por una sortasa, en donde n puede ser cualquier número entero. Una construcción de unión comprende el fragmento de VWF (porción de extremo N de la construcción) y la

proteína FVIII (porción de extremo C de la construcción), en donde el motivo de reconocimiento de sortasa se inserta entre medias. Una construcción a modo de ejemplo se muestra en la Figura 24(A). Otra construcción de unión comprende el fragmento de VWF (porción de extremo N de la construcción, el conector, el motivo de reconocimiento de sortasa y la proteína FVIII (porción de extremo C de la construcción) (por ejemplo, Figura 24(C)). En otra

 5 realización, una proteína FVIII unida a un motivo de reconocimiento de sortasa por un conector opcional se puede fusionar con un fragmento de VWF unido a Gly(n) por una sortasa, en donde n es cualquier número entero. Una construcción de unión resultante comprende la proteína FVIII (porción de extremo N de la construcción) y el

 10 fragmento de VWF (porción de extremo C de la construcción), en donde el motivo de reconocimiento de sortasa se inserta entremedias. Una construcción a modo de ejemplo se muestra en la Figura 24(B). Otra construcción de unión resultante comprende la proteína FVIII (porción de extremo N de la construcción), el conector, el motivo de

 15 reconocimiento de sortasa y el fragmento de VWF (porción de extremo C de la construcción) (por ejemplo, la Figura 24(D)). En otras realizaciones, un fragmento de VWF unido a un motivo de reconocimiento de sortasa por un primer conector opcional se puede fusionar con un resto heterólogo, por ejemplo, una región constante de inmunoglobulina

 20 o una porción de la misma, por ejemplo, una región Fc, unida a un sitio de escisión de trombina por un segundo conector opcional. Una construcción resultante puede comprender el fragmento de VWF (porción de extremo N), el primer conector, el motivo de reconocimiento de sortasa, el sitio de escisión de proteasa, el segundo conector

 25 opcional y el resto heterólogo (por ejemplo, Figura 24(E)). En ciertas realizaciones, esta construcción resultante es una parte de una proteína quimérica que comprende la proteína FVIII y un segundo resto heterólogo, por ejemplo, una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, por ejemplo, una segunda región Fc. En un

 30 ejemplo, en otro ejemplo, un quimérico comprende tres cadenas de polipéptidos, comprendiendo la primera cadena un fragmento de VWF, el primer conector, el motivo de reconocimiento de sortasa, el sitio de escisión de proteasa, el segundo conector opcional, el primer resto heterólogo, la segunda cadena que comprende la cadena ligera de la

 proteína FVIII y el segundo resto heterólogo, y comprendiendo la tercera cadena la cadena pesada de la proteína FVIII.

25 En otras realizaciones más, la proteína quimérica de la invención que comprende un fragmento de VWF y una proteína FVIII, en donde el fragmento de VWF y la proteína FVIII se asocian covalentemente entre sí o se unen covalentemente entre sí, tiene menos inmunogenicidad que una proteína FVIII sin el fragmento de VWF. La reducida

 30 inmunogenicidad incluye, pero no se limita a, menos respuesta inmunitaria humoral, por ejemplo, menos título de anticuerpo neutralizante, o menos respuesta inmunitaria celular contra FVIII, por ejemplo, producción de diversas citocinas.

Aún en otras realizaciones, como resultado de la invención, la semivida de la proteína FVIII (o una proteína quimérica) se prolonga en comparación con una proteína FVIII sin el fragmento de VWF o FVIII no mutante. La

 35 semivida de la proteína FVIII es al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al

 40 menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, o al menos aproximadamente 12 veces más larga que la semivida de una proteína FVIII sin el fragmento de VWF. En una realización, la semivida de FVIII es aproximadamente 1,5 veces a

 45 aproximadamente 20 veces, aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 15 veces, o aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 10 veces más larga que la semivida de FVIII no mutante. En otra realización, la semivida de FVIII se prolonga aproximadamente 2 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 veces a

 50 aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 2 veces a

 55 aproximadamente 3 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 2,5 veces a

 60 aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 7 veces, o aproximadamente 6 veces a

 65 aproximadamente 8 veces en comparación con FVIII no mutante o una proteína FVIII sin el fragmento de VWF. En otras realizaciones, la semivida de FVIII es al menos aproximadamente 17 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 19 horas, al menos aproximadamente 20 horas, al menos aproximadamente 21 horas, al menos aproximadamente 22 horas, al menos aproximadamente 23 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 25 horas, al menos aproximadamente 26 horas, al menos aproximadamente 27 horas, al menos aproximadamente 28 horas, al menos aproximadamente 29 horas, al menos aproximadamente 30 horas, al menos aproximadamente 31 horas, al menos aproximadamente 32 horas, al menos aproximadamente 33 horas, al menos aproximadamente 34 horas, al menos aproximadamente 35 horas, al menos aproximadamente 36 horas, al menos aproximadamente 48 horas, al menos aproximadamente 60 horas, al menos aproximadamente 72 horas, al menos aproximadamente 84 horas, al menos aproximadamente 96 horas, o al menos aproximadamente 108 horas. En otras realizaciones más, la semivida de FVIII es aproximadamente 15 horas a aproximadamente dos

semanas, aproximadamente 16 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 17 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 18 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 19 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 20 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 21 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 22 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 23 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 24 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 36 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 48 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 60 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 24 horas a aproximadamente seis días, aproximadamente 24 horas a aproximadamente cinco días, aproximadamente 24 horas a aproximadamente cuatro días, aproximadamente 24 horas a aproximadamente tres días, o aproximadamente 24 horas a aproximadamente dos días.

En algunas realizaciones, la semivida promedio de la proteína FVIII por sujeto es aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas (1 día), aproximadamente 25 horas, aproximadamente 26 horas, aproximadamente 27 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 29 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 33 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 44 horas, aproximadamente 48 horas (2 días), aproximadamente 54 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas (3 días), aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas (4 días), aproximadamente 108 horas, aproximadamente 120 horas (5 días), aproximadamente seis días, aproximadamente siete días (una semana), aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, o aproximadamente 14 días.

En ciertas realizaciones, la semivida de la proteína FVIII unida covalentemente al fragmento de VWF se puede prolongar en ratones doblemente inactivados ("DKO") en FVIII/VWF en comparación con un polipéptido que consiste en FVIII o un híbrido monómero-dímero de FVIII.

A) Fragmentos de factor de von Willebrand (VWF)

VWF (también conocido como F8VWF) es una glucoproteína multimérica grande presente en plasma sanguíneo y producido constitutivamente en endotelio (en los cuerpos de Weibel-Palade), megacariocitos (α -gránulos de plaquetas) y tejido conjuntivo subendotelial. El monómero básico de VWF es una proteína de 2813 aminoácidos. Cada monómero contiene varios dominios específicos con una función específica, los dominios D' y D3 (que juntos se unen al factor VIII), el dominio A1 (que se une a receptor de GPIb de plaquetas, heparina, y/o posiblemente colágeno), el dominio A3 (que se une a colágeno), el dominio C1 (en el que el dominio de RGD se une a integrina de plaquetas α IIb β 3 cuando ésta se activa), y el dominio de "nudo de cisteína" en el extremo C de la proteína (cuyo VWF comparte con factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β (TGF β) y gonadotropina coriónica humana β (hCG)).

La secuencia de aminoácidos del monómero 2813 para VWF humano se informa como Número de acceso NP_000543.2 en Genbank. La secuencia de nucleótidos que codifica el VWF humano se informa como Número de acceso NM_000552.3 en Genbank. La secuencia de nucleótidos de VWF humano se designa SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1. Cada dominio de VWF se enumera en la Tabla 1.

ES 2 753 124 T3

Tabla 1

Dominios de VWF	Secuencia de aminoácidos	
Péptido señal de VWF (Aminoácidos 1 a 22 de SEQ ID NO: 2)	1	<u>MIPARFAGVL LALALILPGT LC</u> 22
Región D1D2 de VWF (Aminoácidos 23 a 763 de SEQ ID NO: 2)	23	AEGTRGRS STARCSLFGS
	51	DFVNTFDGSM YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVLSVYLGE FFDIHLFVNG
	101	TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
	151	SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
	201	ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
	251	EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME
	301	YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTTECPC
	351	VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECVL TGQSHFKSFD
	401	NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
	451	LHNSLVKCLKH GAGVAMDQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
	501	DWDGRGRLLV KLSVPYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPVEDFG
	551	NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
	601	PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL
	651	NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
	701	CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
	751	AVLSSPLSHR SKR 763
Dominio D' de VWF (Aminoácidos 764 a 866 de SEQ ID NO:2)	764	<u>SLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK</u>
	801	<u>TCQNYDLECM</u> <u>SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE</u> <u>TVKIGCNTCV</u>
	851	<u>CRDRKWNCTD HVCDAT</u> 866
Dominio D3 de VWF (Aminoácidos 867 a 1240 de SEQ ID NO: 2)	867	<u>CSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ</u>
	901	<u>YVLVQDYCGS</u> <u>NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELEFDGE</u> <u>VNVKRP MKDE</u>
	951	<u>THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE</u> <u>KVCGLCGNFD</u>
	1001	<u>GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVP LD</u> <u>SSPATCHNNI</u>
	1051	<u>MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDP EPY LDVCIYDTCS</u> <u>CESIGDCACF</u>
	1101	<u>CDTIAAYAHV CAQH GKVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY</u> <u>ECEWRYN SCA</u>
	1151	<u>PACQVTCQHP EPLACP VQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC</u> <u>VPEDCPVCE</u>
	1201	<u>VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP</u>
	1240	

ES 2 753 124 T3

Dominios de VWF	Secuencia de aminoácidos
Dominio A1 de VWF (Aminoácidos 1241 a 1479 de SEQ ID NO: 2)	<p>1241 GGLVVPPTDA</p> <p>1251 FVSPPTLYVE DISEPPLHDF YCSRLLDLVF LLDGSSRLSE AEFEVLKAFV</p> <p>1301 VDMMERLRIS QKWVRVAVVE YHDGSHAYIG LKDRKRPESEL RRIASQVKYA</p> <p>1351 GSQVASTSEV LKYTLFQIFS KIDRPEASRI ALLLMASQEP QRMSRNFVRY</p> <p>1401 VQGLKKKKVI VIPVGIGPHA NLKQIRLIEK QAPENKAFVL SSVDELEQQR</p> <p>1451 DEIVSYLCDL APEAPPPTLP PDMAQVTVG 1479</p>
	<p>1480 P GLLGVSTLGP KRNSMVLDDVA</p> <p>1501 FVLEGS DKIG EADFNRSKEF MEEVIQRMDV GQDSIHVTVL QYSYMTVEY</p> <p>1551 PFSEAQSKGD ILQRVREIRY QGGNRTNTGL ALRYLSDHSF LVSQGDREQA 1600</p> <p>1601 PNLVYMTGN PASDEIKRLP GDIQVPIGV GPNANVQELE RIGWPNAPIL</p> <p>1651 IQDFETLPRE APDLVLQRCC SGEGLQIPTL SPAPDCSQPL DVILLLDGSS</p> <p>1701 SFPASYFDEM KSAKAFISK ANIGPRLTQV SVLQYGSITT IDVPWNVPE</p> <p>1751 KAHLLSLVDV MQREGGPSQI GDALGFAVRY LTSEMHGARP GASKAVVILV</p> <p>1801 TDVSVDSVDA AADAARSNRV TVFPIGIGDR YDAAQLRILA GPAGDSNVVK</p> <p>1851 LQRIEDLPTM VTLGNSFLHK LSCGFVRICM DEDGNEKRRG DVWTLPDQCH</p> <p>1901 TVTCQPDGQT LLKSHRVNCD RGLRSPCPNS QSPVKVEETC GCRWTCPCVC</p> <p>1951 TGSSTRHIVT FDGQNFKLTG SCSYVLFQNK EQDLEVILHN GACSPGARQG</p> <p>2001 CMKSEVKHS ALSVEXHSDM EVTVNGRLVS VPYVGGNMEV NVYGAIMHEV</p> <p>2051 RFNHLGHIFT FTPQNEFQL QLSPKTFASK TYGLCGICDE NGANDFMLRD</p> <p>2101 GTVTTDWKTL VQEWTVQRPQ QTCQPILEEQ CLVPDSSHCO VLLPLFAEC</p> <p>2151 HKVLAPATFY AICQQDSCHQ EQVCEVIASY AHLCRTNGVC VDWRTPDFCA</p> <p>2201 MSCPPSLVYN HCEHGCPRHG DGNVSSCGDH PSEGCFPPD KVMLEGSCVP</p> <p>2251 EEAQTQCIGE DGVQHQFLEA WVPDHQPCQI CTCLSGRQVN CTTQPCPTAK</p> <p>2301 APTCGLCEVA RLRQADQCC PEYECVDFV SCDLPPVPHC ERGLQPTLTN</p> <p>2351 PGECRPNFTC ACRKEECKRV SPPSCPPHRL PTLRKTQCCD EYECACNCVN</p> <p>2401 STVSCPLGYL ASTATNDCGC TTTTCLPKV CVHRSTIYPV GQFWEEGCDV</p>
	<p>2451 CTCTDMEDAV MGLRVAQCSQ KPCEDSCRSG FTYVLHEGEC CGRCLPSACE</p> <p>2501 VVTGSPRGDS QSSWKS VGSQ WASPENPCLI NECVRVKEEV FIQQRNVSCP</p> <p>2551 QLEVPCPSG FQLSCKTSAC CPSCRCERME ACMLNGTVIG PGKTVMIDVC</p> <p>2601 TTCRCMVQVG VISGFKLECR KTTNCPCLG YKEENNTGEC CGRCLPTACT</p> <p>2651 IQLRGGQIMT LKRDETLQDG CDTHFCKVNE RGEYFWEKRV TGCPFFDEHK</p> <p>2701 CLAEGGKIMK IPGTCCDTCE EPECNDITAR LQYVKVGSCK SEVEVDIHYC</p> <p>2751 QGKCASKAMY SIDINDVQDQ CSCCSPTRTE PMQVALHCTN GSVVYHEVLN</p> <p>2801 AMECKSPRK CSK</p>

ES 2 753 124 T3

	Secuencia de nucleótidos
VWF de longitud completa (SEQ ID NO: 1)	<p>ATGATTCCCTG CCAGATTTGCG CGGGGTGCTG CTGCTCTGG CCCTCATTTC</p> <p>GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACFCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC</p> <p>TACTAAGGAC GGTCTAAACG GCCCCACGAC GAACGAGACC GGGAGTAAAA</p> <p>CGGTCCCTGG GAAACACGTC TTCTTGAGC GCCGTCCAGT AGGTGCCGGG</p> <p>GATGCAGCCT TTTCCGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG</p> <p>TACAGCTTTG CCGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA</p> <p>CTACGTCGGA AAAGCCTTCA CTGAAGCAGT TGTGGAAACT ACCCTCGTAC</p> <p>ATGTCGAAAC GCCCTATGAC GTCAATGGAG GACCGTCCCC CGACGGTCTT</p> <p>ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC</p> <p>TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTGTGACA TCCATTGTG TGTCAATGGT</p> <p>TGCGAGGAAG AGCTAATAAC CCCTGAAGGT CTTACCGTTC TCTCACTCGG</p> <p>AGAGGCACAT AGAACCCCTT AAAAAACTGT AGGTAAACAA ACAGTTACCA</p> <p>ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAGG</p> <p>GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGCCT</p> <p>TGGCACTGTG TCCCCTGGT TTCTCAGAGG TACGGGATAC GGAGGTTTCC</p> <p>CGACATAGAT CTTTGACTCC GACCCATGAT GTTCGACAGG CCACTCCGGA</p> <p>ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCTGCTG</p> <p>TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT</p> <p>TACCGAAACA CCGGTCCCTAG CTACCGTCGC CGTTGAAAGT TCAGGACGAC</p> <p>AGTCTGTCTA TGAAGTTGTT CTGGACGCCC GACACACCGT TGA AATTGTA</p> <p>CTTTGTCTGAA GATGACTTTA TGACCCAGA AGGGACCTTC ACCTCGGACC</p> <p>CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT</p> <p>GAAACGACTT CTA CTGAAAT ACTGGGTCT TCCCTGGACT TGGAGCCTGG</p> <p>GAATACTGAA ACGGTTGAGT ACCCGAGACT CGTCACCTCT TGTCAACACA</p> <p>GAACGGGCAT CTCCTCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT</p> <p>GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT</p> <p>CTTGCCCGTA GAGGAGGGTC GTCCGAGTACG TTGTAGAGGA GACCCCTTTA</p> <p>CGTCTTCCCG GACACCCCTG TCACGGTCTGA AGACTTCTCG TGGAGCCACA</p> <p>TTGCCCGCTG CCACCCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCTGTGT</p> <p>GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCCTGC</p> <p>AACGGGCGAC GGTGGGAGAC CACCTGGGGC TCGGAAAACA CCGGGACACA</p> <p>CTCTTCTGAA ACACACTCAC ACGACCCCCC GACCTCACGC GGACGGGACG</p> <p>CCTCCTGGAG TACGCCCGGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG</p> <p>GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCCAGCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG</p> <p>GGAGGACCTC ATGCGGGCCT GGACACGGGT CCTCCCTTAC CACGACATGC</p> <p>CGACCTGGCT GGTGTCGCGC ACCTCGGGTC ACACGGGACG ACCATACCTC</p> <p>TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCCCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT</p> <p>CAATGAAATG TGTCAGGAGC GATGCGTGGG TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG</p> <p>ATATCCGTCA CACACAGGGG AACGCGGTCC TGGACGGTCT CGGACGTGTA</p> <p>GTTACTTTAC ACAGTCTCTG CTACGCACCT ACCGAGTCG ACGGGACTCC</p> <p>GACAGTCTCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC</p> <p>GTGCATTCGG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG</p> <p>CTGTCGAGGA CCTACTTCCG GAGACGCACC TCTCGTGGCT CACAGGGACG</p> <p>CACGTAAGGC CTTTCGCGAT GGGAGGGCCG TGGAGGGAGA GAGCTCTGAC</p> <p>CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT</p> <p>GTCCAGGGGA GTGCCTTGTG ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC</p>

ES 2 753 124 T3

	Secuencia de nucleótidos				
	GTTGTGGACG CAGGTCCCCT AACAGATACT TFGCCAGGAC TTGTCTATGA AACGGTCCTG ATGACCGCGA CTGCACAACA TACTGGCGCT GACGTGTTGT TGGCCAGGAC ATACAGTGAC ACCGGTCCTG TATGTCACTG GACTGGGATG CGGGAAGACC CTGACCCTAC GCCCTTCTGG ACTTCCTTAC AACGCCTGGA TGAAGGAATG TTGCGGACCT CGATCCCTGC GCGCGGTCTT GCTAGGGAGC CGCGCCAGGA CCGCTGCCCT CGGCCCGGAG GGCGACGGGA GCCGGCGCTC CGGGGAGAGG AACTGCCCGA GCCCTCTCC TTGACGGGCT GACCTGCCGC TGGAGGGCTG ACCTCCCGAC TGCGTGCCCA GCCAGGAGAC ACGCACGGGT CGGTCTTCTG GCTTCATGCA GCTGTCTCA CGAAGTACGT CGACAGGAGT TCGGCCCCC AAGGGCTCGA AGCCGGGGG TTCCCAGGCT AGCATGGGCT TGAGAACAGA TCGTACCCGA ACTCTGTCT AGGAGTATGC TGTCGGGACC TCCTCATACG ACAGCCCTGG CTCCACGATC TGTTCCCCG GAGGTGCTAG ACAAGGGGCC AACCCTGGGA CTCAGTGAAA TTGGGACCCT	TAAACGGCCT CACGGAACAG TCACCTTCAG CACTCCCTCT AGTGGAAAGTC GTGAGGAAGA CGCTGTGTGC GCCTTGTGAA GCGACACACG CGGAACACTT ATCCAGCTCC GGCCTCCGTC TAGGTCCGAG CCCGAGGCAC GCCGCGGGAG TGCGGCCCTGT ACGCGCCCTC CCCCTCTGGG AGCTGCACGG GGGAGACCC TCGACGTGCC CCCTCAACC GACGTCCCC CGGGAGTGG CTGCAGGGG ACCTGCCGAA TGCTGTGGC TGGACGCCCT ACGACACACG CGCGGGACCG CGGTGGCGCG GTACCTGCAG AAGGCCAGST GCACCCGCG ATCCTCTCAG TCCGGGTCCAC TAGAAGAGTC CTGTACCATG GACGTCCCC GACATGGTAC CGTCAGGGGA ATGGTCAAGC GTGTACCAAA TACCAGTTCG CACATGGTIT TGCAGAGACC CACAGAGACC ACACACCGGG CCCTGGAGAA GGAAGTGGAA GGGACCTCTT CCTTACCTT GGCATGGCCC GGAGTGCCAG CCGTACCGGG CCTCACGGTC CCTTCCGGAT TGCAAGAAAC	TGTCGGTCAC TGACCAGTTA TGGGATCTGC CCATTGTCCAT ACCCTAGACG GGTAACAGTA ACCCGCTCCG ACTGAAGCAT TGGGCGAGGC TGACTTCGTA CCCTCTGAA CGCCTCAGCT GGGAGGACTT GCGGAGTGA GCTGTGTGGT GTGGGAATTA CGACGACCAC CACCTTAAT CTGGCRGAGC GGACTGCCAG GACCGYCTCG CGCGCATGAC ACATTGAGG GCGCCTACTG GCGCCTGGC GACGCGCATG GTCCAGAGG GCGCCCTGCG TGTAAGCTCC GTCCCGCTAC GCGCCTGGC GACGCGCATG CGCGGGACCG GCGTGGCGCG GTACCTGCAG CGCACCGGC CATGGACGTC TGGTAGTGTG AGTGGAGTCC GTCCTCATCG TCACCTCAGG CAGAGTAGCG GACGAGACG ACCGGAGTCC TGACTCTG GACGTGTCTG GTACACACAC GACGTGTCTG ACTACCTCAC TACGTTCTGG TGATGGAGTG ATGCAAGACC CCTAGTGGG GGGTCAACCT GGATCACCC	CTAGACGTCG GGGTGAAGTT CAGTACCTGC TGACACTCTC GTCATGGACG ACTCTGACAG TCACCGTCCG GGGGCAGGAG AGTGGCAGGC CCCCGTCCTC AGGTGACCTC ACGGGGAGGA TCCACTGGAG TGCCCCCTCT AAGCTGTCCC GTGGCAAC GTTACCGTTG CCCGGTGGA GACCTGCAGA GGCCCCACCT CTGGACGCTC CAGGTTCTCC CCTGCCATCG GTCCAAGAGG GGACGGTAGC GACGTGTGCT CAGCTATGCC CTCAGACGA GTCGATACGG AGCCAGGCCG TGCGGGACCC TCGGTCCGGC ACGCCCCTGGG ACATGGATGA CCTTACGTTA GTCGAGGAGG TGTACCTACT TATGACGGTG CATGTGCTAC GTACACGATG CCGGAAGCTT AGCAAAAGGA GGCCTTCGAA TCGTTTTCCCT CGCTGACAAC ACTATGACCT GCGACTGTTG TGATACTGGA CCCCCGGGCA TCCCTGCCTC CATCAGGGCA GCGGGCCCGT ACCAGGCCGT AGGGACGAAG TTGGCTGCAA CATGTGTGTG AACCAGCGTT GTACACACAC CTTCGACGGG TGCAGGATTA GAAGCTGCCC ACGTCCTAAT AATAAGGGAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA CGTGGTGGG	TTACTTCTTA CTCGAAACTG TGGCCCGGGA CAGTGTCTCG ACCGGGCCCT GTCACACGAC GCTGCCTGGC TTGCCATGGA CGACGGACCG AACGGTACCT CGCATCCAGC CCTGCAGATG CCCTAGGTCG GGACGTCTAC CCGTCTATGC CAGCGCGAGC GGCAGATACG GTCGCCGTGC GGACTTCGGG AGCAGCACAG CCTGAAGCCC TGGTGTGTG TCCGAGGCT GCGGAGGCT TGCCGTCAGC CTCCTCCGCA ACGGCAGTCG CCTGCTCGGA GCGGCCCTGG GGACGAGCCT CGCGGACGC CTGTGAGCTG CCTGCAACCT GACACTCGAC GGACGTGGGA TCTAGAAAGT GAGGCCTGCC GAGGGGGGAC CTCCGGACGG CTCCCCCTG AGATCTTCCA TGTTGAGGATG TCTAGAAAGT GAGGCCTGAC GCCATCCIG CGACGGACTG CGGATAGGAC CTGCGGGCTG GGAGTGCATG GACGCCCGAC CCTCACGTAC TGGTCCGGCA CATCAGGGCA ACCAGGCCGT GTAGTCCCCT CACTTGTGTC ATGCCACGTG GTGAACACAG TACGGTGCAC CTCAAATACC CTGCGGCAGT GAGTTATGG GACGCCGTCA GCAGCCACC GGAGGAGAGA CGTGGTGGG

ES 2 753 124 T3

	Secuencia de nucleótidos
	<p>GAGTCACTTT ACGTTCTTTG CCCAGTGGTA GGACCACCTC CCTCCTCTCT TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG ACTCACTTTG AGGTGGTGA GTCTGGCCGG TACATCATTG TGCTGCTGGG AACTCAGCAA AACTGCCCTC CACTTACACT TCTCCCGCTA CTTCCTACTC TGAGTGAAAC TCCACCACCT CAGACCGGCC ATGTAGTAAG ACGACGACCC CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGAT GTTTCGGGAG AGGCACCAGA CCCTGGCGGT GGACTCGTAG AGGCACCAGG ACTTCGTCTG TATGGTCTC TTTACACAC CGGACACACC CTAAAACTA GGCATCCAGA ACAAAGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAAGT GAGCTCGCAG TGCTCTGACA CCGTAGGTCT TGTACTGGA GTGGTCGTG TTGGAGGTTT ACCTCCTTCT GGGACACCTG AAACCCCTGA GGACCTTTCA CTCGAGCGCT AACCAGACTG CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC ATGAAGCAGA CGATGGTGA TTCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACCT GGTCTTTTCA CGGAGACCTG AGTAGGGGAC GGTGGAGCGT ATGTTGTAG TACTTCGTCT GCTACCACCT AAGGAGGACA TCTTAGGAAT GGTACTGCA CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT GCATTTACGA CACCTGTCTC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCTGTCTC GAAGGTCCTG ACGTTGTTCG ACCACCTGGG GCTCGGTATA GACTACAGA CGTAAATGCT GTGGACGAG ACACTCAGGT AACCCCTGAC GCGGACGAAG TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCCACTG TGTGCCAGC ATGGCAAAGT GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA ACGCTGTGGT AACGACGGAT ACGGGTGCAC ACACGGGTCG TACCGTTCCA CCACTGGACC TCCTGCCGCT GTAACACGGG GGTCTCGAAC CTCCTCTCCT ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGTGTGAGT GGCCTATAA CAGCTGTGCA CCTGCCCTGT AAGTCACTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT TAGAGGCCCT CTTGCCATA CTCACACTCA CCGCATATT GTCGACACCT GGACGGACAG TTCAGTGCAC AGTCGTGGGA CTCGGTGACC GGACGGGACA GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCACTG CCTCCAGGG AAAATCCTGG ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG CGTACACAC CTCCGACGG TACGGGTGAC GGGAGGTPCC TTTTAGGACC TACTCGAAA CGTCTGGAC CAACTGGGAC TTCTGACAG TCACACACTC GTGGCTGGCC GGCCTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCAG TGACCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT CACCGACCGG CCGCAAAACG GAGTCCTTT TTTCACTGGA ACTTAGGGTC ACTGGGACTC TGGACGGTCT AAACGGTGAC ACTACAACAG TTGGAGTGA GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG GAGGGCCTGG TGGTGCCTCC CACAGATGCC CCGGTGGACC CCACCACTCT GTATGTGGAG GACATCTCGG AACCGCCCTT CACTTCGGAC GGTCTCGGC CCTCCGGACC ACCACGGAGG GTGTCTACGG GGCCACTCGG GGTGGTGA GA CATAACCTC CTGTAGAGCC TTGGCGGCAA GCACGATTTT TACTGCAGCA GGCTACTGGA CCTGGTCTTC CTGCTGGATG GCTCCTCCAG GCTGTCCGAG GCTGAGTTT AAGTGTGAA GGCCTTTGTG CGTGC'AAAG ATGAC'GCT' CCGA'GACCT' GGACCAGAA GGACACTAC CGAGGAGGTC CGACAGGCTC CGACTCAAAC TTCACGACTT CCGGAAACAC GTGGACATGA TGGAGCGGCT GCGCATCTCC CAGAAGTGGG TCCGCGTGGC CGTGGTGGAG TACCACGACG GCTCCACGC CTACATCGGG CTCAAGGACC CACCTGTACT ACCTCGCCGA CGCGTAGAGG GTCTTCACCC AGGCACACCG GCACCACCTC ATGGTGTCTC CGAGGGTGGG GATGTAGCCC GAGTCTCTGG GGAAGCGACC GTCAGAGCTG CGCGCATTTG CCAGCCAGGT GAAGTATGCG GGCAGCCAGG TGGCTCCAC CAGCGAGGTC TTGAAATACA CACTGTTCCA CCTTCGCTGG CAGTCTCGAC GCGCGTAAC GGTGGTCCA CTTCATACGC CCGTCCGTC ACCCGAGGTG GTCGCTCCAG AACTTTATGT GTGACAAGGT AATCTTCAGC AAGATCGACC GCGCTGAAGC CTCCCGCATC GCGCTGTCTC TGATGGCCAG CCAGGAGCCC CAACGGATGT CCGGGAACCT TG'CCGCTAC TTAGAAGTCG TTCTAGCTGG CCGGACTTCG GAGGGCGTAG CCGGACGAGG ACTACCGGTC GGTCTCGGG GTTGCTACA GGCCTTGAA ACAGGCGATG GTCCAGGGCC TGAAGAAGAA GAAGGTCAIT GTGATCCCGG TGGCATTGG GCCCCATGCC AACCTCAAGC AGATCCGCCT CATCGAGAAG CAGGCCCTTG CAGGTCCCGG ACTTCTCTT CTTCAGTAA CACTAGGGCC ACCCGTAACC CGGGTACGG TTGGAGTTCG TCTAGGCGGA GTAGCTCTT CTCGGGGAC AGAACAAAGG CTTCGTGCTG AGCAGTGTGG ATGAGCTGGA GCAGCAAAGG GACGAGATCG TTAGCTACTT CTGTGACCTT GCGCCTGAAG CCGCTCTCC TCTTGTTCGG GAAGCACGAC TCGTACACCT TACTCGACCT CGTCTTTCC CTGCTTAGG AATCGATGGA GACACTGGAA CCGGACTTC GGGGAGGAGG</p>

ES 2 753 124 T3

	Secuencia de nucleótidos				
	TACTCTGCC	CCCGACATGG	CACAAAGTCAC	TGTGGGCCCG	GGGCTCTTGG
	GGGTTTCGAC	CCTGGGGCC	AAGAGGAACT	CCATGGTTCT	GGATGTGGCG
	ATGAGACGGG	GGGCTGTACC	GTGTTTCAGTG	ACACCCGGGC	CCCAGAAACC
	CCCAAACCTC	CGACCCCGCG	TTCTCCTTGA	GGTACCAACA	CCTACACCCG
	TTCGTCTCGG	AAGGATCGSA	CAAAATTGGT	GAAGCCGACT	TCAACAGGAG
	CAAGGAGTTC	ATGGAGGAGG	TGATTCAGCG	GATGGATGTG	GGCCAGGACA
	AAGCAGGACC	TTCTAGCCT	GTTTTAACCA	CTTCGGCTGA	AGTTGTCTCT
	GTTCCTCAAG	TACCTCCTCC	ACTAAGTCGC	CTACCTACAC	CCGGTCTCTG
	GCATCCACGT	CACGGTGTG	CAGTACTCCT	ACATGGTGAC	CGTGGAGTAC
	CCCTTCAGCG	AGGCACAGTC	CAAAGGGGAC	ATCCTGCAGC	GGGTGCGAGA
	CGTAGGTGCA	GTGCCACGAC	GTCATGAGGA	TGTACCACTG	GCACCTCATG
	GGGAAGTCCG	TCCGTGTGAG	GTTTCCCTTG	TAGGACGTGG	CCCACGCTCT
	GATCCGCTAC	CAGGGCCGCA	ACAGGACCAA	CACCTGGGCT	CCCTCGGCT
	ACCTCTCTGA	CCACAGCTTC	TTGGTCAGCC	AGGGTGACCG	GGAGCAGGGG
	CTAGGCGGATG	GTCCCGCCGT	TGTCCTGGTT	GTGACCCGAC	CGGGACGCCA
	TGGAGAGACT	GGTGTGGAAG	AACCAGTCGG	TCCCACCTGG	CCTCGTCCGC
	CCCAACCTGG	TCTACATGST	CACCCGAAAT	CCTGCCCTCG	ATGAGATCAA
	GAGGCTGCCT	GGAGACATCC	AGGTGGTGCC	CATGGAGGTG	GGCCCTAATG
	GGGTTGGACC	AGATGTACCA	GTGGCCTTTA	GGACGGAGAC	TACTCTAGTT
	CTCCGACGGA	CCTCTGTAGG	TCCACCACGG	GTAACCTCAC	CCGGGATTAC
	CCAACGTGCA	GGAGCTGGAG	AGGATTGGCT	GGCCCAATGC	CCCTATCCTC
	ATCCAGGACT	TTGAGACGCT	CCCCCGAGAG	GCTCCTGACC	TGGTGTCTGA
	GGTTGCACGT	CCTCGACCTC	TCCTAACCGA	CGGGTTACG	GGGATAGGAG
	TAGGTCCTGA	AACTCTGCCA	GGGGCTCTC	CGAGGACTGG	ACCACGACGT
	GAGGTGCTGC	TCCGGAGAGG	GGCTGCAGAT	CCCCACCTC	TCCCTGCAC
	CTGACTGCAG	CCAGCCCTG	GACGTGATCC	TTCTCCTGGA	TGGCTCTCTC
	CTCCACGACG	AGGCCCTCTC	CCGACGTCTA	GGGGTGGGAG	AGGGGACCTG
	GACTGACGTC	GGTCGGGGAC	CTGCACTAGG	AAGAGGACCT	ACCCAGGAGG
	AGTTTTCCAG	CTTCTTATTT	TGATGAAATG	AAGAGTTTCG	CCAAGGCTTT
	CATTTCAAAA	CCCAATATAG	GGCCTCGTCT	CACCTCAGGTG	TCAGTGCTGC
	TCAAAGGGTC	GAAGAATAAA	ACTACTTTAC	TTCTCAAAGC	GGTCCGAAA
	GTAAAGTTTT	CGGTTATATC	CCGGAGCAGA	GTGAGTCCAC	AGTACACGAG
	AGTATGGAAG	CATCACCACC	ATTGACGTGC	CATGGAACGT	GGTCCCGGAG
	AAAGCCCAT	TGCTGAGCCT	TGTGGACGTC	ATGCAGCGGG	AGGGAGGCC
	TCATACCTTC	GTAGTGGTGG	TAACCTGCAG	GTACCTTGCA	CCAGGGCCTC
	TTTCGGGTAA	ACGACTCGGA	ACACCTGCAG	TACGTGCCCC	TCCCTCCGGG
	CAGCCAAATC	GGGGATGCCT	TGGGCTTTGC	TGTGCGATAC	TTGCACTCAG
	AAATGCATGG	TGCCAGGCCG	GGAGCCTCAA	AGGCGGTGGT	CATCCTGGTC
	GTCGGTTTAG	CCCTACGSA	ACCCGAAACG	ACACGCTATG	AACTGAAATC
	TTTACGTACC	ACGGTCCGGC	CCTCGGAGTT	TCCGCCACCA	CATGAGCCAG
	ACGGACGTCT	CTGTGGATTG	AGTGGATGCA	GCAGCTGATG	CCGCCAGGTC
	CAACAGAGTG	ACAGTGTTC	CTATTGGAAT	TGGAGATCGC	TACGATGCAG
	TGCCTGCAGA	GACACCTAAG	TCACCTACGT	CGTCGACTAC	GGCGGTCCAG
	GTGTCTCAC	TGTCACAASG	GATAACCTTA	ACCTCTAGCG	ATGCTACGTC
	CCCAGCTACG	GATCTTGGCA	GGCCCAGCAG	CGGACTCCAA	CGTGGTGAAG
	CTCCAGCGAA	TCGAAAGACCT	CCCTACCATG	GTACACCTGG	GCATCTCCTT
	GGGTCGATGC	CTAGAACCST	CCGGTCTGTC	CGCTGAGGTT	GCACCACTTC
	GAGGTCGCTT	AGCTTCTGGA	GGGATGGTAC	CAGTGGAAAC	CGTTAAGGAA
	CCTCCACAAA	CTGTGCTCTG	GATTTGTTAG	GATTTGATG	GATGAGGATG
	GGAAATGAGAA	GAGGCCCGGG	GACGCTTGGA	CCTTGCAGGA	CCAGTGCCAC
	GGAGGTGTTT	GACACGAGAC	CTAAACAATC	CTAAACGTAC	CTACTCCTAC
	CCTTACTCTT	CTCCGGGCC	CTGCAGACCT	GGAACGGTCT	GGTACCGGTG
	ACCGTGACTT	GCCAGCCASA	TGGCCAGACC	TTGCTGAAGA	GTCATCCGGT
	CAACTGTGAC	CGGGGGCTGA	GGCCTTCGTG	CCCTAACACG	CAGTCCCTGT
	TGGCACTGAA	CGGTCGGTCT	ACCGGCTGCG	AACGACTTCT	CAGTAGCCCA
	GTTGACACTG	GCCCCGACT	CCGGAAGCAC	GGGATTGTG	GTCAGGGGAC
	TTAAAGTGGAA	AGAGACCTGT	GGCTGCCGCT	GGACCTGCCC	CTGYGTGTGC
	ACAGGCAGCT	CCACTCGGCA	CATCGTGACC	TTTGATGGGC	AGAATTTCAA
	AATTTACACT	TCTCTGGACA	CCGACGGCGA	CCTGGACGGG	GACRCACACG
	TGTCCGTCGA	GGTGAGCCST	GTAGCACTGG	AAACTACCCG	TCTTAAAGTT
	GCTGACTGGC	AGCTGTTCTT	ATGTCCTATT	TCAAAAACAAG	GAGCAGGACC
	TGGAGGTGAT	TCTCCATAAT	GGTGCCTGCA	GCCTGGAGC	AAGGCAGGGC
	CGACTGACCG	TCGACAAGAA	TACAGGATAA	AGTTTTGTTT	CTCGTCTCTG
	ACCTCCACTA	AGAGGTATTA	CCACGGACGT	CGGGACCTCG	TTCCGTCCCG
	TGCATGAAAT	CCATCGAGST	GAAGCACAGT	GCCTCTCCG	TCGAGSTGCA

ES 2 753 124 T3

	Secuencia de nucleótidos				
	CAGTGACATG	GAGGTGACGG	TGAATGGGAG	ACTGGTCTCT	GTTCCTTACG
	ACGTACTTTA	GGTAGCTCCA	CTTCGTGTCA	CGGGAGAGGC	AGTCSACGT
	GTCACTGTAC	CTCCACTGCC	ACTTACCCTC	TGACCAGAGA	CAAGGAATGC
	TGGCTGGCAA	CATGGAAGTC	AACGTTTATC	GTGCCATCAT	GCATGACCTC
	AGATTCAATC	ACCTTGGTCA	CATCTTCACA	TTCACTCCAC	AAAACAATGA
	ACCCACCCTT	GTACCTTCAG	TTGCCAATAC	CACGGTAGTA	CGTACTCCAG
	TCTAAGTTAG	TGGAACCAST	GTAGAAGTGT	AAGTGAGGTG	TTTGTGTACT
	GTTCCAAC TG	CAGCTCAGCC	CCAAGACTTT	TGCTTCAAAG	ACGTATGGTC
	TGTGTGGGAT	CTGTGATGAG	AACGGAGCCA	ATGACTTCAT	GCTGAGGGAT
	CAAGGTTGAC	GTCGAGTCGG	GGTTCTGAAA	ACGAAGTTTC	TGCATACCAG
	ACACACCCTA	GACACTACTC	TTGCCTCGGT	TACTGAAGTA	CGACTCCCTA
	GGCACAGTCA	CCACAGACTG	GAAAACACTT	GTTCAGGAAT	GGACTGTGCA
	GCGGCCAGGG	CAGACGTGCC	AGCCCATCCT	GGAGGACAG	TGCTCTGTCC
	CCGTGTCAGT	GGTGTCTGAC	CTTTTGTGAA	CAAGTCTTA	CCTGACACGT
	CGCCGGTCCC	GTCTGCACGG	TCGGGTAGGA	CCTCCTCGTC	ACAGAAACAGG
	CCGACAGCTC	CCACTGCCAG	GTCCCTCCTC	TACCCTGTGT	TGCTGAAATGC
	CACAAGGTCC	TGGCTCCASC	CACATTCTAT	GCCATCTGCC	AGCAGGACAG
	GGCTGTGCAG	GGTGACGGTC	CAGGAGGAGA	ATGGTGACAA	ACGACTTACG
	GTGTTCCAGG	ACCGAGGTCC	GTGTAAGATA	CGGTAGACGG	TCGTCCTGTC
	TTGCCACCAG	GAGCAAGTGT	GTGAGGTGAT	CGCCTCTTAT	GCCACCTCT
	GTCGGACCAA	CGGGGTCTGC	GTTGACTGGA	GGACACCTGA	TTCTCTGTGCT
	AACGGTGGTC	CTCGTTCACA	CACTCCACTA	GCGGAGAATA	CGGGTGGAGA
	CAGCCTGGTT	CCCCAGACAG	CAACTGACCT	CCTGTGGACT	AAAGACACGA
	ATGTCATGCC	CACCATCTCT	GGTCTACAAC	CACTGTGAGC	ATGGCTGTCC
	CCGGCCTGTT	GATGGCAACG	TGAGCTCCTG	TGGGGACCAT	CCCTCCGAGG
	TACAGTACGG	GTGGTAGAGA	CCAGATGTTG	GTGACACTCG	TACCGACAGG
	GGCCGTGACA	CTACCGTTC	ACTCGAGGAC	ACCCCTGGTA	GGGAGGCTTC
	GCTGTTTCTG	CCCTCCAGAT	AAAGTCATGT	TGGAAGGCAG	CTGTGTCCCT
	GAAGAGGCCT	GCACTCAGTG	CATTGGTGAG	GATGGAGTCC	AGCACCAGTT
	CGACAAGAC	GGGAGGTCTA	TTTCAGTACA	ACCTTCCGTA	GACACAGGGA
	CTTCTCCGGA	CGTGAGTCAC	GTAACCACTC	CTACCTCAGG	TCGTGGTCAA
	CCTGGGAAGCC	TGGGTCCCAG	ACCACCAGCC	CTGTCAAGATC	TGCACATGCC
	TCAGCGGGCC	GAAGGTCAAC	TGCACAACGC	AGCCCTGCCC	CACGGCCAAA
	GGACCCTTCGG	ACCCAGGGCC	TGGTGGTCCG	GACAGTCTAG	ACGTGTACGG
	AGTCGCCCGC	CTTCCAGTTG	ACGTGTGGG	TCGGGACGGG	GTGCCGGTIT
	GCTCCACAGT	GTGGCCTGTG	TGAAAGTAGCC	CGCCTCCGCC	AGAAATGCAGA
	CCAGTGTGTC	CCCGAGTATG	AGTGTGTGTG	TGACCCAGTG	AGCTGTGACC
	CGAGGGTGCA	CACCAGGACAC	ACTTCAATCGG	GCGGAGGCGG	TCTTACGTCT
	GGTCACGACG	GGGCTCATA	TCACACACAC	ACTGGGTAC	TCGACACTGG
	TGCCCCAGT	GCCTCACTGT	GAACGTGGCC	TCCAGCCCAC	ACTGACCAAC
	CCTGGCGAGT	CGAGACCCAA	CTTCACTGC	GCCTGCAGGA	AGGAGGATG
	ACGGGGGTCA	CGGAGTGACA	CTTGCAACGG	AGTCCGGGTG	TGACTGGTTG
	GGACCCTCA	CGTCTGGGTT	GAAGTGGACG	CGGACCTCCT	TCCCTCTCAC
	CAAAAGAGTG	TCCCCACCTT	CCTGCCCCCC	GCACCGTTTG	CCCACCTTTC
	GGAAGACCCA	GTGCTGTGAT	GAGTATGAGT	GTGCCTGCAA	CTGTGTCAAC
	GTTTTCTCAC	AGGGGTGGGA	GGACGGGGGG	CGTGGCAAAT	GGGTGGGAAAG
	CCTTCTGGGT	CAGGACACTA	CTCATACTCA	CACGGACGTT	GACACAGTTG
	TCCACAGTGA	GCTGTCCCTT	TGGGTAATTT	GCCTCAACCG	CCACCAATGA
	CTGTGGCTGT	ACCACAACCA	CCTGCCTTCC	CGACAAGGTG	TGTCTCCACC
	AGGTGTCACT	CGACAGGGGA	ACCCATGAAC	CGGAGTTGGC	GGTGGTTACT
	GACACCGACA	TGGTGTGGT	GGACGGAAGG	GCTGTTCCAC	ACACAGGTGG
	GAAGCACCAT	CTACCCTGTG	GGCCAGTTCT	GGGAGGAGGG	CTGCGATGTG
	TGCACCTGCA	CCGACATGSA	GGATGCCGTG	ATGGGCCCTC	GCCTGGCCCA
	CTTCGTGGTA	GATGGGACAC	CCGGTCAAGA	CCCTCTTCCC	GACGCTACAC
	ACGTGGACGT	GGCTGTACCT	CCTACGGCAC	TACCCGGAGG	CGCACCCGGT
	GTGCTCCAG	AAGCCCTGTG	AGGACAGCTG	TCGGTCCGGC	TTCAGTTACG
	TTCTGCATGA	AGGCCAGTGC	TGTGGAAGGT	GCCTGCCATC	TGCTGTGAG
	CACGAGGGTC	TTCCGGACAC	TCCTGTGAC	AGCCAGCCCG	AAGTGAATGC
	AAGACGTACT	TCCGCTCACG	ACACCTTCCA	CGGACGGTAG	ACGGACACTC
	GTGGTGACTG	GCTCACCCGG	GGGGGACTCC	CAGTCTTCC	GGAAGAGTGT
	CGGCTCCAG	TGGGCCTCCC	CGGAGAACC	CTGCCTCATC	AATGAGTGTG
	CACCCTGAC	CGAGTGGCCG	CCCCCTGAGG	GTCAGAAGGA	CCTTCTCACA
	GCCGAGGGTC	ACCCGGAGGG	GCCTCTGGG	GACGGAGTAG	TACTTCACAC
	TCCGAGTGAA	GGAGGAGGTC	TTTATACAAC	AAAGGAACGT	CTCCTGCCCC
	CAGCTGGAGG	TCCCTGTCTG	CCCCTCGGGC	TTTCAGTGA	GCTGTAAGAC

	Secuencia de nucleótidos
	AGGCTCACTT CCTCCTCCAG AAATATGTTG TTCCTTGCA GAGGACGGGG GTCGACCTCC AGGGACAGAC GGGGAGCCCG AAAGTCGACT CGACATTCTG CTCAGCGTGC TGCCCAAGCT GTCGCTGTGA GCGCATGGAG GCCTGCATGC TCAATGGCAC TGTCATTGGG CCCGGGAAGA CTGTGATGAT CGATGTGTGC GAGTCGCACG ACGGGTTCGA CAGCGACACT CGCGTACCTC CGGACGTACG AGTTACCGTG ACAGTAACCC GGGCCCTTCT GACACTACTA GCTACACACG ACGACCTGCC GCTGCATGGT GCAGGTGGGG GTCATCTCTG GATTCAAGCT GGAGTGCAGG AAGACCACCT GCAACCCCTG CCCCCTGGGT TACAAGGAAG TGCTGGACGG CGACGTACCA CGTCCACCCC CAGTAGAGAC CTAAGTTCGA CCTCACGTCC TTCTGGTGGA CGTGGGGAC GGGGGACCCA ATGTTCCTTC AAAATAACAC AGGTGAATGT TGTGGGAGAT GTTGGCTAC GGCTPGCACC ATTCAGCTAA GAGGAGGACA GATCATGACA CTGAAGCGTG ATGAGACGCT TTTTATTGTG TCCACTTACA ACACCCCTTA CAAACGGATG CCGAACSTGG TAAGTCGATT CTCCTCCTGT CTAGTACTGT GACTTTCGCA TACTCTGCGA CCAGGATGGC TGTGATACTC ACTTCTGCAA GGTCAATGAG AGAGGAGAGT ACTTCTGGGA GAAGAGGGTC ACAGGCTGCC CACCCCTTGA TGAACACAAG GGTCTTACCG ACACTATGAG TGAAGACGTT CCACTTACTC TCTCCTCTCA TGAAGACCCT CTTCTCCCAG TGTCCGACGG GTGGGAAACT ACTTGTGTTC TGTCTTGCTG AGGGAGGTAA AATTATGAAA ATTCAGGCA CCTGCTGTGA CACATGTGAG GAGCCTGAGT GCAACGACAT CACTGCCAGG CTGCAGTATG ACAGAACGAC TCCCTCCAT TTAATACTTT TAAGGTCGTG GGACGACACT GTGTACTACT CTCGGACTCA CGTTGCTGTA GTGACGGTCC GACGTCATAC TCAAGTGGG AAGCTGTAAG TCTGAAGTAG AGGTGGATAT CCACTACTGC CAGGGCAAAT GTGCCAGCAA AGCCATGTAC TCCATTGACA TCAACGATGT AGTTCCACCC TTCGACATTC AGACTTCATC TCCACCTATA GGTGATGAG GTCCCGTTTA CACGGTCTGT TCGGTACATG AGGTAACGTG AGTTGCTACA GCAGGACCAG TGCTCCTGCT GCTCTCCGAC ACGGACGGAG CCCATGCAGG TGGCCCTGCA CTGCACCAAT GGCTCTGTTG TGTACCATGA GGTCTCAAT CGTCTGCTC ACGAGGACGA CGAGAGGCTG TGCCTGCCTC GGGTACCTCC ACCGGGACGT GACGTGGTTA CCGAGACAAC ACATGGTACT CCAAGATTA GCCATGGAGT GCAATGCTC CCCAGGAAG TGCAGCAAGT GA

La presente invención se refiere a un fragmento de factor de von Willebrand (VWF) que comprende un dominio D' y un dominio D3 de VWF, en donde el fragmento de VWF inhibe la unión de VWF endógeno (VWF de longitud completa) a una proteína FVIII. En una realización, el fragmento de VWF se une por un enlace covalente a una proteína FVIII. El fragmento de VWF de la invención protege FVIII de la escisión por proteasa y activación de FVIII, estabiliza la cadena pesada y cadena ligera de FVIII, y previene la eliminación de FVIII por receptores depuradores. En otra realización, el fragmento de VWF se une por un enlace covalente a una proteína FVIII y bloquea o previene la unión de la proteína FVIII a fosfolípido y proteína C activada. Previendo o inhibiendo la unión de la proteína FVIII con VWF endógeno de longitud completa, el fragmento de VWF de la invención reduce la eliminación de FVIII por receptores de eliminación de VWF y así prolonga la semivida de FVIII. La prolongación de la semivida de una proteína FVIII se debe así a la unión o asociación con el fragmento de VWF que carece de un sitio de unión de receptor de eliminación de VWF a la proteína FVIII y que escuda o que protege la proteína FVIII por el fragmento de VWF de VWF endógeno que contiene el sitio de unión de receptor de eliminación de VWF. La proteína FVIII unida a o protegida por el fragmento de VWF también puede permitir la recirculación de una proteína FVIII. Por tanto, el fragmento de VWF no puede ser VWF maduro de longitud completa. Eliminando los sitios de unión de receptor de la vía de eliminación de VWF contenidos en la molécula de VWF de longitud completa, los heterodímeros FVIII/VWF de la invención se desacoplan de la vía de eliminación de VWF, que permite la prolongación adicional de la semivida de FVIII.

El fragmento de VWF que comprende el dominio D' y el dominio D3 puede comprender además un dominio de VWF seleccionado del grupo que consiste en un dominio A1, un dominio A2, un dominio A3, un dominio D1, un dominio D2, un dominio D4, un dominio B1, un dominio B2, un dominio B3, un dominio C1, un dominio C2, un dominio CK, uno o más fragmentos de los mismos, y cualquier combinación de los mismos. En una realización, un fragmento de VWF comprende, consiste esencialmente en, o consiste en: (1) los dominios D' y D3 de VWF o fragmentos de los mismos; (2) los dominios D1, D' y D3 de VWF o fragmentos de los mismos; (3) los dominios D2, D' y D3 de VWF o fragmentos de los mismos; (4) los dominios D1, D2, D' y D3 de VWF o fragmentos de los mismos; o (5) los dominios D1, D2, D', D3 y A1 de VWF o fragmentos de los mismos. El fragmento de VWF descrito en el presente documento no contiene un sitio que se una a un receptor de eliminación de VWF. En otra realización, el fragmento de VWF descrito en el presente documento no es los aminoácidos 764 a 1274 de SEQ ID NO: 2. El fragmento de VWF de la presente invención puede comprender cualquier otra secuencia unida a o fusionada con el fragmento de VWF, pero no es VWF de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento de VWF descrito en el presente documento puede comprender además un péptido señal.

En una realización, un fragmento de VWF de la presente invención comprende el dominio D' y el dominio D3 de VWF, en donde el dominio D' es al menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a los aminoácidos 764 a 866 de SEQ ID NO: 2, en donde el fragmento de VWF se une a una proteína FVIII,

- escuda, inhibe o previene la unión del fragmento de VWF endógeno a una proteína FVIII. En otra realización, un fragmento de VWF comprende el dominio D' y el dominio D3 de VWF, en donde el dominio D3 es al menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a los aminoácidos 867 a 1240 de SEQ ID NO: 2, en donde el fragmento de VWF se une a una proteína FVIII o inhibe o previene la unión del fragmento de VWF endógeno a una proteína FVIII. En algunas realizaciones, un fragmento de VWF descrito en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el dominio D' y dominio D3 de VWF, que son al menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticos a los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 2, en donde el fragmento de VWF se une a una proteína FVIII o inhibe o previene la unión del fragmento de VWF endógeno a una proteína FVIII. En otras realizaciones, un fragmento de VWF comprende, consiste esencialmente en, o consiste en los dominios D1, D2, D' y D3 al menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a los aminoácidos 23 a 1240 de SEQ ID NO: 2, en donde el fragmento de VWF se une a una proteína FVIII o inhibe o previene la unión de fragmento de VWF endógeno a una proteína FVIII. En otras realizaciones más, el fragmento de VWF comprende además un péptido señal operativamente unido al mismo.
- En algunas realizaciones, un fragmento de VWF de la invención consiste esencialmente de o consiste en (1) el dominio D'D3, el dominio D1 D'D3, dominio D2 D'D3, o dominio D1D2 D'D3 y (2) una secuencia de VWF adicional de hasta aproximadamente 10 aminoácidos (por ejemplo, cualquier secuencia desde los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 2 hasta los aminoácidos 764 a 1250 de SEQ ID NO: 2), hasta aproximadamente 15 aminoácidos (por ejemplo, cualquier secuencia desde los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 2 hasta los aminoácidos 764 a 1255 de SEQ ID NO: 2), hasta aproximadamente 20 aminoácidos (por ejemplo, cualquier secuencia desde los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 2 hasta los aminoácidos 764 a 1260 de SEQ ID NO: 2), hasta aproximadamente 25 aminoácidos (por ejemplo, cualquier secuencia desde los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 2 hasta los aminoácidos 764 a 1265 de SEQ ID NO: 2), o hasta aproximadamente 30 aminoácidos (por ejemplo, cualquier secuencia desde los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 2 hasta los aminoácidos 764 a 1260 de SEQ ID NO: 2). En una realización particular, el fragmento de VWF que comprende o que consiste esencialmente en el dominio D' y el dominio D3 no es ni los aminoácidos 764 a 1274 de SEQ ID NO: 2 ni VWF maduro de longitud completa.
- En otras realizaciones, el fragmento de VWF que comprende los dominios D'D3 unidos a los dominios D1D2 comprende además un sitio de escisión intracelular, por ejemplo, (un sitio de escisión por PACE o PC5), que permite la escisión de los dominios D1D2 de los dominios D'D3 tras la expresión. Los ejemplos no limitantes del sitio de escisión intracelular se desvelan en cualquier parte en el presente documento.
- Aún en otras realizaciones, un fragmento de VWF comprende el dominio D' y el dominio D3, pero no comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (1) aminoácidos 1241 a 2813 de SEQ ID NO: 2, (2) aminoácidos 1270 a aminoácidos 2813 de SEQ ID NO: 2, (3) aminoácidos 1271 a aminoácidos 2813 de SEQ ID NO: 2, (4) aminoácidos 1272 a aminoácidos 2813 de SEQ ID NO: 2, (5) aminoácidos 1273 a aminoácidos 2813 de SEQ ID NO: 2, y (6) aminoácidos 1274 a aminoácidos 2813 de SEQ ID NO: 2.
- En otras realizaciones más, un fragmento de VWF de la presente invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio D', dominio D3 y dominio A1, en donde la secuencia de aminoácidos es al menos 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica al aminoácido 764 a 1479 de SEQ ID NO: 2, en donde VWF se une a FVIII. En una realización particular, el fragmento de VWF no es los aminoácidos 764 a 1274 de SEQ ID NO: 2.
- En algunas realizaciones, un fragmento de VWF de la invención comprende el dominio D' y el dominio D3, pero no comprende al menos un dominio de VWF seleccionado del grupo que consiste en (1) un dominio A1, (2) un dominio A2, (3) un dominio A3, (4) un dominio D4, (5) un dominio B1, (6) un dominio B2, (7) un dominio B3, (8) un dominio C1, (9) un dominio C2, (10) un dominio CK, (11) un dominio CK y dominio C2, (12) un dominio CK, un dominio C2 y un dominio C1, (13) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, (14) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, un dominio B2, (15) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, un dominio B2, y un dominio B1, (16) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, un dominio B2, un dominio B1, y un dominio D4, (17) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, un dominio B2, un dominio B1, un dominio D4 y un dominio A3, (18) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, un dominio B2, un dominio B1, un dominio D4, un dominio A3, y un dominio A2, (19) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, un dominio B2, un dominio B1, un dominio D4, un dominio A3, un dominio A2 y un dominio A1, y (20) cualquier combinación de los mismos.
- Aún en otras realizaciones, el fragmento de VWF comprende los dominios D'D3 y uno o más dominios o módulos. Los ejemplos de dichos dominios o módulos incluyen, pero no se limitan a, los dominios y módulos desvelados en Zhou et al., Blood, publicado en línea el 6 de abril de 2012: DOI 10.1182/blood-2012-01-405134. Por ejemplo, el fragmento de VWF puede comprender el dominio D'D3 y uno o más dominios o módulos seleccionados del grupo que consiste en dominio A1, dominio A2, dominio A3, módulo D4N, módulo VWD4, módulo C8-4, módulo TIL-4, módulo C1, módulo C2, módulo C3, módulo C4, módulo C5, módulo C5, módulo C6, y cualquier combinación de los mismos.

En otras realizaciones más, el fragmento de VWF se une a un resto heterólogo, en donde el resto heterólogo se une al extremo N o el extremo C del fragmento de VWF, o se inserta entre dos aminoácidos en el fragmento de VWF. Por ejemplo, los sitios de inserción para el resto heterólogo en el fragmento de VWF pueden estar en el dominio D', el dominio D3, o ambos. El resto heterólogo puede ser un prolongador de la semivida.

- 5 En ciertas realizaciones, un fragmento de VWF de la invención forma un multímero, por ejemplo, dímero, trímero, tetrámero, pentámero, hexámero, heptámero, o los multímeros de orden superior. En otras realizaciones, el fragmento de VWF es un monómero que tiene solo un fragmento de VWF. En algunas realizaciones, el fragmento de VWF de la presente invención puede tener una o más sustituciones, deleciones, adiciones, o modificaciones de aminoácidos. En una realización, el fragmento de VWF puede incluir sustituciones, deleciones, adiciones o modificaciones de aminoácidos de forma que el fragmento de VWF no sea capaz de formar un enlace disulfuro o formar un dímero o un multímero. En otra realización, la sustitución de aminoácidos está dentro del dominio D' y el dominio D3. En una realización particular, un fragmento de VWF de la invención contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un resto correspondiente al resto 1099, resto 1142, o ambos, los restos 1099 y 1142 de SEQ ID NO: 2. La al menos una sustitución de aminoácidos puede ser cualquier aminoácido que no ocurra naturalmente en el VWF no mutante. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos puede ser cualquier aminoácido distinto de cisteína, por ejemplo, isoleucina, alanina, leucina, asparagina, lisina, ácido aspártico, metionina, fenilalanina, ácido glutámico, treonina, glutamina, triptófano, glicina, valina, prolina, serina, tirosina, arginina, o histidina. En otro ejemplo, la sustitución de aminoácidos tiene uno o más aminoácidos que previenen o inhiben que los fragmentos de VWF formen multímeros.
- 10
- 15
- 20 En ciertas realizaciones, el fragmento de VWF útil en el presente documento se puede modificar adicionalmente para mejorar su interacción con FVIII, por ejemplo, para mejorar la afinidad de unión por FVIII. Como ejemplo no limitante, el fragmento de VWF comprende un resto de serina en el resto correspondiente al aminoácido 764 de SEQ ID NO: 2 y un resto de lisina en el resto correspondiente al aminoácido 773 de SEQ ID NO: 2. Los restos 764 y/o 773 pueden contribuir a la afinidad de unión de los fragmentos de VWF por FVIII. En otras realizaciones, el fragmento de VWF puede tener otras modificaciones, por ejemplo, el fragmento puede estar pegilado, glucosilado, hesilatado, o polisialilado.
- 25

B) Restos heterólogos

- El resto heterólogo puede ser un polipéptido heterólogo o un resto no de polipéptido heterólogo. En ciertas realizaciones, el resto heterólogo es una molécula que prolonga la semivida que se conoce en la técnica y comprende un polipéptido, un resto no de polipéptido, o la combinación de ambos. El resto heterólogo de polipéptido puede comprender una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, transferrina o un fragmento de la misma, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, un derivado o variante de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el resto de unión de no polipéptido comprende polietilenglicol (PEG), ácido polisialílico, hidroxietilalmidón (HES), un derivado de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, puede haber una, dos, tres o más restos heterólogos, que pueden cada uno ser moléculas iguales o diferentes.
- 30
- 35

1) Región constante de inmunoglobulina o porción de la misma

- Una región constante de inmunoglobulina está comprendida de dominios denominados dominios CH (constantes pesados) (CH1, CH2, etc.). Dependiendo del isotipo (es decir, IgG, IgM, IgA, IgD o IgE), la región constante puede estar comprendida de tres o cuatro dominios CH. Las regiones constantes de algunos isotipos (por ejemplo IgG) también contienen una región bisagra. Véase Janeway et al. 2001, Immunobiology, Garland Publishing, N.Y., N.Y.
- 40

- Se puede obtener de varias fuentes diferentes una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma para producir la proteína quimérica de la presente invención. En realizaciones preferidas, una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma deriva de una inmunoglobulina humana. Se entiende, sin embargo, que la región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma puede derivar de una inmunoglobulina de otra especie de mamífero, que incluye, por ejemplo, una especie de roedor (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, cobaya) o primate no humano (por ejemplo, chimpancé, macaco). Además, la región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma puede derivar de cualquier clase de inmunoglobulina, que incluye IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo de inmunoglobulina, que incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización, se usa el isotipo humano IgG1.
- 45
- 50

- Están disponibles una variedad de las secuencias de genes de la región constante de inmunoglobulina (por ejemplo, secuencias de genes de la región constante humana) en forma de depósitos públicamente accesibles. Se puede seleccionar la secuencia de dominios de la región constante que tiene una función efectora particular (o que carece de una función efectora particular) o con una modificación particular para reducir la inmunogenicidad. Se han publicado muchas secuencias de anticuerpos y genes que codifican anticuerpos y se pueden derivar secuencias adecuadas de la región constante de Ig (por ejemplo, secuencias de bisagra, CH2, y/o CH3, o porciones de las mismas) de estas secuencias usando técnicas reconocidas en la técnica. Entonces, el material genético obtenido usando cualquiera de los métodos anteriores se puede alterar o sintetizar para obtener polipéptidos de la presente
- 55

invención. Se apreciará además que el alcance de la presente invención engloba alelos, variantes y mutaciones de secuencias de ADN de la región constante.

Se pueden clonar las secuencias de la región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa y cebadores que se seleccionan para amplificar el dominio de interés. Para clonar una secuencia de la región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma de un anticuerpo, se puede aislar ARNm de hibridoma, bazo o células linfáticas, transcribirse de forma inversa en ADN, y amplificarse los genes de anticuerpo por PCR. La amplificación por métodos de PCR se describe en detalle en las patentes de EE. UU. Nº 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; 4.965.188; y en, por ejemplo, "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, CA (1990); Ho et al. 1989. *Gene* 77:51; Horton et al. 1993. *Methods Enzymol.* 217:270). Se puede iniciar PCR por cebadores de la región constante consenso o por cebadores más específicos basándose en las secuencias de aminoácidos publicadas de ADN de la cadena pesada y ligera. Como se trata anteriormente, también se puede usar PCR para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo. En este caso, las bibliotecas se pueden cribar por cebadores consenso o sondas homólogas mayores, tales como sondas de región constante de ratón. Se conocen en la técnica numerosos conjuntos de cebadores adecuados para amplificación de genes de anticuerpo (por ejemplo, cebadores de 5' basados en la secuencia del extremo N de anticuerpos purificados (Benhar y Pastan. 1994. *Protein Engineering* 7:1509); amplificación rápida de extremos de ADNc (Ruberti, F. et al. 1994. *J. Immunol. Methods* 173:33); secuencias conductoras de anticuerpos (Larrick et al. 1989 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:1250). La clonación de secuencias de anticuerpos se describe además en Newman et al., patente de EE. UU. Nº 5.658.570, presentada el 25 de enero de 1995.

Una región constante de inmunoglobulina usada en el presente documento puede incluir todos los dominios y la región bisagra o porciones de la misma. En una realización, la región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma comprende dominio CH2, dominio CH3, y una región bisagra, es decir, una región Fc o un componente de unión de FcRn.

Como se usa en el presente documento, el término "región Fc" se define como la porción de un polipéptido que corresponde a la región Fc de inmunoglobulina nativa, es decir, como se forma por la asociación dimérica de los dominios Fc respectivos de sus dos cadenas pesadas. Una región Fc nativa forma un homodímero con otra región Fc. A diferencia, el término "región Fc genéticamente fusionada" o "región Fc de cadena sencilla" (región scFc), como se usa en el presente documento, se refiere a una región Fc dimérica sintética comprendida de dominios Fc genéticamente unidos dentro de una cadena sencilla de polipéptidos (es decir, codificada en una única secuencia genética contigua).

En una realización, la "región Fc" se refiere a la porción de una única cadena pesada de la inmunoglobulina que empieza en la región bisagra justo en la dirección 5' del sitio de escisión por papaína (es decir, resto 216 en IgG, que toma el primer resto de la región constante de la cadena pesada para que sea 114) y que termina en el extremo C del anticuerpo. Por consiguiente, un dominio Fc completo comprende al menos un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

La región Fc de una región constante de inmunoglobulina, dependiendo del isotipo de inmunoglobulina, puede incluir los dominios CH2, CH3 y CH4, así como la región bisagra. Las proteínas quiméricas que comprenden una región Fc de una inmunoglobulina conceden varias propiedades deseables a una proteína quimérica que incluyen elevada estabilidad, elevada semivida en suero (véase Capon et al., 1989, *Nature* 337:525), así como unión a receptores de Fc tales como el receptor de Fc neonatal (FcRn) (patentes de EE. UU. Nº 6.086.875, 6.485.726, 6.030.613; documentos de patente WO 03/077834; US2003-0235536A1).

Una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma puede ser un componente de unión de FcRn. FcRn es activo en tejidos epiteliales adultos y se expresa en la luz de los intestinos, vías respiratorias pulmonares, superficies nasales, superficies vaginales, colon y superficies rectales (patente de EE. UU. Nº 6.485.726). Un componente de unión de FcRn es una porción de una inmunoglobulina que se une a FcRn.

Se ha aislado el receptor de FcRn de varias especies de mamífero que incluyen seres humanos. Se conocen las secuencias de FcRn humano, FcRn de mono, FcRn de rata y FcRn de ratón (Story et al. 1994, *J. Exp. Med.* 180:2377). El receptor FcRn se une a IgG (pero no a otras clases de inmunoglobulina tales como IgA, IgM, IgD e IgE) a pH relativamente bajo, transporta activamente la IgG transcelularmente en una dirección de luminal a serosal, y entonces libera la IgG al pH relativamente más alto encontrado en los fluidos intersticiales. Se expresa en tejido epitelial adulto (patentes de EE. UU. Nº 6.485.726, 6.030.613, 6.086.875; documentos de patente WO 03/077834; US2003-0235536A1) que incluye epitelio pulmonar e intestinal (Israel et al. 1997, *Immunology* 92:69), epitelio tubular proximal renal (Kobayashi et al. 2002, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282:F358), así como epitelio nasal, superficies vaginales y superficies de los árboles biliares.

Los componentes de unión de FcRn útiles en la presente invención engloban moléculas que se pueden unir específicamente por el receptor FcRn que incluyen IgG completa, el fragmento Fc de IgG, y otros fragmentos que incluyen la región de unión completa del receptor FcRn. La región de la porción Fc de IgG que se une al receptor FcRn se ha descrito basándose en cristalografía de rayos X (Burmeister et al. 1994, *Nature* 372:379). La principal

5 área de contacto de Fc con el FcRn está cerca del empalme de los dominios CH2 y CH3. Los contactos Fc-FcRn están todos dentro de una cadena pesada sencilla de Ig. Los componentes de unión de FcRn incluyen IgG completa, el fragmento Fc de IgG, y otros fragmentos de IgG que incluyen la región de unión de FcRn completa. Los principales sitios de contacto incluyen los restos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 y 314 del dominio CH2 y los restos de aminoácidos 385-387, 428, y 433-436 del dominio CH3. Las referencias hechas a la numeración de aminoácidos de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas, o regiones, se basan todas en Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.

10 Las regiones Fc o componentes de unión de FcRn unidos a FcRn se pueden llevar eficazmente a través de barreras epiteliales por FcRn, proporcionando así un medio no invasivo para administrar por vía sistémica una molécula terapéutica deseada. Además, las proteínas de fusión que comprenden una región Fc o un componente de unión de FcRn son endocitadas por células que expresan el FcRn. Pero en lugar de ser marcadas para degradación, estas proteínas de fusión se recirculan fuera en la circulación otra vez, aumentando así la semivida *in vivo* de estas proteínas. En ciertas realizaciones, las porciones de regiones constantes de inmunoglobulina son una región Fc o un componente de unión de FcRn que normalmente se asocia, mediante enlaces disulfuro y otras interacciones no específicas, con otra región Fc u otro componente de unión de FcRn para formar dímeros y multímeros de orden superior.

20 Se pueden unir dos receptores de FcRn a una única molécula de Fc. Los datos cristalográficos sugieren que cada molécula de FcRn se une a un único polipéptido del homodímero de Fc. En una realización, la unión del componente de unión de FcRn, por ejemplo, un fragmento Fc de una IgG, a una molécula biológicamente activa proporciona un medio de administración de la molécula biológicamente activa por vía oral, por vía bucal, por vía sublingual, por vía rectal, por vía vaginal, como un aerosol administrado nasalmente o por una vía pulmonar, o por una vía ocular. En otra realización, la proteína quimérica se puede administrar invasivamente, por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intravenosa.

25 Un componente de unión de la región de FcRn es una molécula o una porción de la misma que se puede unir específicamente por el receptor de FcRn con el consecuente transporte activo por el receptor de FcRn de la región Fc. Se une específicamente se refiere a dos moléculas que forman un complejo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y una capacidad de baja a moderada como se distingue de la unión no específica que normalmente tiene una baja afinidad con una capacidad de moderada a alta. Normalmente, la unión se considera específica cuando la constante de afinidad K_A es superior a 10^6 M^{-1} , o superior a 10^8 M^{-1} . Si fuera necesario, se puede reducir la unión no específica sin afectar sustancialmente la unión específica variando las condiciones de unión. Un experto puede optimizar las condiciones de unión apropiadas, tales como concentración de las moléculas, fuerza iónica de la disolución, temperatura, tiempo permitido para la unión, concentración de un agente de bloqueo (por ejemplo, albúmina de suero, caseína de la leche), etc., usando técnicas rutinarias.

40 En ciertas realizaciones, una proteína quimérica de la invención comprende una o más regiones Fc truncadas que son, sin embargo, suficientes para conferir propiedades de unión de receptor de Fc (FcR) a la región Fc. Por ejemplo, la porción de una región Fc que se une a FcRn (es decir, la porción de unión de FcRn) comprende desde aproximadamente los aminoácidos 282-438 de IgG1, numeración EU (siendo los sitios de contacto primarios los aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 y 314 del dominio CH2 y los restos de aminoácidos 385-387, 428 y 433-436 del dominio CH3). Así, una región Fc de la invención puede comprender o consistir en una porción de unión de FcRn. Las porciones de unión de FcRn pueden derivar de cadenas pesadas de cualquier isotipo, que incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización, se usa una porción de unión de FcRn de un anticuerpo de isotipo humano IgG1. En otra realización, se usa una porción de unión de FcRn de un anticuerpo del isotipo humano IgG4.

50 En otra realización, la "región Fc" incluye una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc o derivada de un dominio Fc. En ciertas realizaciones, una región Fc comprende al menos uno de: un dominio de bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior) (aproximadamente los aminoácidos 216-230 de una región Fc de anticuerpo según la numeración EU), un dominio CH2 (aproximadamente los aminoácidos 231-340 de una región Fc de anticuerpo según la numeración de EU), un dominio CH3 (aproximadamente los aminoácidos 341-438 de una región Fc de anticuerpo según la numeración EU), un dominio CH4, o una variante, porción, o fragmento de los mismos. En otras realizaciones, una región Fc comprende un dominio Fc completo (es decir, un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3). En algunas realizaciones, una región Fc comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio bisagra (o una porción del mismo) fusionado con un dominio CH3 (o una porción del mismo), un dominio bisagra (o una porción del mismo) fusionado con un dominio CH2 (o una porción del mismo), un dominio CH2 (o una porción del mismo) fusionado con un dominio CH3 (o una porción del mismo), un dominio CH2 (o una porción del mismo) fusionado con tanto un dominio bisagra (o una porción del mismo) como un dominio CH3 (o una porción del mismo). En otras realizaciones más, una región Fc carece de al menos una porción de un dominio CH2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). En una realización particular, una región Fc comprende o consiste en los aminoácidos correspondientes a los números de EU 221 a 447.

Las regiones Fc indicadas como F, F1 o F2 en el presente documento se pueden obtener de varias fuentes diferentes. En una realización, una región Fc del polipéptido deriva de una inmunoglobulina humana. Se entiende, sin embargo, que una región Fc puede derivar de una inmunoglobulina de otra especie de mamífero, que incluye, por ejemplo, una especie de roedor (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, cobaya) o de primate no humano (por ejemplo, chimpancé, macaco). Además, el polipéptido de los dominios Fc o porciones de los mismos puede derivar de cualquier clase de inmunoglobulina, que incluye IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo de inmunoglobulina, que incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En otra realización, se usa el isotipo humano IgG1.

En ciertas realizaciones, la variante Fc confiere un cambio en al menos una función efectora conferida por una región Fc que comprende dicho dominio Fc no mutante (por ejemplo, una mejora o reducción en la capacidad de la región Fc para unirse a receptores de Fc (por ejemplo, FcγRI, FcγRII o FcγRIII) o proteínas del complemento (por ejemplo, C1q), o para desencadenar citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis, o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)). En otras realizaciones, la variante de Fc proporciona un resto de cisteína manipulado.

Las regiones Fc de la invención pueden emplear variantes de Fc reconocidas en la técnica que se conocen por conferir un cambio (por ejemplo, un potenciamiento o reducción) en la función efectora y/o unión de FcR o FcRn. Específicamente, una molécula de unión de la invención puede incluir, por ejemplo, un cambio (por ejemplo, una sustitución) en una o más de las posiciones de aminoácidos desveladas en las publicaciones PCT internacionales WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO04/044859, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2, y WO06/085967A2; las publicaciones de patente de EE.UU. N° US2007/0231329, US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US2007/0248603, US2007/0286859, US2008/0057056; o las patentes de EE. UU. 5.648.260; 5.739.277; 5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; 7.083.784; 7.404.956 y 7.317.091. En una realización, se puede hacer el cambio específico (por ejemplo, la sustitución específica de uno o más aminoácidos desvelados en la materia) en una o más de las posiciones de aminoácidos desveladas. En otra realización, se puede hacer un cambio diferente en una o más de las posiciones de aminoácidos desveladas (por ejemplo, la sustitución diferente de una o más posiciones de aminoácidos desvelada en la técnica).

La región Fc o componente de unión de FcRn de IgG se puede modificar según procedimientos bien reconocidos tales como mutagénesis dirigida al sitio y similares para dar IgG modificada o fragmentos Fc, o porciones de los mismos, que se unirán por FcRn. Dichas modificaciones incluyen modificaciones remotas de los sitios de contacto de FcRn, así como modificaciones dentro de los sitios de contacto que preservan o incluso potencian la unión al FcRn. Por ejemplo, se pueden sustituir los siguientes restos de aminoácidos individuales en Fc de IgG1 humana (Fcγ1) sin pérdida significativa de la afinidad de unión de Fc por FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A y K447A, donde, por ejemplo, P238A representa prolina no mutante sustituida con alanina en la posición número 238. Como un ejemplo, una realización específica incorpora la mutación N297A, retirando un sitio de N-glucosilación altamente conservado. Además de alanina, se pueden sustituir otros aminoácidos por los aminoácidos no mutantes en las posiciones especificadas anteriormente. Las mutaciones se pueden introducir individualmente en Fc, dando lugar a más de cien regiones Fc distintas de Fc nativa. Además, se pueden introducir juntas las combinaciones de dos, tres, o más de estas mutaciones individuales, dando lugar a cientos de regiones Fc más. Además, se puede mutar una de la región Fc de una construcción de la invención y la otra región Fc de la construcción no mutar en absoluto, o ambas se pueden mutar pero con mutaciones diferentes.

Ciertas de las mutaciones anteriores pueden conferir nueva funcionalidad a la región Fc o componente de unión de FcRn. Por ejemplo, una realización incorpora N297A, retirando un sitio de N-glucosilación altamente conservado. El efecto de esta mutación es reducir la inmunogenicidad, potenciando así la semivida en circulación de la región Fc, y convirtiendo la región Fc en incapaz de unirse a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIIA, sin comprometer la afinidad por FcRn (Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). Como ejemplo adicional de la nueva funcionalidad que surge de las mutaciones descritas anteriormente, la afinidad por FcRn se puede aumentar más allá de la del no mutante en algunos casos. Esta elevada afinidad puede afectar una elevada velocidad de "asociación", una reducida velocidad de "disociación", o ambas, una elevada velocidad de "asociación" y una reducida velocidad de "disociación". Los ejemplos de mutaciones que se cree que confieren una elevada afinidad por FcRn incluyen, pero no se limitan a, T256A, T307A, E380A y N434A (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591).

Además, al menos tres receptores gamma de Fc humanos parecen reconocer un sitio de unión sobre IgG dentro de la región bisagra inferior, en general, los aminoácidos 234-237. Por tanto, otro ejemplo de nueva funcionalidad y posible inmunogenicidad reducida puede surgir de mutaciones de esta región, como, por ejemplo, reemplazando los aminoácidos 233-236 de la IgG1 humana "ELLG" con la secuencia correspondiente de IgG2 "PVA" (con delección de un aminoácido). Se ha mostrado que FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que median en diversas funciones efectoras, no se unirán a IgG1 cuando se hayan introducido dichas mutaciones. Ward y Ghetie 1995, *Therapeutic Immunology* 2:77 y Armour et al. 1999, *Eur. J. Immunol.* 29:2613.

En una realización, la región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, por ejemplo, una región Fc, es un polipéptido que incluye la secuencia PKNSSMISNTP (SEQ ID NO: 3) y opcionalmente adicionalmente que incluye una secuencia seleccionada de HQSLGTQ (SEQ ID NO: 4), HQNLSGDK (SEQ ID NO: 5), HQNISDGK (SEQ ID NO: 6), o VISSHLGQ (SEQ ID NO: 7) (patente de EE. UU. N° 5.739.277).

En otra realización, la región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma comprende una secuencia de aminoácidos en la región bisagra o una porción de la misma que forma uno o más enlaces disulfuro con otra región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma. El enlace disulfuro por la región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma pone juntos el primer polipéptido que comprende FVIII y el segundo polipéptido que comprende el fragmento de VWF de manera que VWF endógeno no sustituya el fragmento de VWF y no se una a FVIII. Por tanto, el enlace disulfuro entre la primera región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma y una segunda región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma previene la interacción entre VWF endógeno y la proteína FVIII. Esta inhibición de la interacción entre VWF y la proteína FVIII permite que la semivida de la proteína FVIII vaya más allá del límite de dos veces. La región bisagra o una porción de la misma se puede unir adicionalmente a uno o más dominios de CH1, CH2, CH3, un fragmento de los mismos, y cualquier combinación de los mismos. En un ejemplo particular, una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma comprende una región bisagra y región CH2 (por ejemplo, los aminoácidos 221-340 de una región Fc).

En ciertas realizaciones, la región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma está semi-glucosilada. Por ejemplo, la proteína quimérica que comprende dos regiones Fc o componentes de unión de FcRn puede contener una primera región Fc glucosilada (por ejemplo, una región CH2 glucosilada) o componente de unión de FcRn y una segunda región Fc aglucosilada (por ejemplo, una región CH2 aglucosilada) o componente de unión de FcRn. En una realización, un conector se puede interponer entre las regiones Fc glucosiladas y aglucosiladas. En otra realización, la región Fc o componente de unión de FcRn está completamente glucosilada, es decir, todas las regiones Fc están glucosiladas. En otras realizaciones, la región Fc puede estar aglucosilada, es decir, ninguno de los restos de Fc está glucosilado.

En ciertas realizaciones, una proteína quimérica de la invención comprende una sustitución de aminoácidos en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma (por ejemplo, variantes de Fc), que altera las funciones efectoras independientes de antígeno de la región constante de Ig, en particular la semivida en circulación de la proteína.

Dichas proteínas presentan o elevada o reducida unión de FcRn cuando se compara con proteínas que carecen de estas sustituciones y, por tanto, tienen una elevada o reducida semivida en suero, respectivamente. Se espera que las variantes de Fc con afinidad mejorada por FcRn tengan semividas en suero más largas, y dichas moléculas tienen aplicaciones útiles en métodos de tratamiento de mamíferos donde se desea una larga semivida del polipéptido administrado, por ejemplo, para tratar una enfermedad crónica o trastorno (véanse, por ejemplo, las patentes de US 7.348.004, 7.404.956 y 7.862.820). A diferencia, se espera que las variantes de Fc con afinidad de unión de FcRn reducida tengan semividas más cortas, y dichas moléculas también son útiles, por ejemplo, para administración a un mamífero donde puede ser ventajoso un tiempo de circulación acortado, por ejemplo para la obtención de imágenes de diagnóstico *in vivo* o en situaciones donde el polipéptido de partida tiene efectos secundarios tóxicos cuando está presente en la circulación durante periodos prolongados. También es menos probable que las variantes de Fc con afinidad de unión de FcRn reducida crucen la placenta y así también son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas. Además, otras aplicaciones en las que se puede desear la afinidad de unión de FcRn reducida incluyen las aplicaciones en las que se desea la localización del cerebro, riñón y/o hígado. En una realización a modo de ejemplo, la proteína quimérica de la invención presenta transporte reducido a través del epitelio de glomérulos renales de la vasculatura. En otra realización, la proteína quimérica de la invención presenta transporte reducido a través de la barrera hematoencefálica (BBB) del cerebro, en el espacio vascular. En una realización, una proteína con unión de FcRn alterada comprende al menos una región Fc o componente de unión de FcRn (por ejemplo, una o dos regiones Fc o componentes de unión de FcRn) que tiene una o más sustituciones de aminoácidos dentro del "bucle de unión de FcRn" de una región constante de Ig. El bucle de unión de FcRn comprende los restos de aminoácidos 280-299 (según la numeración EU) de una región Fc no mutante de longitud completa. En otras realizaciones, una región constante de Ig o una porción de la misma en una proteína quimérica de la invención que tiene afinidad de unión de FcRn alterada comprende al menos una región Fc o componente de unión de FcRn que tiene una o más sustituciones de aminoácidos dentro de la "zona de contacto" de FcRn de 15 Å. Como se usa en el presente documento, el término "zona de contacto" de FcRn de 15 Å incluye restos en las siguientes posiciones de un resto Fc no mutante de longitud completa: 243-261, 275-280, 282-293, 302-319, 336-348, 367, 369, 372-389, 391, 393, 408, 424, 425-440 (numeración EU). En otras realizaciones, una región constante de Ig o una porción de la misma de la invención que tiene afinidad de unión de

FcRn alterada comprende al menos una región Fc o componente de unión de FcRn que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en una posición de aminoácido correspondiente a una cualquiera de las siguientes posiciones de EU: 256, 277-281, 283-288, 303-309, 313, 338, 342, 376, 381, 384, 385, 387, 434 (por ejemplo, N434A o N434K) y 438. Las sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo que alteraron la actividad de unión de FcRn se desvelan en la publicación PCT internacional N° WO05/047327.

Una región Fc o componente de unión de FcRn usado en la invención también puede comprender una sustitución de aminoácidos reconocida en la técnica que altera la glucosilación de la proteína quimérica. Por ejemplo, la región Fc o componente de unión de FcRn de la proteína quimérica unido a un fragmento de VWF o una proteína FVIII puede comprender una región Fc que tiene una mutación que conduce a glucosilación reducida (por ejemplo, glucosilación unida en N u O) o puede comprender una glucoforma alterada del resto Fc no mutante (por ejemplo, un glucano bajo en fucosa o libre de fucosa).

En una realización, una proteína quimérica sin procesar de la invención puede comprender una región Fc genéticamente fusionada (es decir, región scFc) que tiene dos o más de su región constante de Ig constituyente o una porción de la misma independientemente seleccionada de la región constante de Ig o una porción de la misma descrita en el presente documento. En una realización, las regiones Fc de una región Fc dimérica son las mismas. En otra realización, al menos dos de las regiones Fc son diferentes. Por ejemplo, las regiones Fc o componentes de unión de FcRn de las proteínas de la invención comprenden el mismo número de restos de aminoácidos o se pueden diferenciar en longitud por uno o más restos de aminoácidos (por ejemplo, por aproximadamente 5 restos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 restos de aminoácidos), aproximadamente 10 restos, aproximadamente 15 restos, aproximadamente 20 restos, aproximadamente 30 restos, aproximadamente 40 restos, o aproximadamente 50 restos). Aún en otras realizaciones, las regiones Fc o componentes de unión de FcRn de la proteína de la invención se pueden diferenciar en la secuencia en una o más posiciones de aminoácidos. Por ejemplo, al menos dos de las regiones Fc o componentes de unión de FcRn se pueden diferenciar en aproximadamente 5 posiciones de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos), aproximadamente 10 posiciones, aproximadamente 15 posiciones, aproximadamente 20 posiciones, aproximadamente 30 posiciones, aproximadamente 40 posiciones, o aproximadamente 50 posiciones).

2) Albúmina o fragmento, o variante de la misma

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo unido al fragmento de VWF o unido a una proteína FVIII es albúmina o un fragmento funcional de la misma.

La albúmina de suero humano (HSA, o HA), una proteína de 609 aminoácidos en su forma de longitud completa, es responsable de una significativa proporción de la presión osmótica del suero y también funciona como vehículo de ligandos endógenos y exógenos. El término "albúmina", como se usa en el presente documento, incluye albúmina de longitud completa o un fragmento funcional, variante, derivado, o análogo de la misma.

En un caso, la proteína quimérica comprende el fragmento de VWF descrito en el presente documento y albúmina, fragmento, o variante de la misma, en donde el fragmento de VWF se une a albúmina o un fragmento o variante de la misma. En una realización, la proteína quimérica comprende el fragmento de VWF y una proteína FVIII, que están unidos entre sí, en donde el fragmento de VWF se une a albúmina o un fragmento o variante de la misma, la proteína que tiene VIII actividad se une a albúmina o un fragmento o variante de la misma, o ambos, el fragmento de VWF y la proteína que tiene VIII actividad se unen a albúmina o un fragmento o variante de la misma. En otras realizaciones, la proteína quimérica comprende el fragmento de VWF unido a albúmina, o un fragmento o variante de la misma se une además a un resto heterólogo seleccionado del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma (por ejemplo, una región Fc), una secuencia de PAS, HES y PEG. En otras realizaciones más, la proteína quimérica comprende el fragmento de VWF y una proteína FVIII, que se unen entre sí, en donde la proteína FVIII se une a albúmina o un fragmento o variante de la misma y se une además a un resto heterólogo seleccionado del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma (por ejemplo, una región Fc), una secuencia de PAS, HES y PEG. Aún en otras realizaciones, la proteína quimérica comprende el fragmento de VWF unido a albúmina o un fragmento o variante de la misma y una proteína FVIII unida a albúmina o un fragmento o variante de la misma, que se unen entre sí, en donde la actividad del fragmento de VWF se une además a un primer resto heterólogo seleccionado del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma (por ejemplo, una región Fc), una secuencia de PAS, HES y PEG y en donde la actividad de la proteína FVIII se une además a un segundo resto heterólogo seleccionado del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma (por ejemplo, una región Fc), una secuencia de PAS, HES y PEG.

En otras realizaciones, el resto heterólogo unido al fragmento de VWF o la proteína FVIII es albúmina o un fragmento o variante de la misma, que prolonga (o es capaz de prolongar) la semivida del fragmento de VWF o la proteína FVIII. Los ejemplos adicionales de albúmina o los fragmentos o variantes de la misma se desvelan en las publicaciones de patente de EE. UU. N° 2008/0194481A1, 2008/0004206 A1, 2008/0161243 A1, 2008/0261877 A1 o 2008/0153751 A1, o las publicaciones de solicitud PCT N° 2008/033413 A2, 2009/058322 A1 o 2007/021494 A2.

3) Resto de unión de albúmina

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo unido al fragmento de VWF o la proteína FVIII es un resto de unión a albúmina, que comprende un péptido de unión a albúmina, un dominio de unión a albúmina bacteriana, un fragmento de anticuerpo de unión a albúmina, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, la proteína de unión de albúmina puede ser una proteína de unión de albúmina bacteriana, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que incluye anticuerpos de dominio (véase la patente de EE. UU. Nº 6.696.245). Una proteína de unión de albúmina, por ejemplo, puede ser un dominio de unión de albúmina bacteriana, tal como la de la proteína G estafilocócica (Konig, T. y Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83). Otros ejemplos de péptidos de unión de albúmina que se pueden usar como componente de conjugación son, por ejemplo, los que tienen una secuencia consenso Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys, en donde Xaa₁ es Asp, Asn, Ser, Thr, o Trp; Xaa₂ es Asn, Gln, His, Ile, Leu o Lys; Xaa₃ es Ala, Asp, Phe, Trp o Tyr; y Xaa₄ es Asp, Gly, Leu, Phe, Ser o Thr como se describen en la solicitud de patente de EE. UU. 2003/0069395 o Dennis et al. (Dennis et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 35035-35043).

4) Secuencia de PAS

En otras realizaciones, el resto heterólogo unido al fragmento de VWF o a la proteína FVIII es una secuencia de PAS.

Una secuencia de PAS, como se usa en el presente documento, significa una secuencia de aminoácidos que comprende principalmente restos de alanina y serina, o que comprende principalmente restos de alanina, serina y prolina, formando la secuencia de aminoácidos la conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas. Por consiguiente, la secuencia de PAS es un elemento estructural, un polímero de aminoácido, o un casete de secuencia que comprende, consiste esencialmente en, o que consiste en alanina, serina y prolina que se pueden usar como parte del resto heterólogo en la proteína química. Aún, el experto conoce que un polímero de aminoácido también puede formar la conformación de espiral al azar cuando restos distintos de alanina, serina y prolina se añaden como constituyente minoritario en la secuencia de PAS. El término "constituyente minoritario", como se usa en el presente documento, significa que aminoácidos distintos de alanina, serina y prolina se pueden añadir a la secuencia de PAS hasta un cierto grado, por ejemplo, hasta aproximadamente 12 %, es decir, aproximadamente 12 de 100 aminoácidos de la secuencia de PAS, hasta aproximadamente 10 %, es decir, aproximadamente 10 de 100 aminoácidos de la secuencia de PAS, hasta aproximadamente 9 %, es decir, aproximadamente 9 de 100 aminoácidos, hasta aproximadamente 8 %, es decir, aproximadamente 8 de 100 aminoácidos, aproximadamente 6 %, es decir, aproximadamente 6 de 100 aminoácidos, aproximadamente 5 %, es decir, aproximadamente 5 de 100 aminoácidos, aproximadamente 4 %, es decir, aproximadamente 4 de 100 aminoácidos, aproximadamente 3 %, es decir, aproximadamente 3 de 100 aminoácidos, aproximadamente 2 %, es decir, aproximadamente 2 de 100 aminoácidos, aproximadamente 1 %, es decir, aproximadamente 1 de 100 de los aminoácidos. Los aminoácidos diferentes de alanina, serina y prolina se pueden seleccionar del grupo que consiste en Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr y Val.

En condiciones fisiológicas, la extensión de secuencia de PAS forma una conformación de espirales al azar y así puede mediar en una elevada estabilidad *in vivo* y/o *in vitro* para la actividad del factor VWF o de la proteína de coagulación. Puesto que el dominio de espiral al azar no adopta una estructura estable o función por sí mismo, se conserva esencialmente la actividad biológica mediada por el fragmento de VWF o la proteína FVIII con la que se fusiona. En otras realizaciones, las secuencias PAS que forman el dominio de espiral al azar son biológicamente inertes, especialmente con respecto a la proteólisis en plasma sanguíneo, inmunogenicidad, punto isoeléctrico/comportamiento electrostático, unión a receptores de la superficie celular, o internalización, pero son todavía biodegradables, que proporciona claras ventajas con respecto a los polímeros sintéticos tales como PEG.

Los ejemplos no limitantes de las secuencias PAS que forman la conformación de espiral al azar comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 8), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 9), APSSPSPAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO: 10), APSSPSPAPSSPSPASPS (SEQ ID NO: 11), SSAPSAPSSPSPASPSSPA (SEQ ID NO: 12), AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 13) y ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 14), o cualquier combinación de las mismas. Los ejemplos adicionales de secuencias PAS se conocen de, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. Nº 2010/0292130 A1 y la publicación de solicitud PCT Nº WO 2008/155134 A1.

5) Secuencia de HAP

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo unido al fragmento de VWF o la proteína FVIII es un homopolímero de aminoácidos rico en glicina (HAP). La secuencia de HAP puede comprender una secuencia repetitiva de glicina, que tiene al menos 50 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, 120 aminoácidos, 140 aminoácidos, 160 aminoácidos, 180 aminoácidos, 200 aminoácidos, 250 aminoácidos, 300 aminoácidos, 350 aminoácidos, 400 aminoácidos, 450 aminoácidos, o 500 aminoácidos de longitud. En una realización, la secuencia de HAP es capaz de prolongar la semivida de un resto fusionado con o unido a la secuencia de HAP. Los ejemplos no limitantes de la secuencia de HAP incluyen, pero no se limitan a, (Gly)_n, (Gly₄Ser)_n o S(Gly₄Ser)_n, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. En una realización, n es 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35,

36, 37, 38, 39 o 40. En otra realización, n es 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200. Véase, por ejemplo, Schlapschy M et al., *Protein Eng. Design Selection*, 20: 273-284 (2007).

6) Transferrina o fragmento de la misma

5 En ciertas realizaciones, el resto heterólogo unido al fragmento de VWF o la proteína FVIII es transferrina o un fragmento de la misma. Se puede usar cualquier transferrina para preparar las proteínas quiméricas de la invención. Como un ejemplo, la Tf humana no mutante (Tf) es una proteína de 679 aminoácidos, de aproximadamente 75 kDa (que no supone glucosilación), con dos dominios principales, N (aproximadamente 330 aminoácidos) y C (aproximadamente 340 aminoácidos), que parece que se originan a partir de una duplicación génica. Véanse los números de acceso de GenBank NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM039847 y S95936 (www.ncbi.nlm.nih.gov/). La transferrina comprende dos dominios, dominio N y dominio C. El dominio N comprende dos subdominios, dominio N1 y dominio N2, y el dominio C comprende dos subdominios, dominio C1 y dominio C2.

15 En una realización, la porción de transferrina de la proteína quimérica incluye una variante de corte y empalme de transferrina. En un ejemplo, una variante de corte y empalme de transferrina puede ser una variante de corte y empalme de transferrina humana, por ejemplo, acceso de Genbank AAA61140. En otra realización, la porción de transferrina de la proteína quimérica incluye uno o más dominios de la secuencia de transferrina, por ejemplo, dominio N, dominio C, dominio N1, dominio N2, dominio C1, dominio C2, o cualquier combinación de los mismos.

7) Polímero, por ejemplo, polietilenglicol (PEG)

20 En otras realizaciones, el resto heterólogo unido al fragmento de VWF o FVIII es un polímero soluble conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano o poli(alcohol vinílico). El resto heterólogo, tal como polímero soluble, se puede unir a cualquier posición dentro del fragmento de VWF o la proteína FVIII o el extremo N o C.

25 En otra realización, la proteína quimérica comprende el fragmento de VWF y una proteína FVIII, que se unen entre sí, en donde el fragmento de VWF se une a PEG, la proteína FVIII se une a PEG, o ambos, el fragmento de VWF y la proteína FVIII se unen a PEG. En otras realizaciones, la proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF unido a PEG se une además a un resto heterólogo seleccionado del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma (por ejemplo, una región Fc), una secuencia de PAS, HES y albúmina, fragmento, o variante de los mismos. En otras realizaciones más, la proteína quimérica comprende el fragmento de VWF y una proteína FVIII, que se unen entre sí, en donde la proteína FVIII se une además a un resto heterólogo seleccionado del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma (por ejemplo, una región Fc), una secuencia de PAS, HES, y albúmina, fragmento, o variante de los mismos. Aún en otras realizaciones, la proteína quimérica comprende el fragmento de VWF unido a PEG y una proteína FVIII unida a PEG, que se unen entre sí, en donde la actividad del fragmento de VWF se une además a un primer resto heterólogo seleccionado del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma (por ejemplo, una región Fc), una secuencia de PAS, HES y albúmina, fragmento, o variante de los mismos, y en donde la actividad de la proteína FVIII se une además a un segundo resto heterólogo seleccionado del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma (por ejemplo, una región Fc), una secuencia de PAS, HES, y albúmina, fragmento, o variante de los mismos.

40 También se proporcionan por la invención derivados químicamente modificados de la proteína quimérica de la invención que pueden proporcionar ventajas adicionales tales como elevada solubilidad, estabilidad y tiempo de circulación del polipéptido, o disminuida inmunogenicidad (véase la patente de EE. UU. N° 4.179.337). Los restos químicos para modificación se pueden seleccionar del grupo que consiste en polímeros solubles en agua que incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano y poli(alcohol vinílico). La proteína quimérica se puede modificar en posiciones al azar dentro de la molécula o en el extremo N o C, o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula, y puede incluir uno, dos, tres o más restos químicos unidos.

50 El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o sin ramificar. Para polietilenglicol, en una realización, el peso molecular está entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa para mayor facilidad en la manipulación y fabricación. Se pueden usar otros tamaños, dependiendo del perfil deseado (por ejemplo, la duración de la liberación sostenida deseada, los efectos, si lo hay, sobre la actividad biológica, la facilidad en la manipulación, el grado o ausencia de antigenicidad, y otros efectos conocidos del polietilenglicol con respecto a una proteína o análogo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede tener un peso molecular medio de aproximadamente 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10.000, 10.500, 11.000, 11.500, 12.000, 12.500, 13.000, 13.500, 14.000, 14.500, 15.000, 15.500, 16.000, 16.500, 17.000, 17.500, 18.000, 18.500, 19.000, 19.500, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, 70.000, 75.000, 80.000, 85.000, 90.000, 95.000, o 100.000 kDa.

55 En algunas realizaciones, el polietilenglicol puede tener una estructura ramificada. Los polietilenglicoles ramificados se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N° 5.643.575; Morpurgo et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*

56:59-72 (1996); Vorobjev et al., Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750 (1999); y Caliceti et al., Bioconjug. Chem. 10:638-646 (1999).

También puede variar el número de restos de polietilenglicol unidos a cada proteína quimérica, el fragmento de VWF, o la proteína FVIII de la invención (es decir, el grado de sustitución). Por ejemplo, las proteínas pegiladas de la invención se pueden unir, en promedio, a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, o más moléculas de polietilenglicol. Similarmente, el grado de sustitución promedio dentro de intervalos tales como 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19 o 18-20 restos de polietilenglicol por molécula de proteína. Los métodos de determinación del grado de sustitución se tratan, por ejemplo, en Delgado et al., Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9:249-304 (1992).

10 En algunas realizaciones, la proteína FVIII puede estar PEGilada. Factor VIII PEGilado se puede referir a un conjugado formado entre el factor VIII y al menos una molécula de polietilenglicol (PEG).

15 En otras realizaciones, una proteína FVIII usada en la invención se conjuga con uno o más polímeros. El polímero puede ser soluble en agua y unirse covalentemente o no covalentemente al factor VIII u otros restos conjugados con factor VIII. Los ejemplos no limitantes de polímero pueden ser poli(óxido de alquileo), poli(vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), polioxazolona, o poli(acrilolmorfolina). Los tipos adicionales de FVIII conjugado con polímero se desvelan en la patente de EE. UU. N° 7.199.223.

8) Hidroxietilalmidón (HES)

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo unido al fragmento de VWF o la proteína FVIII es un polímero, por ejemplo, hidroxietilalmidón (HES) o un derivado del mismo.

20 El hidroxietilalmidón (HES) es un derivado de amilopectina que existe de forma natural y se degrada por alfa-amilasa en el cuerpo. El HES es un derivado sustituido del polímero de hidrato de carbono amilopectina, que está presente en almidón de maíz a una concentración de hasta 95 % en peso. HES presenta propiedades biológicas ventajosas y se usa como un agente de sustitución de volumen de sangre y en terapia de hemodilución en la clínica (Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278 (1987); y Weidler et al., Arzneimittel-Forschung/Drug Res., 41, 494-498 (1991)).

30 La amilopectina contiene restos de glucosa, en donde en la cadena principal están presentes enlaces alfa-1,4-glucosídicos y en los sitios de ramificación se encuentran enlaces alfa-1,6-glucosídicos. Las propiedades fisicoquímicas de esta molécula se determinan principalmente por el tipo de enlaces glucosídicos. Debido al enlace alfa-1,4-glucosídico mellado, se producen estructuras helicoidales con aproximadamente seis monómeros de glucosa por giro. Las propiedades fisicoquímicas, así como las propiedades bioquímicas, del polímero se pueden modificar mediante sustitución. Se puede lograr la introducción de un grupo hidroxietilo mediante hidroxietilación alcalina. Adaptando las condiciones de reacción es posible explotar la diferente reactividad del grupo hidroxil respectivo en el monómero de glucosa sin sustituir con respecto a una hidroxietilación. Debido a este hecho, el experto es capaz de influir en el patrón de sustitución de forma limitada.

35 HES se caracteriza principalmente por la distribución de pesos moleculares y el grado de sustitución. El grado de sustitución, indicado como DS, se refiere a la sustitución molar, es conocido por el experto. Véase Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278 (1987), como se ha citado anteriormente, en particular p. 273.

40 En una realización, el hidroxietilalmidón tiene un peso molecular medio (peso medio) de desde 1 hasta 300 kD, desde 2 hasta 200kD, desde 3 hasta 100 kD, o desde 4 hasta 70 kD. El hidroxietilalmidón puede presentar además una grado molar de sustitución de desde 0,1 hasta 3, preferentemente 0,1 a 2, más preferido 0,1 a 0,9, preferentemente 0,1 a 0,8, y una relación entre la sustitución C2:C6 en el intervalo de desde 2 hasta 20 con respecto a los grupos hidroxietilo. Un ejemplo no limitante de HES que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 130 kD es un HES con un grado de sustitución de 0,2 a 0,8 tal como 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8, preferentemente de 0,4 a 0,7 tal como 0,4, 0,5, 0,6 o 0,7. En una realización específica, HES con un peso molecular medio de aproximadamente 130 kD es VOLUVEN® de Fresenius. VOLUVEN® es un coloide artificial empleado, por ejemplo, para la sustitución de volumen usada en la indicación terapéutica para la terapia y profilaxis de hipovolemia. Las características de VOLUVEN® son un peso molecular medio de 130.000+/-20.000 D, una sustitución molar de 0,4 y una relación C2:C6 de aproximadamente 9:1. En otras realizaciones, los intervalos del peso molecular medio de hidroxietilalmidón son, por ejemplo, 4 a 70 kD o 10 a 70 kD o 12 a 70 kD o 18 a 70 kD o 50 a 70 kD o 4 a 50 kD o 10 a 50 kD o 12 a 50 kD o 18 a 50 kD o 4 a 18 kD o 10 a 18 kD o 12 a 18 kD o 4 a 12 kD o 10 a 12 kD o 4 a 10 kD. En otras realizaciones más, el peso molecular medio de hidroxietilalmidón empleado está en el intervalo de desde superior a 4 kD e inferior a 70 kD, tal como aproximadamente 10 kD, o en el intervalo de desde 9 hasta 10 kD o desde 10 hasta 11 kD o desde 9 hasta 11 kD, o aproximadamente 12 kD, o en el intervalo de desde 11 hasta 12 kD, o desde 12 hasta 13 kD o desde 11 hasta 13 kD, o aproximadamente 18 kD, o en el intervalo de desde 17 hasta 18 kD o desde 18 hasta 19 kD o desde 17 hasta 19 kD, o aproximadamente 30 kD, o en el intervalo de desde 29 hasta 30, o desde 30 hasta 31 kD, o aproximadamente 50 kD, o en el intervalo de desde 49 hasta 50 kD o desde 50 hasta 51 kD o desde 49 hasta 51 kD.

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo puede ser mezclas de hidroxietilalmidones que tienen diferentes pesos moleculares medios y/o diferentes grados de sustitución y/o diferentes relaciones de sustitución C2:C6. Por tanto, se pueden emplear mezclas de hidroxietilalmidones que tienen diferentes pesos moleculares medios y diferentes grados de sustitución y diferentes relaciones de sustitución C2:C6, o que tienen diferentes pesos moleculares medios y diferentes grados de sustitución y la misma relación de sustitución C2:C6 o aproximadamente la misma, o que tienen diferentes pesos moleculares medios y el mismo grado de sustitución o aproximadamente el mismo y diferentes relaciones de sustitución C2:C6, o que tienen el mismo peso molecular medio o aproximadamente el mismo y diferentes grados de sustitución y diferentes relaciones de sustitución C2:C6, o que tienen diferentes pesos moleculares medios y el mismo grado de sustitución o aproximadamente el mismo y la misma relación de sustitución C2:C6 o aproximadamente la misma, o que tienen los mismos pesos moleculares medios o aproximadamente los mismos y diferentes grados de sustitución y la misma relación de sustitución C2:C6 o aproximadamente la misma, o que tiene el mismo peso molecular medio o aproximadamente el mismo y el mismo grado de sustitución o aproximadamente el mismo y diferentes relaciones de sustitución C2:C6, o que tienen aproximadamente el mismo peso molecular medio y aproximadamente el mismo grado de sustitución y aproximadamente la misma relación de sustitución C2:C6.

9) Ácidos polisiálicos (PSA)

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo no de polipéptido unido al fragmento de VWF o la proteína FVIII es un polímero, por ejemplo, ácidos polisiálicos (PSAs) o un derivado de los mismos. Los ácidos polisiálicos (PSAs) son polímeros sin ramificar que existen de forma natural de ácido siálico producidos por ciertas cepas bacterianas y en mamíferos en ciertas células. Roth J., et al. (1993) en *Polysialic Acid: From Microbes to Man*, eds Roth J., Rutishauser U., Troy F. A. (Birkhäuser Verlag, Basilea, Suiza), pp 335-348. Se pueden producir en diversos grados de polimerización a partir de n=aproximadamente 80 o más restos de ácido siálico hasta n=2 por hidrólisis ácida limitada o por digestión con neuraminidasas, o por fraccionamiento de las formas naturales bacterianamente derivadas del polímero. La composición de diferentes ácidos polisiálicos también varía de forma que existan formas homopoliméricas, es decir, el ácido polisiálico unido en alfa-2,8 que comprende el polisacárido capsular de la cepa K1 de *E. coli* y los meningococos del grupo B, que también se encuentran en la forma embrionaria de la molécula de adhesión a células neuronales (N-CAM). También existen formas heteropoliméricas, tales como el ácido polisiálico alternante alfa-2,8 alfa-2,9 de la cepa K92 de *E. coli* y los polisacáridos del grupo C de *N. meningitidis*. El ácido siálico también se puede encontrar en copolímeros alternantes con monómeros distintos de ácido siálico tales como el grupo W135 o grupo Y de *N. meningitidis*. Los ácidos polisiálicos tienen importantes funciones biológicas que incluyen la evasión de los sistemas inmunitarios y del complemento por bacterias patógenas y la regulación de la adhesividad de la glía de neuronas inmaduras durante el desarrollo fetal (en donde el polímero tiene una función antiadhesiva) Cho y Troy, P.N.A.S., USA, 91 (1994) 11427-11431, aunque no existen receptores conocidos para ácidos polisiálicos en mamíferos. El ácido polisiálico unido en alfa-2,8 de la cepa K1 de *E. coli* también se conoce como 'ácido colomínico' y se usa (en diversas longitudes) para ejemplificar la presente invención. Se han descrito diversos métodos de unión o conjugación de ácidos polisiálicos a un polipéptido (por ejemplo, véase la patente de EE. UU. Nº 5.846.951; documentos de patente WO-A-0187922 y US 2007/0191597 A1.

C) Proteína FVIII

"Una proteína FVIII", como se usa en el presente documento, significa un polipéptido FVIII funcional en su función normal en la coagulación, a menos que se especifique de otro modo. El término una proteína FVIII incluye un fragmento funcional, variante, análogo, o derivado del mismo que retiene la función del factor VIII no mutante de longitud completa en la vía de coagulación. "Una proteína FVIII" se usa indistintamente con polipéptido FVIII (o proteína) o FVIII. Los ejemplos de funciones de FVIII incluyen, pero no se limitan a, una capacidad para activar la coagulación, una capacidad para actuar de cofactor para factor IX, o una capacidad para formar un complejo de tenasa con factor IX en presencia de Ca²⁺ y fosfolípidos, que luego convierten el factor X en la forma activada Xa. La proteína FVIII puede ser la proteína FVIII humana, porcina, canina, de rata o murina. Además, comparaciones entre FVIII de seres humanos y otras especies han identificado restos conservados que es probable que se requieran para la función (Cameron et al., *Thromb. Haemost.* 79:317-22 (1998); documento de patente US 6.251.632).

Están disponibles varias pruebas para evaluar la función del sistema de coagulación: prueba del tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT), ensayo cromogénico, ensayo ROTEM, prueba de tiempo de tromboplastina (PT) (también usado para determinar INR), prueba de fibrinógeno (frecuentemente por el método de Clauss), número de plaquetas, prueba de la función plaquetaria (frecuentemente por PFA-100), TCT, tiempo de sangrado, prueba de mezcla (si se corrige una anomalía si se mezcla el plasma del paciente con plasma normal), ensayos del factor de coagulación, anticuerpos anti-fosfolípido, D-dímero, pruebas genéticas (por ejemplo, factor V Leiden, mutación de protrombina G20210A), tiempo de veneno de la víbora de Russell diluido (dRVVT), diversas pruebas de la función plaquetaria, tromboelastografía (TEG o Sonoclot), tromboelastometría (TEM®, por ejemplo, ROTEM®), o tiempo de lisis de euglobulina (ELT).

La prueba de aPTT es un indicador de rendimiento que mide la eficacia de tanto las vías de coagulación "intrínsecas" (también denominadas la vía de activación por contacto) como las comunes. Esta prueba se usa comúnmente para medir la actividad de coagulación de factores de coagulación recombinantes comercialmente

disponibles, por ejemplo, FVIII o FIX. Se usa conjuntamente con el tiempo de protrombina (PT), que mide la vía extrínseca.

5 El análisis ROTEM proporciona información sobre la cinética completa de la hemostasia: tiempo de coagulación, formación de coágulos, estabilidad y lisis de coágulos. Los diferentes parámetros en la tromboelastometría dependen de la actividad del sistema de coagulación plasmático, función plaquetaria, fibrinólisis, o muchos factores que influyen en estas interacciones. Este ensayo puede proporcionar un punto de vista completo de la hemostasia secundaria.

10 Se conocen el polipéptido FVIII y las secuencias de polinucleótidos, ya que son muchos fragmentos funcionales, mutantes y versiones modificadas. Los ejemplos de las secuencias de FVIII humano (longitud completa) se muestran como subsecuencias en SEQ ID NO: 16 o 18.

Tabla 2. FVIII de longitud completa (péptido señal de FVIII subrayado; la cadena pesada de FVIII está doblemente subrayada; el dominio B está en cursiva; y la cadena ligera de FVIII está en texto sin formato)

Péptido señal: (SEQ ID NO: 15)

MQIELSTCFFLCLLRFCFS

Factor VIII maduro (SEQ ID NO: 16)*

ATREXYLGAVELSWDYMOSDLGELFVDARFPPRPVPSKSPFPNTSVVYKKTLFVEFTDHLFENIAKPRFPWGLL
GPTIQAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDOTSQPEKEDDKVFPGGSHTYVVOVLKEN
GPMASDPECLTYSYLSHVDELVKDINSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTZHKFILLFAVDFEGKSWHSETKNSL
MQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKRSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEI
SPITFLTAQTLLMDLQGFILLECHISSHCHDGMAYVKVDSCEPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF
DDNSPSFIIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSOYLINNGPQRIQRKYKVRMAYT
DETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTHLLIFKNQASRPYNIYEHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFEIL
PGEIFKWKTVTVEDGPTKSDFRCLTRYISSFVNMERDLASGLIGPLLIQYKESVDQGRGNOIMSDKRNVIILF
SVFDENRSWYLTENIQRFLEPNPAGVQLEDPEFOASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDF
LSVFFSGYTFKHKMYYEDTLLTFEFSGETVFMNENPGLWILGCHNSDFRNRCMTALLKVSSCDKNTGDYYE
DSYEDISAYLLSKNNATEPRCFSQNSRHFSTRQKQFMATTIPENDIEXTDPWFARHTPMPKIQVSSDLEML
LLRQSETPHGLSLSLQSAKRYETESDDPSFGAIDSNNSLSEMTHERFQLHNSGDMVFTPEGLQLALNEXLG
TTAATELKKLDFKVSSTSNLITSTIPSDNLAAGTDNITSLSLGPSPMEVHYDSQLDITLFGKSSPLTESGGPL
GLSEENNDKSLLESGLMNSQESSWGKNVSTESGRLPKGRANGFALLTKDNALFKVSI SLLATNKTSSNNSA
TNRKTHIDGFSLLIENCFVWQNILSDETFKVKVTEPLIDRMIMDKNATALLNHNMCNKTSSKNMNMVQOK
KEGPIPPDAQNDFMSFFKMLELPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSKQLVSLGPEKSVCCQNFLSHYKVVV
GRGFTKDVGLEHMFVFPSSRNLFLENLNLDNLHENNTNQEKKIQEELKKEETLIQENVVLPQLHTVPCTRNFH
KNLELLSTRQNVESGYDGAAYAPVLQDFRSLNDSFNPTKKTAAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVERYACTTR
ESPNTSQQNEFVTQRSKRALKQFRLEETELEKRIIVDDTSFQWCKNMKHLTPSTLTFQIDYNEKERGATQS
PLSDCLERSHSIPQANFSLPLFAKVSFFPSIRPIYLERVLPQDNQSHLPAASFRKKDQSGVQESSHFLOGAKK
NNLSLAIITLLEMTGQREVGSLGTSATNSVTYKRVENIVLPRPDLFKITSGKVLELPRVHIYQKDLFPTETS
GSFGHLLDVESSLLQGTGATKWNENRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDFLAWDNHYGTQIPKSEWKSQE
KSPKTAFAKKTDTLLSLHACHSNHATAAINECCNKPEIEVYTNKQGPTEFLCSQNPVYKRRHQREITRITTLQ
SDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVP
QFKKVVVFQEFDTGFSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSIYEEDQRQGA
EPKKNFVKPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVT
VQEFALFFTIIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPLGLVMAQDQIRWYL
LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV
YSNKCQTPGLMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEFFSWIKVDLLAPMIHGIKTQG
ARQKFSLSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPHTYSIS
TLRMEMLGCDLNSCSMPLGMEKAI SDAQITASSYFTNMFAITWSPSKARLHLQGRSNARWPQVNNPKEWLQV
DFQKTMKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTFVVNSLDPELLTR
YLRHQPQSVWHQIALRMEVLGCEAQDLY

ES 2 753 124 T3

Tabla 3. Secuencia de nucleótidos que codifica FVIII de longitud completa (SEQ ID NO: 17)*

661					<u>ATG CAAATAGAGC TCTCCACCTG</u>	
721	<u>CTTCTTTCTG</u>	<u>TGCCTTTTGC</u>	<u>GATTCTGCTT</u>	<u>TAGTGCCACC</u>	<u>AGAAGATACT</u>	<u>ACCTGGGTGC</u>
781	AGTGGAAGCTG	TCATGGGACT	ATATGCAAAG	TGATCTCGGT	GAGCTGCCTG	TGGACGCAAG
841	ATTTCCCTCCT	AGAGTGCCAA	AATCTTTTCC	ATTCAACACC	TCAGTCGTGT	ACAAAAAGAC
901	TCTGTTTGTA	GAATTCACGG	ATCACCTTTT	CAACATCGCT	AAGCCAAGGC	CACCCTGGAT
961	GGGTCTGCTA	GGCCTACCA	TCCAGGCTGA	GGTTTATGAT	ACAGTGGTCA	TTACACTTAA
1021	GAACATGGCT	TCCCATCCTG	TCAGTCTTCA	TGCTGTTGGT	GTATCCTACT	GGAAAGCTTC
1081	TGAGGGAGCT	GAATATGATG	ATCAGACCAG	TCAAAGGGAG	AAAGAAGATG	ATAAAGTCTT
1141	CCCTGGTGGA	AGCCATACAT	ATGTCTGGCA	GGTCCTGAAA	GAGAATGGTC	CAATGGCCTC
1201	TGACCCACTG	TGCCTTACCT	ACTCATATCT	TTCTCATGTG	GACCTGGTAA	AAGACTTGAA
1261	TTCAGGCCTC	ATTGGAGCCC	TACTAGTATG	TAGAGAAGGG	AGTCTGGCCA	AGGAAAAGAC
1321	ACAGACCTTG	CACAAATTTA	TACTACTTTT	TGCTGTATTT	GATGAAGGGA	AAAGTTGGCA
1381	CTCAGAAACA	AAGAACTCCT	TGATGCAGGA	TAGGGATGCT	GCATCTGCTC	GGGCCTGGCC
1441	TAAAATGCAC	ACAGTCAATG	GTTATGTAAA	CAGGTCTCTG	CCAGGTCTGA	TTGGATGCCA

ES 2 753 124 T3

1501 CAGGAAATCA GTCTATTGGC ATGTGATTGG AATGGGCACC ACTCCTGAAG TGCCTCAAT
 1561 ATTCCCTCGAA GGTACACACAT TTCTTGTGAG GAACCATCGC CAGGCGTCCCT TGGAAATCTC
 1621 GCCAATAACT TTCCTTACTG CTCAAAACACT CTTGATGGAC CTTGGACAGT TTCTACTGTT
 1681 TTGTCATATC TCTTCCCACC AACATGATGG CATGGAAGCT TATGTCAAAG TAGACAGCTG
 1741 TCCAGAGGAA CCCCAACTAC GAATGAAAAA TAATGAAGAA GCGGAAGACT ATGATGATGA
 1801 TCTTACTGAT TCTGAAATGG ATGTGGTCAG GTTTGATGAT GACAACCTCTC CTTCTTTTAT
 1861 CCAAATTCGC TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAAACCTGG GTACATTACA TTGCTGCTGA
 1921 AGAGGAGGAC TGGGACTATG CTCCTTATG CCTCGCCCC GATGACAGAA GTTATAAAAG
 1981 TCAATATTTG AACAAATGGCC CTCAGCCGAT TGGTAGGAAG TACAAAAAAG TCCGATTTAT
 2041 GGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTATT CAGCATGAAT CAGGAATCTT
 2101 GGGACCTTTA CTTTATGGGG AAGTTGGAGA CACACTGTTG ATTATATTTA AGAATCAAGC
 2161 AAGCAGACCA TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT GTCCGTCCCT TGTATCAAG
 2221 GAGATTACCA AAAGGTGTAA AACATTTGAA GGATTTTCCA ATTCTGCCAG GAGAAATATT
 2281 CAAATATAAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT AAATCAGATC CTCGGTGCCT
 2341 GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATPAT GGAGAGAGAT CTAGCTTACG GACTCATTGG
 2401 CCCTCTCCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGA GGAAACCAGA TAATGTCAGA
 2461 CAAGAGGAAT GTCATCCTGT TTTCTGTATT TGATGAGAAC CGAAGCTGGT ACCTCACAGA
 2521 GAATATACAA CGCTTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCAG CTTGAGGATC CAGAGTTCCA
 2581 AGCCTCCAAC ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTT GATAGTTTGC AGTTGTCAGT
 2641 TTGTTTGCAT GAGGTGGCAT ACTGGTACAT TCTAAGCATT GGAGCACAGA CTGACTTCCCT
 2701 TTCTGTCTTC TTCTCTGGAT ATACCTTCAA ACACAAAATG GTCTATGAAG ACACACTCAC
 2761 CCTATTCCCA TTCTCAGGAG AAAGTGTCTT CATGTGATG GAAAACCCAG GTCTATGGAT
 2821 TCTGGGGTGC CACAACTCAG ACTTTTCGAA CAGAGGCATG ACCGCTTAC TGAAGGTTTC
 2881 TAGTTGTGAC AAGAACACTG GTGATTATTA CGAGGACAGT TATGAAGATA TTTCAGCATA
 2941 CTTGCTGAGT AAAAAACAATG CCATTGAACC AAGAAGCTTC TCCAGAAAT CAAGACACCC
 3001 TAGCACTAGG CAAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTCCA GAAAATGACA TAGAGAAGAC
 3061 TGACCCTTGG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAATA CAAAATGTCT CCTCTAGTGA
 3121 TTTGTTGATG CTCTTGCAC AGAGTCCFAC TCCACATGGG CTATCCTPAT CTGATCTCCA
 3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT GGAGCAATAG ACAGTAATAA
 3241 CAGCCTGTCT GAAATGACAC ACTTCAGGCC ACAGTCCAT CACAGTGGGG ACATGGTATT
 3301 TACCCCTGAG TCAGGCCCTCC AATTAAGATT AAATGAGAAA CTGGGGACAA CTGCAGCAAC
 3361 AGAGTTGAAG AAAGTTGATT TCAAAGTTTC TAGTACATCA AATAATCTGA TTTCAACAAT
 3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTACTGA TAATACAAGT TCCTTAGAC CCCCAAGTAT
 3481 GCCAGTTTAT TATGATAGTC AATTAGATAC CACTCTATTT GGCAAAAAGT CATCTCCCCT
 3541 TACTGAGTCT GGTGGACCTC TGAGTTAG TGAGAAAT AATGATTCAA AGTTGTTAGA
 3601 ATCAGGTTTA ATGAATAGCC AAGAAAGTTC ATGGGGAAAA AATGTATCGT CAACAGAGAG
 3661 TGGTAGGTTA TTTAAAGGGA AAAGAGCTCA TGGACCTGCT TTGTTGACTA AAGATAATGC
 3721 CTTATTCAAA GTTAGCATCT CTTTGTAAA GACAACAAA ACTTCCAATA ATTCAGCAAC
 3781 TAATAGAAAAG ACTCACATTG ATGGCCCATC ATTATTAATT GAGAATAGTC CATCAGTCTG
 3841 GCAAAATATA TTAGAAAGTG ACACAGATT TAAAAAGTG ACACCTTGA TTCATGACAG
 3901 AATGCTTATG GACAAAAATG CTACAGCTTT GAGGCTAAAT CATATGTCAA ATAAACTAC
 3961 TTCATCAAAA AACATGGAAA TGGTCCAACA GAAAAAAGAG GGCCCCATTC CACCAGATGC
 4021 ACAAATCCA GATATGTCGT TCTTTAAGAT GCTATTCTTG CCAGAATCAG CAAGGTGGAT
 4081 ACAAAGGACT CATGGAAAGA ACTCTCTGAA CTCTGGGCAA GGCCCCAGTC CAAAGCAATT
 4141 AGTATCCTTA GGACCAGAAA AATCTGTGGA AGGTCAGAAT TTCTTGTCTG AGAAAAACAA
 4201 AGTGGTAGTA GGAAAGGGTG AATTTACAAA GGACGTAGGA CTCAAAGAGA TGSTTTTCC
 4261 AAGCAGCAGA AACCTATTTT TFACTAAGTT GGATAATTTA CATGAAAATA ATACACAAA
 4321 TCAAGAAAAA AAAATTCAGG AAGAAATAGA AAAGAAGGAA ACATTAATCC AAGAGAATGT
 4381 AGTTTTGCCT CAGATACATA CAGTACTGG CACTAAGAAT TTCATGAAGA ACSTTTTCTT
 4441 ACTGAGCACT AGGCCAAAATG TAGAAGTTTC ATATGACGGG GCATATGCTC CAGTACTTCA
 4501 AGATTTTAGG TCATTAAATG ATTTCAACAAA TAGAACAAAAG AAACACACAG CTCATTTCTC
 4561 AAAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGGAAAG CTTGGGAAAT CAAACCAAGC AAATTGTAGA
 4621 GAAATATGCA TGCACCACAA GGATATCTCC TAATACAAGC CAGCAGAAAT TTGTCACGCA
 4681 ACGTAGTAAG AGAGCTTTGA AACAATTCAG ACTCCCACTA GAAGAAACAG AACTTGAAAA
 4741 AAGGATAATT GTGGATGACA CCTCAACCCA GTGGTCCAAA AACATGAAAC ATTTGACCCC
 4801 GAGCACCCCTC ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA GGGGCCATTA CTCAGTCTCC
 4861 CTTATCAGAT TGCCTTACGA GGAGTCATAG CATCCCTCAA GCAAATAGAT CTCCATTACC
 4921 CATTGCAAAG GTATCATCAT TTCCATCTAT TAGACCTATA TATCTGACCA GGGTCTTATT
 4981 CCAAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA AAGAAAGATT CTGGGGTCCA

ES 2 753 124 T3

5041 AGAAAGCAGT CATTTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAAC CTTTCTTTAG CCATTCTAAC
5101 CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGAGAGGT TGGCTCCCTG GGGACAAGTG CCACAAATTC
5161 AGTCACATAC AAGAAAGTTG AGAACACTGT TCTCCCGAAA CCAGACTTGC CCAAAACATC
5221 TGGCAAAGTT GAATTGCTTC CAAAAGTTCA CATTATCAG AAGGACCTAT TCCCTACGGA
5281 AACTAGCAAT GGGTCTCCTG GCCATCTGGA TCTCGTGGAA GGGAGCCTTC TTCAGGGAAC
5341 AGAGGGAGCG ATTAAGTGGG ATGAAGCAAA CAGACCTGGA AAAGTTCCTT TTCTGAGAGT
5401 AGCAACAGAA AGCTCTGCAA AGACTCCCTC CAAGCTATTG GATCCTCTTG CTTGGGATAA
5461 CCACTATGGT ACTCAGATAC CAAAAGAAGA GTGGAAATCC CAAGAGAAGT CACCAGAAAA
5521 AACAGCTTTT AAGAAAAAGG ATACCATTTT GTCCCTGAAC GCTTGTGAAA GCAATCATGC
5581 AATAGCAGCA ATAAATGAGG GACAAAATAA GCCCGAAATA GAAGTCACCT GGGCAAAGCA
5641 AGGTAGGACT GAAAGGCTGT GCTCTCAAAA CCCACCAGTC TTGAAACGCC ATCAACGGGA
5701 AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAATT GACTATGATG ATACCATATC
5761 AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT TTATGATGAG GATGAAAATC AGAGCCCCCG
5821 CAGCTTTCAA AAGAAAACAC GACACTATTT TATTGCTGCA GTGGAGAGGC TCTGGGATTA
5881 TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG AACAGGGCT CAGAGTGGCA GTGTCCCTCA
5941 GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC TGATGGCTCC TTTACTCAGC CCTTATACCG
6001 TGGAGAATAA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT ATAAGAGCAG AAGTTGAAGA
6061 TAATATCATG GTAACTTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC TATTCCTTCT ATTCTAGCCT
6121 TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAAATC TTGTCAAGCC
6181 TAATGAAACC AAACTTACT TTTGGAAAAGT GCAACATCAT ATGGCACCCA CTAAGATGA
6241 GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC CTGGAAAAAG ATGTGCACTC
6301 AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCCCTG CTCATGGGAG
6361 ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTCCACCATC TTTGATGAGA CCAAAAGCTG
6421 GTECTTCACT GAAAATATGG AAAGAACTG CAGGGCTCCC TGCAATATCC AGATGGAAGA
6481 TCCCCTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA TGGATACACT
6541 ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTCGATGG TATCTGTCA GCATGGGCAG
6601 CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCCAG TGGACATGTG TTCACTGTAC GAAAAAAGA
6661 GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG TGGAAATGTT
6721 ACCATCCAAA GCTGGAATTT GCGGGGTGGA ATGCCTTATT GCGGAGCATC TACATGCTGG
6781 GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTGAG ACTCCCCCTGG GAATGGCTTC
6841 TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT GGGCCCCAAA
6901 GCTGGCCAGA CTTCATTATT CCGGATCCAT CAATGCTGG AGCACCAAGG AGGCCCTTTTC
6961 TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT GATTATTAC GGCATCAAGA CCCAGGGTGC
7021 CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA GTCTTGATGG
7081 GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT TCTTTGGCAA
7141 TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAAACCCT CCAATTATG CTCGATACAT
7201 CCGTTTTGCAC CCAACCTATT ATAGCATTG CAGCACTCTT CGCATGGAGT TGATGGGCTG
7261 TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTTGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT CAGATGCACA
7321 GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG
7381 ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC CAAAAGAGTG
7441 GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACTACTC AGGGAGTAAA
7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC AAGATGGCCA
7561 TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA ATCAAGACTC
7621 CTTCACACCT GTGGTGAAGT CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC TTCGAATTCA
7681 CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
7741 GGACCTCTAC

* Los ácidos nucleicos subrayados codifican un péptido señal.

5 Los polipéptidos FVIII incluyen FVIII de longitud completa, FVIII de longitud completa menos Met en el extremo N, FVIII maduro (menos la secuencia señal), FVIII maduro con una Met adicional en el extremo N, y/o FVIII con una delección total o completa del dominio B. En ciertas realizaciones, las variantes de FVIII incluyen delecciones del dominio B, tanto delecciones parciales como completas.

10 Se aisló el gen FVIII humano y se expresó en células de mamífero (Toole, J. J., et al., Nature 312:342-347 (1984); Gitschier, J., et al., Nature 312:326-330 (1984); Wood, W. I., et al., Nature 312:330-337 (1984); Vehar, G. A., et al., Nature 312:337-342 (1984); documentos de patente WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; y patente de EE. UU. N° 4.757.006). Se dedujo la secuencia de aminoácidos de FVIII de ADNc como se muestra en la patente de EE. UU. N° 4.965.199. Además, se muestra FVIII de dominio B parcialmente o completamente delecionado en las patentes de EE. UU. N° 4.994.371 y 4.868.112. En algunas realizaciones, el dominio B de FVIII humano se sustituye por el dominio B de factor V humano como se muestra en la patente de EE. UU. N° 5.004.803. La secuencia de ADNc que codifica el factor VIII humano y la secuencia de aminoácidos se muestran en SEQ ID NOS: 17 y 16, respectivamente, de la publicación de solicitud de EE. UU. N° 2005/0100990.

20 La secuencia de FVIII porcino se publica en Toole, J. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5939-5942 (1986). Además, la secuencia de ADNc porcino completa obtenida de la amplificación por PCR de las secuencias de FVIII de una biblioteca de ADNc de bazo de cerdo se ha informado en Healey, J. F., et al., Blood 88:4209-4214 (1996). Se desveló FVIII humano/porcino híbrido que tiene sustituciones de todos los dominios, todas las subunidades, y secuencias de aminoácidos específicas, en la patente de EE. UU. N° 5.364.771 por Lollar y Runge, y en el

documento de patente WO 93/20093. Más recientemente, se informaron secuencias de nucleótidos y de aminoácidos correspondientes de los dominios A1 y A2 de FVIII porcino y un FVIII quimérico con dominios A1 y/o A2 porcinos sustituidos por los dominios humanos correspondientes en el documento de patente WO 94/11503. La patente de EE. UU. N° 5.859.204, Lollar, J. S., también desvela el ADNc porcino y las secuencias de aminoácidos deducidas. La patente de EE. UU. N° 6.458.563 desvela un FVIII porcino de dominio B deleciónado.

La patente de EE. UU. N° 5.859.204 a Lollar, J. S. informa de mutantes de FVIII funcionales que tienen antigenicidad reducida e inmunorreactividad reducida. La patente de EE. UU. N° 6.376.463 a Lollar, J. S. también informa de mutantes de FVIII que tienen inmunorreactividad reducida. La publicación de solicitud de EE. UU. N° 2005/0100990 a Saenko et al. informa de mutaciones funcionales en el dominio A2 de FVIII.

10 En una realización, el FVIII (o porción de FVIII de una proteína quimérica) puede ser al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a una secuencia de aminoácidos de FVIII de aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO: 18 o aminoácidos 1 a 2332 de SEQ ID NO: 16 (sin una secuencia señal) o una secuencia de aminoácidos de FVIII de aminoácidos -19 a 1438 de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 18 o aminoácidos -19 a 2332 de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 (con una secuencia señal), en donde FVIII tiene una actividad de coagulación, por ejemplo, activa el factor IX como cofactor para convertir el factor X en el factor X activado. El FVIII (o porción de FVIII de una proteína quimérica) puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos de FVIII de aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO: 18 o aminoácidos 1 a 2332 de SEQ ID NO: 16 (sin una secuencia señal). FVIII puede comprender además una secuencia señal.

20 El "dominio B" de FVIII, como se usa en el presente documento, es el mismo que el dominio B conocido en la técnica que se define por identidad interna de la secuencia de aminoácidos y sitios de escisión proteolítica, por ejemplo, los restos Ser741-Arg1648 de FVIII humano de longitud completa. Los otros dominios de FVIII humano se definen por los siguientes restos de aminoácidos: A1, restos Ala1-Arg372; A2, restos Ser373-Arg740; A3, restos Ser1690-Asn2019; C1, restos Lys2020-Asn2172; C2, restos Ser2173-Tyr2332. La secuencia de A3-C1-C2 incluye los restos Ser1690-Tyr2332. La secuencia restante, restos Glu1649-Arg1689, se denomina normalmente la región ácida a3. También se conocen en la técnica las localizaciones de los límites para todos los dominios, que incluyen los dominios B, para FVIII porcino, de ratón y canino. En una realización, el dominio B de FVIII está deleciónado ("factor VIII de dominio B deleciónado" o "BDD FVIII"). Un ejemplo de un BDD FVIII es REFACTO® (BDD FVIII recombinante), que tiene la misma secuencia que la porción del factor VIII de la secuencia en la Tabla 4. (La cadena pesada de BDD FVIII está doblemente subrayada; el dominio B está en cursiva; y la cadena ligera de BDD FVIII está en texto sin formato).

Tabla 4

BDD FVIII (SEQ ID NO: 18)

ATRRYYLCAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRPVKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTBHLFNIAKPRPPWNGLL
GPTIQAEVYDTVVTLLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGCSHTYVWQVLKEN
GPMSDFPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAREKQTQLHKFILLFAVFDGKSWHSETKNSL
MQBDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEI
SPITFLTAQTLMLDLGQFLLEFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVR
DDNSPSFQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPEBRSYKSOYLNNGPQRIKGYKVKVRFMAYT
DETFTREAIQHESGILGPLYGEVGETLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPIL
PGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRNVILF
SVEDENRSWYLTENIQRFLENPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLQSVCLHEVAYWYILSIGAQTDF
LSVFFSGYTFKHKMVEYEDPLTLFPFSGETVFMSENENGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYE
DSYEDISAYLISKNNAIERPSFSQKFFVLRNQRREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQ
SPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGEINHLGL
LGPIYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSIYEEDQRQGAEPKRNFKVKNETKTYFWKQVHHMAPTKDEF
DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAP
CNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDPLPGLVMAQDQIRWYLLSMGNSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMA
LYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPGLMASGHIRDFQITASGQYQW
APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSLSYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGN
STGTLMVFFGNVDSSGKHNIFNPPIIARYIRLHPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAI SDAQI
TASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLI
SSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFPQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

ES 2 753 124 T3

Tabla 5. Secuencia de nucleótidos que codifica BDD FVIII (SEQ ID NO: 19)*

			A	TGCAAATAGA	GCTCTCCACC	TGCTTCTTTC
661	TGTGCCTTTT	CGGATTCTGC	TTTAGTGCCA	CCAGAAGATA	CTACCTGGGT	GCAGTGGAAAC
721	TGTCATGGGA	CTATATGCCAA	AGTGATCTCG	GTGAGCTGCC	TGTGGACGCA	AGATTTCCTC
781	CTAGAGTGCC	AAAATCTTTT	CCATTCAACA	CCTCAGTCGT	GTACAAAAAG	ACTCTGTTTG
841	TAGAATTCAC	GGATCACCTT	TTCAACATCG	CTAAGCCAAG	GCCACCCTGG	ATGGGTCTGC
901	TAGGTCCTAC	CATCCAGGCT	GAGGTTTTATG	ATACAGTGGT	CATTACACTT	AAGAACATGG
961	CTTCCCATCC	TGTCAGTCTT	CATGCTGTTG	GTGTATCCTA	CTGGAAAGCT	TCTGAGGGAG
1021	CTGAATATGA	TGATCAGACC	AGTCAAAGGG	AGAAAGAAGA	TGATAAAGTC	TTCCCTGGTG
1081	GAAGCCATAC	ATATGTCTGG	CAGGTCCCTGA	AAGAGAATGG	TCCAATGGCC	TCTGACCCAC
1141	TGTGCCTTAC	CTACTCATAT	CTTTCTCATG	TGGACCTGGT	AAAAGACTTG	AATTCAGGCC
1201	TCATTGGAGC	CCTACTAGTA	TGTAGAGAAG	GGAGTCTGGC	CAAGGAAAAG	ACACAGACCT
1261	TGCACAAATT	TATACTACTT	TTTGCTGTAT	TTGATGAAGG	GAAAAGTTGG	CACTCAGAAA
1321	CAAAGAACTC	CTTGATGCAG	GATAGGGATG	CTGCATCTGC	TCGGGCCTGG	CCTAAAATGC
1381	ACACAGTCAA	TGGTTATGTA	AACAGGTCTC	TGCCAGGTCT	GATTGGATGC	CACAGGAAAT
1441	CAGTCTATTG	GCATGTGATT	GGAAATGGGCA	CCACTCCTGA	AGTGCATCA	ATATTCCCTCG
1501	AAGGTCACAC	ATTTCTTGTG	AGGAACCATC	GCCAGGCGTC	CTTGAAATC	TCGCCAATAA
1561	CTTTCCCTTAC	TGCTCAAACA	CTCTTGATGG	ACCTTGGACA	GTTTCTACTG	TTTTTGCATA
1621	TCTCTTCCCA	CCAACATGAT	GGCATGGAAG	CTTATGTCAA	AGTAGACAGC	TGTCCAGAGG
1681	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG	AAGCGGAAGA	CTATGATGAT	GATCTTACTG
1741	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC	AGGTTTGATG	ATGACAACTC	TCCTTCCTTT	ATCCAAATTC
1801	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT	CCTAAAACCT	GGGTACATTA	CATTGCTGCT	GAAGAGGAGG
1861	ACTGGGACTA	TGCTCCCTTA	GTCCCTCGCC	CCGATGACAG	AAGTTATAAA	AGTCAATATT
1921	TGAACAATGG	CCCTCAGCGG	ATTGGTAGGA	AGTACAAAAA	AGTCCGATTT	ATGGCATAACA
1981	CAGATGAAAAC	CTTTAAGACT	CGTGAAGCTA	TTCAGCATGA	ATCAGGAATC	TTGGGACCTT
2041	TACTTTATGG	GGAAAGTTGGA	GACACACTGT	TGATTATATT	TAAGAATCAA	GCAAGCAGAC
2101	CATATAACAT	CTACCCTCAC	GGAAATCACTG	ATGTCCGTCC	TTTGTATTCA	AGGAGATTAC
2161	CAAAAGGTGT	AAAACATTTG	AAGGATTTTC	CAATTC TGCC	AGGAGAAATA	TTCAAATATA
2221	AATGGACAGT	GACTGTAGAA	GATGGGCCAA	CTAAATCAGA	TCCTCGGTGC	CTGACCCGCT
2281	ATTACTCTAG	TTTCGTTAAT	ATGGAGAGAG	ATCTAGCTTC	AGGACTCATT	GGCCCTCTCC
2341	TCATCTGCTA	CAAAGAATCT	GTAGATCAA	GAGGAAACCA	GATAATGTCA	GACAAGAGGA
2401	ATGTCATCCT	GTTTTCTGTA	TTTGATGAGA	ACCGAAGCTG	GTACCTCACA	GAGAATATAC
2461	AACGCTTTCT	CCCCAATCCA	GCTGGAGTGC	AGCTTGAGGA	TCCAGAGTTC	CAAGCCTCCA
2521	ACATCATGCA	CAGCATCAAT	GGCTATGTTT	TTGATAGTTT	GCAGTTGTCA	GTTTGTTTGC
2581	ATGAGGTGGC	ATACTGGTAC	ATTCTAAGCA	TTGGAGCACA	GACTGACTTC	CTTCTGTCT
2641	TCTTCTCTGG	ATATACCTTC	AAACACAAAA	TGGTCTATGA	AGACACACTC	ACCTTATTC
2701	CATTCTCAGG	AGAAACTGTC	TTCATGTCTGA	TGGAAAACCC	AGGTCTATGG	ATTTCTGGGT
2761	GCCACAACCTC	AGACTTTTCGG	AACAGAGGCA	TGACCCGCTT	ACTGAAGGTT	TCTAGTTGTG
2821	ACAAGAACAC	TGGTGATTAT	TACGAGGACA	GTTATGAAGA	TATTTAGCA	TACTTGCTGA
2881	GTAAAAACAA	TGCCATTGAA	CCAAGAAGCT	TCTCTCAAAA	CCCACCAGTC	TTGAAACGCC
2941	ATCAACGGGA	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG
3001	ATACCATATC	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC
3061	AGAGCCCCCG	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC
3121	TCTGGGATTA	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA
3181	GTGTCCCTCA	GTTCAAGAAA	GTTGTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC
3241	CCTTATACCG	TGGAGAACTA	AATGAACATP	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG
3301	AAGTTGAAGA	TAATATCATG	GTAACTTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCCTTCT
3361	ATTCTAGCCT	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAAACT
3421	TTGTCAAGCC	TAATGAAACC	AAAACCTTACT	TTTGAAAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA
3481	CTAAAGATGA	GTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTCTC	TGATGTTGAC	CTGGAAAAAG
3541	ATGTGCACTC	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA	CACTAACACA	CTGAACCCCTG
3601	CTCATGGGAG	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTCACCATC	TTTGTATGAGA
3661	CCAAAAGCTG	GTACTTCACT	GAAAAATATG	AAAGAAAACG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC
3721	AGATGGAAGA	TCCCCTTTT	AAAGAGAATT	ATCGCTTCCA	TGCAATCAAT	GGCTACATAA
3781	TGGATACACT	ACCTGGCTTA	GTAATGGCTC	AGGATCAAAG	GATTCGATGG	TATCTGCTCA
3841	GCATGGGCAG	CAATGAAAAC	ATCCATTTCTA	TTCATTTTCAG	TGGACATGTG	TTCACTGTAC
3901	GAAAAAAGA	GGAGTATAAA	ATGGCACTGT	ACAATCTCTA	TCCAGGTGTT	TTTGAGACAG

```

4021   TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GCGGGGTGGA ATGCCTTATT GCGGAGCATC
4081   TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTCAG ACTCCCCTGG
4141   GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT
4201   GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTCATTATT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAAGG
4261   AGCCCTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACC AAT GATTATTCAC GGCATCAAGA
4321   CCCAGGGTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA
4381   GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT
4441   TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTAACCCT CCAATTATTG
4501   CTCGATACAT CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTTC CAGCACTCTT CGCATGGAGT
4561   TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT
4621   CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTGGCCACC TGGTCTCCTT
4681   CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC
4741   CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACTACTC
4801   AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCTCTATC TCCAGCAGTC
4861   AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTTCAGGAA
4921   ATCAAGACTC CTTACACCTT GTGGTGAACCT CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC
4981   TTCGAATTCA CCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT
5041   GCGAGGCACA GGACCTCTAC

```

* Los ácidos nucleicos subrayados codifican un péptido señal.

Un "FVIII de dominio B deleciónado" puede tener las deleciones completas o parciales desveladas en las patentes de EE. UU. N° 6.316.226, 6.346.513, 7.041.635, 5.789.203, 6.060.447, 5.595.886, 6.228.620, 5.972.885, 6.048.720, 5.543.502, 5.610.278, 5.171.844, 5.112.950, 4.868.112 y 6.458.563. En algunas realizaciones, una secuencia de FVIII de dominio B deleciónado de la presente invención comprende una cualquiera de las deleciones desveladas en la col. 4, línea 4 a col. 5, línea 28 y Ejemplos 1-5 de la patente de EE. UU. N° 6.316.226 (también en US 6.346.513). En otra realización, un factor VIII de dominio B deleciónado es el factor VIII de dominio B deleciónado S743/Q1638 (SQ BDD FVIII) (por ejemplo, factor VIII que tiene una deleción del aminoácido 744 al aminoácido 1637, por ejemplo, factor VIII que tiene los aminoácidos 1-743 y los aminoácidos 1638-2332 de SEQ ID NO: 16, es decir, SEQ ID NO: 18). En algunas realizaciones, un FVIII de dominio B deleciónado de la presente invención tiene una deleción desvelada en la col. 2, líneas 26-51 y Ejemplos 5-8 de la patente de EE. UU. N° 5.789.203 (también US 6.060.447, US 5.595.886 y US 6.228.620). En algunas realizaciones, un factor VIII de dominio B deleciónado tiene una deleción descrita en la col. 1, líneas 25 a col. 2, línea 40 de la patente de EE. UU. N° 5.972.885; col. 6, líneas 1-22 y Ejemplo 1 de la patente de EE. UU. N° 6.048.720; col. 2, líneas 17-46 de la patente de EE. UU. N° 5.543.502; col. 4, línea 22 a col. 5, línea 36 de la patente de EE. UU. N° 5.171.844; col. 2, líneas 55-68, Figura 2 y Ejemplo 1 de la patente de EE. UU. N° 5.112.950; col. 2, línea 2 a col. 19, línea 21 y Tabla 2 de la patente de EE. UU. N° 4.868.112; col. 2, línea 1 a col. 3, línea 19, col. 3, línea 40 a col. 4, línea 67, col. 7, línea 43 a col. 8, línea 26, y col. 11, línea 5 a col. 13, línea 39 de la patente de EE. UU. N° 7.041.635; o col. 4, líneas 25-53, de la patente de EE. UU. N° 6.458.563.

En algunas realizaciones, un FVIII de dominio B deleciónado tiene una deleción de la mayoría del dominio B, pero todavía contiene secuencias del extremo amino del dominio B que son esenciales para el procesamiento proteolítico *in vivo* del producto de traducción primaria en la cadena de dos polipéptidos, como se desvela en el documento de patente WO 91/09122. En algunas realizaciones, un FVIII de dominio B deleciónado se construye con una deleción de aminoácidos 747-1638, es decir, prácticamente una deleción completa del dominio B. Hoeben R.C., et al. J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990). Un factor VIII de dominio B deleciónado también puede contener una deleción de aminoácidos 771-1666 o aminoácidos 868-1562 de FVIII. Meulien P., et al. Protein Eng. 2(4): 301-6 (1988). Las deleciones del dominio B adicionales que son parte de la invención incluyen: deleción de aminoácidos 982 a 1562 o 760 a 1639 (Toole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1986) 83, 5939-5942), 797 a 1562 (Eaton, et al. Biochemistry (1986) 25:8343-8347), 741 a 1646 (Kaufman (solicitud PCT publicada N° WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, et al., DNA (1987) 6:553-564), 741 a 1648 (Pasek (solicitud PCT N° 88/00831)), o 816 a 1598 o 741 a 1648 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, documento de patente EP 295597)). En otras realizaciones, BDD FVIII incluye un polipéptido FVIII que contiene fragmentos del dominio B que retienen uno o más sitios de glucosilación unidos en N, por ejemplo, los restos 757, 784, 828, 900, 963, u opcionalmente 943, que corresponden a la secuencia de aminoácidos de la secuencia de FVIII de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos del dominio B incluyen 226 aminoácidos o 163 aminoácidos del dominio B, como se desvela en Miao, H.Z., et al., Blood 103(a): 3412-3419 (2004), Kasuda, A, et al., J. Thromb. Haemost. 6: 1352-1359 (2008), y Pipe, S.W., et al., J. Thromb. Haemost. 9: 2235-2242 (2011) (es decir, se retienen los primeros 226 aminoácidos o 163 aminoácidos del dominio B). En algunas realizaciones, el FVIII con un dominio B parcial es FVIII198 (SEQ ID NO: 105). FVIII198 es una molécula de FVIII_{FC} de cadena sencilla que contiene el dominio B parcial-226N6. 226 representa el aminoácido 226 del extremo N del dominio B de FVIII, y N6 representa seis sitios de N-glucosilación en el dominio B. En otras realizaciones más, BDD FVIII comprende además una mutación puntual en el resto 309 (de Phe a Ser) para mejorar la expresión de la proteína BDD FVIII. Véase Miao, H.Z., et al., Blood 103(a): 3412-3419 (2004). En otras realizaciones más, el BDD FVIII incluye un polipéptido FVIII que contiene una porción del dominio B, pero que no contiene uno o más sitios de escisión de furina (por ejemplo, Arg1313 y Arg 1648). Véase Pipe, S.W., et al., J. Thromb. Haemost. 9: 2235-2242 (2011). Cada una de las deleciones anteriores se puede hacer en cualquier secuencia de FVIII.

Una proteína FVIII útil en la presente invención puede incluir FVIII que tiene una o más secuencias heterólogas adicionales o modificaciones químicas o físicas en ellas, que no afectan la actividad de coagulación de FVIII. Dichas secuencias heterólogas o modificaciones químicas o físicas se pueden fusionar con el extremo C o extremo N de la proteína FVIII o insertar entre uno o más de los dos restos de aminoácidos en la proteína FVIII. Dichas inserciones en la proteína FVIII no afectan la actividad de coagulación de FVIII o función de FVIII. En una realización, las inserciones mejoran las propiedades farmacocinéticas de la proteína FVIII (por ejemplo, semivida). En otra realización, las inserciones pueden ser más de dos, tres, cuatro, cinco, o seis sitios.

En una realización, FVIII se escinde poco después de la arginina en el aminoácido 1648 (en el factor VIII de longitud completa o SEQ ID NO: 16), aminoácido 754 (en el factor VIII de dominio B deletado S743/Q1638 o SEQ ID NO: 16), o el resto de arginina correspondiente (en otras variantes), dando así como resultado una cadena pesada y una cadena ligera. En otra realización, FVIII comprende una cadena pesada y una cadena ligera, que se unen o asocian por un enlace no covalente mediado por ion metálico.

En otras realizaciones, FVIII es FVIII de cadena sencilla que no se ha escindido poco después de la arginina en el aminoácido 1648 (en FVIII de longitud completa o SEQ ID NO: 16), aminoácido 754 (en FVIII de dominio B deletado S743/Q1638 o SEQ ID NO: 18), o el resto de arginina correspondiente (en otras variantes). Un FVIII de cadena sencilla puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos. En una realización, la sustitución de aminoácidos está en un resto correspondiente al resto 1648, resto 1645, o ambos, de polipéptido factor VIII maduro de longitud completa (SEQ ID NO: 16) o resto 754, resto 751, o ambos, de factor VIII SQ BDD (SEQ ID NO: 18). La sustitución de aminoácidos puede ser cualquier aminoácido distinto de arginina, por ejemplo, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, selenocisteína, serina, tirosina, histidina, ornitina, pirrolisina o taurina.

FVIII se puede escindir adicionalmente por trombina y luego activar como FVIIIa, que sirve de cofactor para factor IX activado (FIXa). Y FIX activado junto con FVIII activado forma un complejo Xasa y convierte el factor X en factor X activado (FXa). Para la activación, FVIII se escinde por trombina después de tres restos de arginina, en los aminoácidos 372, 740 y 1689 (correspondientes a los aminoácidos 372, 740 y 795 en la secuencia de FVIII de dominio B deletado), generando la escisión FVIIIa que tiene las cadenas A1 de 50 kDa, A2 de 43 kDa y A3-C1-C2 de 73 kDa. En una realización, la proteína FVIII útil para la presente invención es FVIII no activo. En otra realización, la proteína FVIII es un FVIII activado.

La proteína que tiene polipéptido FVIII unido o asociado al fragmento de VWF puede comprender una secuencia al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 16 o 18, en donde la secuencia tiene la actividad de coagulación de FVIII, por ejemplo, que activa el factor IX como cofactor para convertir el factor X en el factor X activado (FXa).

Polipéptidos y proteínas "híbridos", como se usa en el presente documento, significa una combinación de una primera cadena de polipéptidos, por ejemplo, el fragmento de VWF, opcionalmente fusionado con un primer resto heterólogo, con una segunda cadena de polipéptidos, por ejemplo, una proteína FVIII, opcionalmente fusionada con un segundo resto heterólogo, formando así un heterodímero. En otra realización, se asocian entre sí el primer polipéptido y el segundo polipéptido en un híbrido mediante disulfuro u otro(s) enlace(s) covalente(s). Los híbridos se describen, por ejemplo, en los documentos de patente US 2004/101740 y US 2006/074199. El segundo polipéptido puede ser una copia idéntica del primer polipéptido o un polipéptido no idéntico. En otra realización, el primer polipéptido comprende un fragmento de proteína de fusión VWF-Fc, y el segundo polipéptido comprende proteína de fusión FVIII-Fc, haciendo el híbrido un heterodímero. El primer polipéptido y el segundo polipéptido se pueden asociar mediante un enlace covalente, por ejemplo, un enlace disulfuro, entre la primera región Fc y la segunda región Fc. El primer polipéptido y el segundo polipéptido se pueden asociar adicionalmente entre sí por unión entre el fragmento de VWF y la proteína FVIII.

45 D) Conectores

La proteína química de la presente invención comprende además un conector. Pueden estar presentes uno o más conectores entre cualesquiera dos proteínas, por ejemplo, entre el resto auxiliar y la proteína FVIII (algunas veces también denominado "conector FVIII/AM"), entre el fragmento de VWF y un primer resto heterólogo (algunas veces también denominado "conector de VWF"), por ejemplo, una primera región Fc, entre una proteína FVIII y un segundo resto heterólogo (algunas veces también denominado "conector de FVIII"), por ejemplo, una segunda región Fc, entre el fragmento de VWF y una proteína FVIII (por ejemplo, conector FVIII/AM), entre el fragmento de VWF y un segundo resto heterólogo, y/o entre una proteína FVIII y un primer resto heterólogo. Cada uno de los conectores puede tener la misma secuencia o diferente. En una realización, el conector es un conector polipeptídico. En otra realización, el conector es un conector no polipeptídico.

El conector útil en la presente invención puede comprender cualquier molécula orgánica. En una realización, el conector es un polímero, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o hidroxietilalmidón (HES). En otra realización, el conector es una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, un conector polipeptídico). El conector polipeptídico puede comprender al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 aminoácidos. El conector puede

comprender 1-5 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 10-50 aminoácidos, 50-100 aminoácidos, 100-200 aminoácidos, 200-300 aminoácidos, 300-400 aminoácidos, 400-500 aminoácidos, 500-600 aminoácidos, 600-700 aminoácidos, 700-800 aminoácidos, 800-900 aminoácidos, o 900-1000 aminoácidos.

5 Se conocen bien en la técnica los ejemplos de conectores polipeptídicos. En una realización, el conector comprende la secuencia G_n . El conector puede comprender la secuencia $(GA)_n$. El conector puede comprender la secuencia $(GGG)_n$. En otras realizaciones, el conector comprende $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 20). En otras realizaciones más, el conector comprende la secuencia $(GGG)_n(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 21). En estos casos, n pueden ser un número entero de 1-100. En otros casos, n pueden ser un número entero de 1-20, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. Los ejemplos de conectores incluyen, pero no se limitan a, GGG, SGGSGGS (SEQ ID NO: 22), GGSGGSGGSGGSGGG (SEQ ID NO: 23), GGSGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 24), GGSGGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 25), GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 26), los conectores en la Tabla 13 (SEQ ID NOs: 92, 93 y 94), y los conectores en la Tabla 14A (SEQ ID NOs: 95, 96 y 97). El conector no se elimina o disminuye la actividad del fragmento de VWF o la actividad de coagulación del factor VIII. Opcionalmente, el conector potencia la actividad del fragmento de VWF o la actividad de coagulación de la proteína factor VIII, por ejemplo, disminuyendo adicionalmente los efectos del impedimento estérico y haciendo el fragmento de VWF o la porción de factor VIII más accesible a su sitio de unión diana.

20 En una realización, el conector útil para la proteína quimérica tiene 15-25 aminoácidos de longitud. En otra realización, el conector útil para la proteína quimérica tiene 15-20 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector para la proteína quimérica tiene 10-25 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones, el conector para la proteína quimérica tiene 15 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones más, el conector para la proteína quimérica es $(GGGG)_n$ (SEQ ID NO: 27), donde G representa glicina, S representa serina y n es un número entero de 1-20.

E) Sitios de escisión

25 El conector también puede incorporar un resto capaz de ser escindido o químicamente (por ejemplo, hidrólisis de un éster enlace), enzimáticamente (es decir, incorporación de una secuencia de escisión por proteasa), o fotolíticamente (por ejemplo, un cromóforo tal como ácido 3-amino-3-(2-nitrofenil)propiónico (ANP)) para liberar una molécula de otra.

30 En una realización, el conector es un conector escindible. Los conectores escindibles pueden comprender uno o más sitios de escisión en el extremo N o extremo C, o ambos. En otra realización, el conector escindible consiste esencialmente en o consiste en uno o más sitios escindibles. En otras realizaciones, el conector escindible comprende las secuencias conectoras de aminoácidos heterólogos descritas en el presente documento o polímeros y uno o más sitios escindibles.

35 En ciertas realizaciones, un conector escindible comprende uno o más sitios de escisión que se pueden escindir en una célula hospedadora (es decir, sitios de procesamiento intracelular). Los ejemplos no limitantes del sitio de escisión incluyen RRRR (SEQ ID NO: 52), RKRRKR (SEQ ID NO: 53) y RRRRS (SEQ ID NO: 54).

40 En otras realizaciones, un conector escindible comprende uno o más sitios de escisión que se escinden por una proteasa después de que se administre a un sujeto una proteína quimérica que comprende el conector escindible. En una realización, el sitio de escisión se escinde por una proteasa seleccionada del grupo que consiste en factor XIa, factor XIIa, calicreína, factor VIIa, factor IXa, factor Xa, factor IIa (trombina), elastasa-2, MMP-12, MMP-13, MMP-17 y MMP-20. En otra realización, el sitio de escisión se selecciona del grupo que consiste en un sitio de escisión de FXIa (por ejemplo, KLTR ↓ AET (SEQ ID NO: 29)), un sitio de escisión de FXIa (por ejemplo, DFTR ↓ VVG (SEQ ID NO: 30)), un sitio de escisión de FXIIa (por ejemplo, TMTR ↓ IVGG (SEQ ID NO: 31)), un sitio de escisión de calicreína (por ejemplo, SPFR ↓ STGG (SEQ ID NO: 32)), un sitio de escisión de FVIIa (por ejemplo, LQVR ↓ IVGG (SEQ ID NO: 33)), un sitio de escisión de FIXa (por ejemplo, PLGR ↓ IVGG (SEQ ID NO: 34)), un sitio de escisión de FXa (por ejemplo, IEGR ↓ TVGG (SEQ ID NO: 35)), un sitio de escisión de FIIa (trombina) (por ejemplo, LTPR ↓ SLLV (SEQ ID NO: 36)), un sitio de escisión de elastasa-2 (por ejemplo, LGPV ↓ SGVP (SEQ ID NO: 37)), una escisión de granzima-B (por ejemplo, VAGD ↓ SLEE (SEQ ID NO: 38)), un sitio de escisión de MMP-12 (por ejemplo, GPAG ↓ LGGA (SEQ ID NO: 39)), un sitio de escisión de MMP-13 (por ejemplo, GPAG ↓ LRGA (SEQ ID NO: 40)), un sitio de escisión de MMP-17 (por ejemplo, APLG ↓ LRLR (SEQ ID NO: 41)), un sitio de escisión de MMP-20 (por ejemplo, PALP ↓ LVAQ (SEQ ID NO: 42)), un sitio de escisión de TEV (por ejemplo, ENLYFQ ↓ G (SEQ ID NO: 43)), un sitio de escisión de enterocinasa (por ejemplo, DDDK ↓ IVGG (SEQ ID NO: 44)), un sitio de escisión de proteasa 3C (PRESCISSION™) (por ejemplo, LEVLFQ ↓ GP (SEQ ID NO: 45)) y un sitio de escisión de sortasa A (por ejemplo, LPKT ↓ GSES) (SEQ ID NO: 46). En ciertas realizaciones, los sitios de escisión de FXIa incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 47) y SVSQTSLKTR (SEQ ID NO: 48). Los sitios de escisión de trombina a modo de ejemplo no limitante incluyen, por ejemplo, DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 49), TTKIKPR (SEQ ID NO: 50) o LVPRG (SEQ ID NO: 55), y una secuencia que comprende, consiste esencialmente en, o que consiste en ALRPR (por ejemplo, ALRPRVVGGA (SEQ ID NO: 51)).

En una realización específica, el sitio de escisión es TLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEK (SEQ ID NO: 56).

Polinucleótidos, vectores, células hospedadoras, y métodos de preparación

También se proporciona en la divulgación un polinucleótido que codifica un fragmento de VWF descrito en el presente documento, una proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF y un resto heterólogo, una proteína quimérica que comprende una proteína FVIII y un resto auxiliar, o una proteína quimérica que comprende un fragmento de VWF y una proteína FVIII. Cuando un fragmento de VWF se une a un resto heterólogo o una proteína FVIII en una proteína quimérica como una cadena sencilla de polipéptidos, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica el fragmento de VWF unido al resto heterólogo o la proteína FVIII. Cuando la proteína quimérica comprende una primera y una segunda cadenas de polipéptidos, la primera cadena de polipéptidos que comprende un fragmento de VWF y un primer resto heterólogo (por ejemplo, una primera región Fc) y la segunda cadena de polipéptidos que comprende un segundo resto heterólogo (por ejemplo, una segunda región Fc), en donde la primera cadena de polipéptidos y la segunda cadena de polipéptidos están asociadas entre sí, un polinucleótido puede comprender la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos. En una realización, la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos están en el mismo polinucleótido. En otra realización, la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos están en dos polinucleótidos diferentes (por ejemplo, vectores diferentes). En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un conjunto de polinucleótidos que comprende una primera cadena de nucleótidos y una segunda cadena de nucleótidos, en donde la primera cadena de nucleótidos codifica el fragmento de VWF de la proteína quimérica y la segunda cadena de nucleótidos codifica la proteína FVIII.

En otras realizaciones, el conjunto de los polinucleótidos comprende además una cadena de nucleótidos adicional (por ejemplo, una segunda cadena de nucleótidos cuando el polipéptido quimérico está codificado por una única cadena de polinucleótidos o una tercera cadena de nucleótidos cuando la proteína quimérica está codificada por dos cadenas de polinucleótidos) que codifica una proteína convertasa. La proteína convertasa se puede seleccionar del grupo que consiste en proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 5 (PCSK5 o PC5), proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 7 (PCSK7 o PC5), una levadura Kex 2, proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 3 (PACE o PCSK3), y dos o más combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la proteína convertasa es PACE, PC5, o PC7. En una realización específica, la proteína convertasa es PC5 o PC7. Véase la solicitud internacional N^o PCT/US2011/043568. En otra realización, la proteína convertasa es PACE/furina.

En ciertas realizaciones, la invención incluye un conjunto de polinucleótidos que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de VWF que comprende un dominio D' y un dominio D3 de VWF, una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una proteína FVIII, y una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un dominio D1 y dominio D2 de VWF. En esta realización, el dominio D1 y dominio D2 se expresan por separado (no se unen al dominio D'D3 del fragmento de VWF) con el fin de la formación apropiada de enlace disulfuro y plegamiento de los dominios D'D3. La expresión del dominio D1D2 pueden estar o en cis o en trans.

Como se usa en el presente documento, un vector de expresión se refiere a cualquier construcción de ácidos nucleicos que contenga los elementos necesarios para la transcripción y traducción de una secuencia codificante insertada, o en el caso de un vector viral de ARN, los elementos necesarios para la replicación y traducción, cuando se introducen en una célula hospedadora apropiada. Los vectores de expresión pueden incluir plásmidos, fagémidos, virus, y derivados de los mismos.

Los vectores de expresión de la invención incluirán polinucleótidos que codifican el fragmento de VWF o la proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF.

En una realización, una secuencia codificante para el fragmento de VWF, el segundo resto heterólogo (por ejemplo, una segunda región Fc), o la proteína FVIII, se une operativamente a una secuencia de control de la expresión. Como se usa en el presente documento, dos secuencias de ácidos nucleicos se unen operativamente cuando se unen covalentemente de tal forma que se permita que cada secuencia de ácidos nucleicos componente retenga su funcionalidad. Se dice que una secuencia codificante y una secuencia de control de la expresión génica se unen operativamente cuando se unen covalentemente de tal forma que se ponga la expresión o transcripción y/o traducción de la secuencia codificante bajo la influencia o el control de la secuencia de control de la expresión génica. Se dice que dos secuencias de ADN se unen operativamente si la inducción de un promotor en la secuencia de expresión del gen 5' da como resultado la transcripción de la secuencia codificante y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) da como resultado la introducción de una mutación con desplazamiento de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción de la secuencia codificante, o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente que se va a traducir en una proteína. Así, una secuencia de expresión génica se uniría operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos codificante si la secuencia de expresión génica fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ácidos nucleicos codificante de forma que el transcrito resultante se tradujera en la proteína deseada o polipéptido.

Una secuencia de control de la expresión génica como se usa en el presente documento es cualquier secuencia de nucleótidos reguladora, tal como una secuencia promotora o combinación de promotor-potenciador, que facilita la eficiente transcripción y traducción del ácido nucleico codificante al que se une operativamente. La secuencia de control de la expresión génica puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero o viral, tal como un promotor constitutivo o inducible. Los promotores constitutivos de mamífero incluyen, pero no se limitan a, los promotores para

los siguientes genes: promotor de hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT), adenosina desaminasa, piruvato cinasa, beta-actina, y otros promotores constitutivos. Los promotores virales a modo de ejemplo que funcionan constitutivamente en células eucariotas incluyen, por ejemplo, promotores del citomegalovirus (CMV), virus simio (por ejemplo, SV40), virus del papiloma, adenovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del sarcoma de Rous, citomegalovirus, las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney, y otros retrovirus, y el promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Los expertos habituales en la técnica conocen otros promotores constitutivos. Los promotores útiles como secuencias de expresión génica de la invención también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles se expresan en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, se induce el promotor de metalotioneína para promover la transcripción y traducción en presencia de ciertos iones metálicos. Los expertos habituales en la técnica conocen otros promotores inducibles.

En general, la secuencia de control de la expresión génica debe incluir, según sea necesario, secuencias no transcriptoras de 5' y no traductoras de 5' implicadas en el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, tal como una caja TATA, secuencia de terminación, secuencia CAAT, y similares. Especialmente, dichas secuencias no transcriptoras de 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control de la transcripción del ácido nucleico codificante operativamente unido. Las secuencias de expresión génica incluyen opcionalmente secuencias potenciadoras o secuencias activadoras en la dirección 5', según se desee.

Los vectores virales incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácidos nucleicos de los siguientes virus: retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del tumor mamario murino y virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adeno-asociado; virus tipo SV40; virus del poliovirus; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus de la variolovacuna; virus de la poliomielitis; y virus de ARN tales como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores muy conocidos en la técnica. Ciertos vectores virales se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que genes no esenciales se han sustituido con el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus, cuyo ciclo vital implica transcripción inversa de ARN viral genómico en ADN con posterior integración proviral en ADN de la célula hospedadora. Los retrovirus han sido autorizados para ensayos de terapia de genes humanos. Los más útiles son los retrovirus que son deficientes en la replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Dichos vectores de expresión retroviral genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de alta eficiencia de genes *in vivo*. Se proporcionan protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes en la replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno dentro de un plásmido, transfección de una línea celular de encapsulación con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de encapsulación, recogida de partículas virales de medios de cultivo de tejido, e infección en las células diana con partículas virales) en Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman Co., New York (1990) y Murry, E. J., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991).

En una realización, el virus es un virus adeno-asociado, un virus de ADN bicatenario. El virus adeno-asociado se puede manipular para ser deficiente en la replicación y es capaz de infectar una amplia variedad de tipos de células y especies. Tiene además ventajas tales como estabilidad al calor y disolventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, que incluyen células hemopoyéticas; y carecen de inhibición de la superinfección, permitiendo así múltiples series de transducciones. Supuestamente, el virus adeno-asociado se puede integrar dentro del ADN celular humano de un modo específico de sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis insercional y variabilidad de la expresión génica insertada característica de la infección retroviral. Además, se han seguido las infecciones por virus adeno-asociados no mutantes en cultivo de tejido durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, que implica que la integración genómica del virus adeno-asociado es un acontecimiento relativamente estable. El virus adeno-asociado también puede funcionar de un modo extracromosómico.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito ampliamente en la técnica y son bien conocidos para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. En los últimos años, se ha encontrado que los vectores plasmídicos son particularmente ventajosos para administrar genes a células *in vivo* debido a su incapacidad para replicarse dentro de e integrarse en un genoma hospedador. Estos plásmidos, sin embargo, que tienen un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido de un gen operativamente codificado dentro del plásmido. Algunos plásmidos comúnmente usados disponibles de proveedores comerciales incluyen pBR322, pUC18, pUC19, diversos plásmidos de pcDNA, pRC/CMV, diversos plásmidos de pCMV, pSV40 y pBlueScript. Los ejemplos adicionales de plásmidos específicos incluyen pcDNA3.1, número de catálogo V79020; pcDNA3.1/hygro, número de catálogo V87020; pcDNA4/myc-His, número de catálogo V86320; y pBudCE4.1, número de catálogo V53220, todos de Invitrogen (Carlsbad, CA.). Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Además, los plásmidos pueden ser diseñados a medida usando técnicas convencionales de biología molecular para retirar y/o añadir fragmentos específicos de ADN.

En un sistema de expresión en insecto que se puede usar para producir las proteínas de la invención, se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar los genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. Se puede clonar una secuencia codificante en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen poliédrico) del virus y ponerse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el

promotor poliédrico). La inserción satisfactoria de una secuencia codificante dará como resultado la inactivación del gen poliédrico y la producción de virus recombinante no ocluido (es decir, virus que carece de la cubierta proteínica codificada por el gen poliédrico). Estos virus recombinantes se usan entonces para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las que se expresa el gen insertado (véase, por ejemplo, Smith et al. (1983) J Virol 46:584; patente de EE. UU. N° 4.215.051). Los ejemplos adicionales de este sistema de expresión se pueden encontrar en Ausubel et al., eds. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

Otro sistema que se puede usar para expresar las proteínas de la invención es el sistema de expresión en gen glutamina sintetasa, también denominado el "sistema de expresión en GS" (Lonza Biologics PLC, Berkshire RU). Este sistema de expresión se describe con detalle en la patente de EE. UU. N° 5.981.216.

En células hospedadoras de mamífero, se pueden utilizar varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que un adenovirus se usa como vector de expresión, se puede unir una secuencia codificante a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. Este gen quimérico se puede entonces insertar en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar péptido en hospedadores infectados. Véase, por ejemplo, Logan & Shenk (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:3655). Alternativamente, se puede usar el promotor de la variolovacuna 7.5 K. Véanse, por ejemplo, Mackett et al. (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79:7415; Mackett et al. (1984) J Virol 49:857; Panicali et al. (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79:4927.

Para aumentar la eficiencia de producción, los polinucleótidos se pueden diseñar para codificar múltiples unidades de la proteína de la invención separadas por sitios de escisión enzimática. El polipéptido resultante se puede escindir (por ejemplo, mediante tratamiento con la enzima apropiada) para recuperar las unidades de polipéptido. Esto puede aumentar el rendimiento de polipéptidos accionados por un único promotor. Cuando se usa en sistemas de expresión virales apropiados, la traducción de cada polipéptido codificado por el ARNm se dirige internamente en el transcrito; por ejemplo, por un sitio interno de entrada al ribosoma, IRES. Así, la construcción policistrónica dirige la transcripción de un único ARNm policistrónico grande que, a su vez, dirige la traducción de múltiples polipéptidos individuales. Este enfoque elimina la producción y el procesamiento enzimático de poliproteínas y puede aumentar significativamente el rendimiento de polipéptidos accionados por un único promotor.

Los vectores usados en la transformación contendrán normalmente un marcador de selección usado para identificar transformantes. En sistemas bacterianos, esto puede incluir un gen de resistencia a antibióticos tal como ampicilina o kanamicina. Los marcadores de selección para su uso en células de mamífero cultivadas incluyen genes que confieren resistencia a fármacos, tales como neomicina, higromicina y metrotrexato. El marcador de selección puede ser un marcador de selección amplificable. Un marcador de selección amplificable es el gen dihidrofolato reductasa (DHFR). Simonsen C C et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:2495-9. Los marcadores de selección se revisan por Thilly (1986) Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass., y la elección de los marcadores de selección está perfectamente dentro del nivel del experto habitual en la técnica.

Los marcadores de selección se pueden introducir en la célula sobre un plásmido separado al mismo tiempo que el gen de interés, o se pueden introducir sobre el mismo plásmido. Si es sobre el mismo plásmido, el marcador de selección y el gen de interés pueden estar bajo el control de diferentes promotores o el mismo promotor, produciendo la última disposición un mensaje dicistrónico. Se conocen en la técnica construcciones de este tipo (por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 4.713.339).

Los vectores de expresión pueden codificar marcas que permiten la fácil purificación de la proteína recombinantemente producida. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, vector pUR278 (Ruther et al. (1983) EMBO J 2:1791), en el que las secuencias codificantes para la proteína a expresar se pueden unir en el vector en marco con la región codificante lac z de manera que se produzca una proteína de fusión marcada; se pueden usar vectores pGEX para expresar proteínas de la invención con una marca de glutatión S-transferasa (GST). Estas proteínas son normalmente solubles y se pueden purificar fácilmente de células por adsorción a perlas de glutatión-agarosa, seguido por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores incluyen sitios de escisión (trombina o proteasa de factor Xa o PRESCISSON PROTEASE™ (Farmacia, Peapack, N.J.)) para la fácil retirada de la marca después de la purificación.

Entonces, el vector o vectores de expresión se transfectan o co-transfectan en una célula diana adecuada, que expresará los polipéptidos. Las técnicas de transfección conocidas en la técnica incluyen, pero no se limitan a, precipitación con fosfato de calcio (Wigler et al. (1978) Cell 14:725), electroporación (Neumann et al. (1982) EMBO J 1:841) y reactivos basados en liposomas. Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión en huésped para expresar las proteínas descritas en el presente documento, que incluyen tanto células procariontas como eucariotas. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*) transformadas con vectores de expresión recombinantes de ADN de bacteriófago o de ADN de plásmido que contienen una secuencia codificante apropiada; levadura u hongos filamentosos transformados con vectores de expresión recombinantes de levadura u hongos que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células de planta infectados con vectores de expresión

de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor o virus del mosaico del tabaco) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen una secuencia codificante apropiada; o sistemas de células de animal, que incluyen células de mamífero (por ejemplo, células HEK 293, CHO, Cos, HeLa, HKB11 y BHK).

5 En una realización, la célula hospedadora es una célula eucariota. Como se usa en el presente documento, una célula eucariota se refiere a cualquier célula de animal o planta que tiene un núcleo definitivo. Las células eucariotas de animales incluyen células de vertebrados, por ejemplo, mamíferos, y células de invertebrados, por ejemplo, insectos. Las células eucariotas de plantas pueden incluir específicamente, sin limitación, células de levadura. Una célula eucariota es distinta de una célula procariota, por ejemplo, bacterias.

10 En ciertas realizaciones, la célula eucariota es una célula de mamífero. Una célula de mamífero es cualquier célula derivada de un mamífero. Las células de mamífero incluyen específicamente, pero no se limitan a, líneas celulares de mamífero. En una realización, la célula de mamífero es una célula humana. En otra realización, la célula de mamífero es una célula HEK 293, que es una línea celular de riñón embrionario humano. Las células HEK 293 están disponibles como CRL-1533 de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA, y como células 293-H, N° de catálogo 11631-017 o células 293-F, N° de catálogo 11625-019 de Invitrogen (Carlsbad, Calif.). En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una célula PER.C6®, que es una línea celular humana derivada de retina. Las células PER.C6® están disponibles de Crucell (Leiden, Países Bajos). En otras realizaciones, la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO). Las células CHO están disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA (por ejemplo, CHO-K1; CCL-61). En otras realizaciones más, la célula de mamífero es una célula de riñón de hámster bebé (BHK). Las células BHK están disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA (por ejemplo, CRL-1632). En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una célula HKB11, que es una línea celular híbrida de una célula HEK293 y una línea de linfocitos B humanos. Mei et al., Mol. Biotechnol. 34(2): 165-78 (2006).

25 En una realización, un plásmido que codifica el fragmento de VWF o la proteína quimérica de la invención incluye además un marcador de selección, por ejemplo, resistencia a zeocina, y se transfecta en células HEK 293, para la producción del fragmento de VWF o la proteína quimérica.

30 En otra realización, se cotransfectan en células HEK 293 un primer plásmido que comprende una secuencia codificante de la fusión factor VIII-Fc y un primer marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a zeocina, y un segundo plásmido que comprende una secuencia codificante del fragmento de VWF-Fc y un segundo marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina, para la producción de híbrido de factor VIII-Fc y VWF-Fc. El primer y segundo plásmidos se pueden introducir en cantidades iguales (es decir, relación 1:1), o se pueden introducir en cantidades no iguales.

35 En algunas realizaciones, se cotransfectan en células HEK 293 un primer plásmido que incluye una secuencia codificante de fusión de factor VIII-Fc y un primer marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a zeocina, y un segundo plásmido que incluye una secuencia codificante de fragmento de VWF-Fc y un segundo marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina, y un tercer plásmido que incluye una secuencia codificante de proteína convertasa (por ejemplo, PC5 o furina) y un tercer marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a higromicina, para la producción del híbrido de factor VIII-fragmento de VWF. El primer y segundo plásmidos se pueden introducir en cantidades iguales (es decir, relación molar 1:1), o se pueden introducir en cantidades no iguales. En ciertas realizaciones, se cotransfectan en células HEK 293 un primer plásmido, que incluye una secuencia codificante de la fusión factor VIII-Fc, una secuencia codificante de fragmento de VWF-Fc, y un primer marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a zeocina, y un segundo plásmido que incluye una secuencia codificante de proteína convertasa (por ejemplo, PC5 o furina) y un segundo marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a higromicina, para la producción de híbrido de factor VIII-fragmento de VWF. En una realización, se puede conectar la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de FVIII-Fc y la secuencia del fragmento de VWF-Fc para codificar un único polipéptido. En otra realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de FVIII-Fc y la secuencia del fragmento de VWF-Fc se pueden codificar como cadenas de dos polipéptidos. Los promotores para la secuencia codificante de la fusión factor VIII-Fc y la secuencia codificante del fragmento de VWF-Fc pueden ser diferentes o pueden ser los mismos.

50 En algunas realizaciones, un plásmido que comprende furina se co-transfecta con el plásmido que contiene la secuencia codificante del factor VIII-Fc y/o la secuencia codificante del fragmento de VWF-Fc. En algunas realizaciones, la proteína furina está sobre el mismo plásmido que comprende la secuencia codificante de la fusión de factor VIII-Fc. En algunas realizaciones, la proteína furina está sobre el mismo plásmido que comprende la secuencia codificante del fragmento de VWF-Fc. En algunas realizaciones, la proteína furina está sobre un plásmido separado.

55 En otras realizaciones más, las células transfectadas se transfectan establemente. Estas células se pueden seleccionar y mantener como una línea celular estable, usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

Las células hospedadoras que contienen construcciones de ADN de la proteína se cultivan en un medio de crecimiento apropiado. Como se usa en el presente documento, el término "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene los nutrientes requeridos para el crecimiento de las células. Los nutrientes requeridos para el crecimiento celular pueden incluir una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y factores de crecimiento. Opcionalmente, los medios pueden contener uno o más factores de selección. Opcionalmente, los medios pueden contener suero de ternero bovino o suero de ternero fetal (FCS). En una realización, los medios no contienen sustancialmente IgG. El medio de crecimiento, en general, se seleccionará para células que contienen la construcción de ADN por, por ejemplo, selección de fármacos o deficiencia en un nutriente esencial que se complementa por el marcador de selección sobre la construcción de ADN o se co-transfecta con la construcción de ADN. Las células de mamífero cultivadas, en general, se cultivan en medio que contiene suero o sin suero comercialmente disponible (por ejemplo, MEM, DMEM, DMEM/F12). En una realización, el medio es CD293 (Invitrogen, Carlsbad, CA.). En otra realización, el medio es CD17 (Invitrogen, Carlsbad, CA.). La selección de un medio apropiado para la línea celular particular usada está dentro del nivel de los expertos habituales en la técnica.

Para co-expresar el fragmento de VWF y un segundo resto heterólogo o una proteína FVIII, las células hospedadoras se cultivan en condiciones que permiten la expresión de tanto el fragmento de VWF como un segundo resto heterólogo o una proteína FVIII. Como se usa en el presente documento, cultivar se refiere a mantener las células vivas *in vitro* durante al menos un tiempo definido. Mantener puede incluir, pero no necesita incluir, un aumento en la población de células vivas. Por ejemplo, las células mantenidas en cultivo pueden ser estáticas en la población, pero todavía viables y capaces de producir un producto deseado, por ejemplo, una proteína recombinante o proteína de fusión recombinante. Se conocen bien en la técnica las condiciones adecuadas para cultivar células eucariotas e incluyen la selección apropiada de medios de cultivo, suplementos para medios, temperatura, pH, saturación de oxígeno, y similares. Para fines comerciales, cultivar puede incluir el uso de cualquiera de diversos tipos de sistemas de aumento de escala que incluyen matraces agitadores, botellas rotatorias, biorreactores de fibra hueca, biorreactores de tanque agitado, biorreactores de columna aireada, biorreactores Wave, y otros.

Las condiciones del cultivo celular también se seleccionan para permitir la asociación del fragmento de VWF con el segundo resto heterólogo o una proteína FVIII. La condiciones que permiten la expresión del fragmento de VWF y/o la proteína FVIII pueden incluir la presencia de una fuente de vitamina K. Por ejemplo, en una realización, se cultivan células HEK 293 establemente transfectadas en medio CD293 (Invitrogen, Carlsbad, CA) o medio OptiCHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con glutamina 4 mM.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de expresión, preparación o producción del fragmento de VWF de la divulgación que comprende a) transfectar una célula hospedadora con un polinucleótido que codifica el fragmento de VWF y b) cultivar la célula hospedadora en un medio de cultivo en una condición adecuada para expresar el fragmento de VWF, en donde se expresa el fragmento de VWF. En un caso, la divulgación se refiere a un método de producción de una proteína VWF madura o un fragmento de la misma que comprende a) transfectar una célula hospedadora con un primer polinucleótido que codifica la proteína VWF o un fragmento de la misma, que se fusiona con un prepeptido de VWF, y un segundo polinucleótido que codifica una proteína convertasa, por ejemplo, PC5, PC7, o furina y b) cultivar la célula hospedadora en un medio de cultivo en una condición adecuada para expresar la proteína VWF madura o fragmento de la misma. El polinucleótido que codifica la proteína VWF o un fragmento de la misma también se puede fusionar con un prepeptido de VWF. La secuencia de prepeptidos se puede escindir durante la inserción al retículo endoplasmático antes de la secreción.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de expresión, preparación o producción de una proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF unido o asociado a un resto heterólogo o una proteína FVIII que comprende a) transfectar una o más células hospedadoras con un polinucleótido o un conjunto de polinucleótidos que codifica la proteína quimérica y b) cultivar la célula hospedadora en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para expresar la proteína quimérica. En una realización, la invención se refiere a un método de expresión, preparación o producción de una proteína quimérica que comprende a) transfectar una célula hospedadora con un primer polinucleótido que codifica un fragmento de VWF unido a un resto heterólogo y un segundo polinucleótido que codifica una proteína FVIII unida a un resto heterólogo y b) cultivar la célula hospedadora en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para expresar la proteína quimérica. El primer y segundo polinucleótido puede estar en un vector o dos vectores. En otra realización, la invención se refiere a un método de expresión, preparación o producción de una proteína quimérica que comprende a) transfectar una célula hospedadora con un primer polinucleótido que codifica un fragmento de VWF unido a un resto heterólogo, un segundo polinucleótido que codifica una proteína FVIII unida a un resto heterólogo, y un tercer polinucleótido que codifica una proteína convertasa, y b) cultivar la célula hospedadora en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para expresar la proteína quimérica. En otras realizaciones, la invención se refiere a un método de expresión, preparación o producción de una proteína quimérica que comprende a) transfectar una célula hospedadora con un primer polinucleótido que codifica un fragmento de VWF que comprende un dominio D' y un dominio D3 unido a un resto heterólogo, un segundo polinucleótido que codifica una proteína FVIII unida a un resto heterólogo, y un tercer polinucleótido que codifica un dominio D1 y un dominio D2 de VWF, y b) cultivar la célula hospedadora en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para expresar la proteína quimérica. En una realización, el primer polinucleótido, el segundo polinucleótido y el tercer polinucleótido pueden estar en un vector o vectores separados. En otra realización, el primer y segundo polinucleótido pueden estar en un vector, y el tercer

polinucleótido puede ser otro vector. En otras realizaciones, el primer polinucleótido y el tercer polinucleótido pueden estar en un vector, y el segundo polinucleótido puede ser otro vector. En algunas realizaciones, el segundo polinucleótido y el tercer polinucleótido pueden estar en un vector y el primer polinucleótido puede estar en otro vector.

- 5 En realizaciones adicionales, el producto de proteína que contiene el fragmento de VWF o la proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF es secretado en el medio. El medio se separa de las células, se concentra, se filtra y entonces se pasa sobre dos o tres columnas de afinidad, por ejemplo, una columna de proteína A y una o dos columnas de intercambio aniónico.

- 10 En ciertos aspectos, la presente divulgación se refiere al fragmento de VWF o el polipéptido quimérico producido por los métodos descritos en el presente documento.

- 15 La producción *in vitro* permite el aumento de escala para dar grandes cantidades de los polipéptidos alterados deseados de la invención. Se conocen en la técnica técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo de tejido e incluyen cultivo en suspensión homogénea, por ejemplo en un reactor de columna aireada o en un reactor continuo con agitador, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo en fibras huecas, microcápsulas, sobre microperlas de agarosa o cartuchos de cerámica. Si fuera necesario y/o se deseara, las disoluciones de polipéptidos se pueden purificar por los métodos habituales de cromatografía, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, cromatografía sobre DEAE-celulosa o cromatografía de afinidad.

Composición farmacéutica

- 20 Las composiciones que contienen la proteína quimérica de la presente invención pueden contener un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. Por ejemplo, pueden contener excipientes y/o auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones diseñadas para administración al sitio de acción.

- 25 La composición farmacéutica se puede formular para administración parenteral (es decir, intravenosa, subcutánea, o intramuscular) por inyección en bolo. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua sin pirógenos.

- 30 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral también incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua, por ejemplo, sales solubles en agua. Además, se pueden administrar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones aceitosas apropiadas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones para inyección acuosa pueden contener sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores. También se pueden usar liposomas para encapsular las moléculas de la invención para la administración en células o espacios intersticiales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables a modo de ejemplo son disolventes fisiológicamente compatibles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares. En algunas realizaciones, la composición comprende agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico. En otras realizaciones, las composiciones comprenden sustancias farmacéuticamente aceptables tales como agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la estabilidad en almacén o la eficacia de los principios activos.

Las composiciones de la invención pueden estar en una variedad de formas, que incluyen, por ejemplo, líquidos (por ejemplo, disoluciones inyectables e infusibles), dispersiones, suspensiones, formas farmacéuticas semisólidas y sólidas. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica.

- 50 La composición se puede formular como una disolución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Se pueden preparar disoluciones inyectables estériles incorporando el principio activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización, que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración. La fluidez apropiada de una disolución se puede mantener, por ejemplo, usando un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el

caso de dispersión y usando tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

5 El principio activo se puede formular con una formulación o dispositivo de liberación controlada. Los ejemplos de dichas formulaciones y dispositivos incluyen implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulada. Se pueden usar polímeros biodegradables biocompatibles, por ejemplo, etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Se conocen en la técnica los métodos para la preparación de dichas formulaciones y dispositivos. Véase por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

10 Se pueden preparar formulaciones de liberación prolongada inyectables formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación entre el fármaco y el polímero, y la naturaleza del polímero empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Otros polímeros biodegradables a modo de ejemplo son poliortoésteres y polianhídridos. También se pueden preparar las formulaciones inyectables de liberación prolongada atrapando el fármaco en liposomas o
15 microemulsiones.

Se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones. En una realización, la proteína quimérica de la invención se formula con otro factor de coagulación, o una variante, fragmento, análogo, o derivado del mismo. Por ejemplo, el factor de coagulación incluye, pero no se limita a, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, protrombina, fibrinógeno, factor de von Willebrand o factor tisular soluble
20 recombinante (rSTF), o formas activadas de cualquiera de los precedentes. El factor de coagulación de agente hemostático también puede incluir fármacos antifibrinolíticos, por ejemplo, ácido épsilon-amino-caproico, ácido tranexámico.

Se pueden ajustar las pautas posológicas para proporcionar la respuesta deseada óptima. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo, o se puede reducir o
25 incrementar proporcionalmente la dosis como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es ventajoso formular las composiciones parentales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, Pa. 1980).

Además del compuesto activo, la forma farmacéutica líquida puede contener componentes inertes tales como agua, alcohol etílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-
30 butilenglicol, dimetilformamida, aceites, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles, y ésteres de ácidos grasos de sorbitano.

También se describen ejemplos no limitantes de vehículos farmacéuticos adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin. Algunos ejemplos de excipientes incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche
35 desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y similares. La composición también puede contener reactivos de tamponamiento del pH, y agentes humectantes o emulsionantes.

Para administración por vía oral, la composición farmacéutica puede tomar la forma de comprimidos o cápsulas preparadas mediante medios convencionales. La composición también se puede preparar como un líquido, por
40 ejemplo, un jarabe o una suspensión. El líquido puede incluir agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsionantes (lecitina o goma arábiga), vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados) y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden incluir aromatizantes, colorantes y edulcorantes. Alternativamente, la composición se puede presentar como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado.

45 Para administración por vía oral, la composición puede tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar según protocolos convencionales.

Para administración por inhalación, los compuestos para su uso según la presente invención se administran convenientemente en forma de un aerosol nebulizado con o sin excipientes, o en forma de un spray de aerosol de un envase presurizado o nebulizador, con opcionalmente un propulsor, por ejemplo, diclorodifluorometano, trichlorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol
50 presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

55 La composición farmacéutica también se puede formular para administración rectal como un supositorio o enema de retención, por ejemplo, que contiene bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Terapia génica

Sería terapéuticamente beneficioso producir *in vivo* en un mamífero, por ejemplo, un paciente humano, una proteína quimérica del mismo de la invención usando un enfoque de terapia génica para el tratamiento de una enfermedad hemorrágica o trastorno seleccionado del grupo que consiste en un trastorno hemorrágico de la coagulación, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia dentro de los músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo craneal, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de huesos, sangrado del sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal y sangrado en la vaina del iliopsoas. En un caso, la enfermedad hemorrágica o trastorno es hemofilia. En otro caso, la enfermedad hemorrágica o trastorno es hemofilia A. Esto implica la administración de un fragmento de VWF o ácido nucleico adecuado que codifica la proteína quimérica operativamente unida a secuencias de control de la expresión adecuadas. En ciertos casos, estas secuencias se incorporan en un vector viral. Los vectores virales adecuados para dicha terapia génica incluyen vectores adenovirales, vectores lentivirales, vectores baculovirales, vectores del virus de Epstein-Barr, vectores papovavirales, vectores del virus de la variolovacuna, vectores del virus del herpes y vectores de virus adenoasociados (AAV). El vector viral puede ser un vector viral defectuoso en la replicación. En otros casos, un vector adenoviral tiene una delección en su gen E1 o gen E3. Cuando se usa un vector adenoviral, el mamífero puede no exponerse a un ácido nucleico que codifica un gen marcador de selección. En otros casos, las secuencias se incorporan en un vector no viral conocido para los expertos en la técnica.

Métodos de uso del fragmento de VWF o proteína quimérica

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a prevenir o inhibir la interacción de FVIII con VWF endógeno bloqueando o escudando el sitio de unión de VWF sobre FVIII de VWF endógeno. En un caso, la divulgación se refiere a un método de construcción de una proteína FVIII que tiene semivida más larga que FVIII no mutante o un híbrido monómero-dímero de FVIII, comprendiendo el método asociar covalentemente un resto auxiliar con la proteína FVIII, preparando así una proteína quimérica que comprende la proteína FVIII y el resto auxiliar, en donde el resto auxiliar escuda o previene la interacción de la proteína FVIII con VWF endógeno. La proteína quimérica útil en el método incluye una cualquiera o más de las proteínas quiméricas descritas en el presente documento.

Otro aspecto de la divulgación incluye un método de administración de un sujeto en necesidad del mismo de una proteína FVIII que tiene semivida más larga que FVIII no mutante o un híbrido monómero-dímero de FVIII, que consiste en dos cadenas de polipéptidos, una primera cadena que consiste en una secuencia de aminoácidos que codifica FVIII y una región Fc y una segunda cadena que consiste en una región Fc, en donde el método comprende administrar el fragmento de VWF descrito en el presente documento o la proteína quimérica descrita en el presente documento al sujeto. La secuencia de aminoácidos de FVIII en el híbrido monómero-dímero puede ser SQ FVIII o FVIII no mutante.

En un caso, la divulgación se refiere a un método de uso de un resto auxiliar, por ejemplo, un fragmento de VWF descrito en el presente documento o una proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF, para prevenir o inhibir la interacción de VWF endógeno con una proteína FVIII. En otro caso, una proteína FVIII que es capaz de interaccionar con el fragmento de VWF es FVIII endógeno. En otros casos, una proteína FVIII que es capaz de interaccionar con el fragmento de VWF es una composición de FVIII administrada por separado a un sujeto antes o después de o simultáneamente con el fragmento de VWF o la proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF. En otros casos, una proteína FVIII que es capaz de unirse al fragmento de VWF es una composición de FVIII administrada a un sujeto junto con el fragmento de VWF o la proteína quimérica. Aún en otros casos, una proteína FVIII que es capaz de unirse al fragmento de VWF es FVIII presente con el fragmento de VWF o asociado al fragmento de VWF en la proteína quimérica. El fragmento de VWF o la proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF se une a, o se asocia con, la proteína FVIII y así prolonga la semivida de la proteína FVIII unida al fragmento de VWF o la proteína quimérica. La proteína FVIII unida al fragmento de VWF o la proteína quimérica se escudan o protege de la vía de eliminación de VWF y así tiene eliminación reducida en comparación con la proteína FVIII no unida al fragmento de VWF o la proteína quimérica. La proteína FVIII escudada tiene así una semivida más larga que una proteína FVIII no unida o asociada al fragmento de VWF o la proteína quimérica. En ciertos casos, la proteína FVIII asociada a o protegida por un fragmento de VWF, o una proteína quimérica de la invención, no se elimina por un receptor de eliminación de VWF. En otros casos, la proteína FVIII asociada a o protegida por un fragmento de VWF, o una proteína quimérica, se elimina del sistema más lentamente que la proteína FVIII que no se asocia a o protege por el fragmento de VWF.

En un aspecto, la proteína quimérica que comprende la misma tiene eliminación reducida de la circulación ya que el fragmento de VWF o la proteína quimérica no contiene un sitio de unión de receptor de eliminación de VWF. El fragmento de VWF previene o inhibe la eliminación de FVIII unido o asociado al fragmento de VWF del sistema mediante la vía de eliminación de VWF. Los fragmentos de VWF útiles para la presente invención también pueden proporcionar al menos una o más propiedades de protección de FVIII de tipo VWF que se proporcionan por VWF endógeno. En ciertas realizaciones, los fragmentos de VWF también pueden enmascarar uno o más sitios de unión de receptor de eliminación de FVIII, previniendo así la eliminación de FVIII por su propia vía de eliminación.

En otro aspecto, la proteína quimérica de la invención se puede usar para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado a una enfermedad de von Willebrand de tipo 2N (VWD). VWD de tipo 2N es un defecto cualitativo de VWF resultante de la unión defectuosa de VWF a FVIII y, por consiguiente, dando como resultado bajos niveles de FVIII circulante. Por tanto, la proteína quimérica de la invención por unión a o uniéndose a la proteína FVIII no solo estabiliza la proteína FVIII, sino que también previene la eliminación de la proteína FVIII de la circulación.

En algunas realizaciones, la prevención o inhibición de la unión de una proteína FVIII a VWF endógeno por el fragmento de VWF o proteína quimérica puede ser *in vitro* o *in vivo*.

También se proporciona un método de aumento de la semivida de una proteína FVIII que comprende administrar el fragmento de VWF o la proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF y una proteína FVIII a un sujeto en necesidad del mismo. La semivida de FVIII no activado unido o asociado a VWF de longitud completa es aproximadamente 12 a 14 horas en plasma. En VWD tipo 3, en donde casi no existe VWF en circulación, la semivida de FVIII es solo aproximadamente seis horas, que conduce a síntomas de hemofilia A de leve a moderada en dichos pacientes debido a las reducidas concentraciones de FVIII. La semivida de la proteína FVIII unida o asociada al fragmento de VWF de la presente invención puede aumentar al menos aproximadamente 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2,0 veces, 2,1 veces, 2,2 veces, 2,3 veces, 2,4 veces, 2,6 veces, 2,7 veces, 2,8 veces, 2,9 veces, 3,0 veces, 3,1 veces, 3,2 veces, 3,3 veces, 3,4 veces, 3,5 veces, 3,6 veces, 3,7 veces, 3,8 veces, 3,9 veces, o 4,0 veces más que la semivida de FVIII no activado unido o asociado a VWF de longitud completa. En una realización, la semivida de la proteína FVIII unida o asociada al fragmento de VWF en la proteína quimérica aumenta al menos aproximadamente 2 veces, 2,5 veces, 3,0 veces, 3,5 veces, 4,0 veces, 4,5 veces, 5,0 veces, 5,5 veces, 6,0 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, o 10 veces más que la semivida de FVIII no activado unido o asociado a VWF de longitud completa. En otra realización, la semivida de la proteína FVIII unida o asociada al fragmento de VWF en la proteína quimérica aumenta aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 5 a aproximadamente 15 veces, aproximadamente 10 a aproximadamente 20 veces, aproximadamente 15 a aproximadamente 25 veces, aproximadamente 20 a aproximadamente 30 veces, aproximadamente 25 a aproximadamente 35 veces, aproximadamente 30 a aproximadamente 40 veces, aproximadamente 35 a aproximadamente 45 veces más que la semivida del FVIII no activado unido o asociado a VWF de longitud completa. En una realización específica, la semivida de la proteína FVIII unida o asociada al fragmento de VWF en la proteína quimérica aumenta al menos aproximadamente 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 veces más que la semivida del FVIII no mutante en un ratón con inactivación doble de FVIII y VWF. En algunas realizaciones, la semivida de la proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF fusionado con un primer resto heterólogo, por ejemplo, una primera región Fc, y una proteína FVIII unida a un segundo resto heterólogo, por ejemplo, una segunda región Fc, es más larga que la semivida de una proteína quimérica que comprende una proteína FVIII y dos regiones Fc, en donde la proteína FVIII se une a una de las dos regiones Fc (es decir, híbrido monómero-dímero de FVIII). En otras realizaciones, la semivida de la proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF fusionado con un primer resto heterólogo, por ejemplo, una primera región Fc, y una proteína FVIII unida a un segundo resto heterólogo, por ejemplo, una segunda región Fc, es al menos aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3,5 veces, 3,6 veces, 3,7 veces, 3,8 veces, 3,9 veces, 4,0 veces, 4,5 veces, o 5,0 veces la semivida de una proteína quimérica que comprende una proteína FVIII y dos regiones Fc, en donde la proteína FVIII se une a una de las dos regiones Fc (es decir, híbrido monómero-dímero de FVIII).

En algunas realizaciones, como resultado de la invención, la semivida de la proteína FVIII se prolonga en comparación con una proteína FVIII sin el fragmento de VWF o FVIII no mutante. La semivida de la proteína FVIII es al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, o al menos aproximadamente 12 veces más larga que la semivida de una proteína FVIII sin el fragmento de VWF. En una realización, la semivida de FVIII es aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 20 veces, aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 15 veces, o aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 10 veces más larga que la semivida de FVIII no mutante. En otra realización, la semivida de FVIII se prolonga aproximadamente 2 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 3 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 7 veces, o aproximadamente 6 veces a aproximadamente 8

5 veces en comparación con FVIII no mutante o una proteína FVIII sin el fragmento de VWF. En otras realizaciones, la semivida de FVIII es al menos aproximadamente 17 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 19 horas, al menos aproximadamente 20 horas, al menos aproximadamente 21 horas, al menos aproximadamente 22 horas, al menos aproximadamente 23 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 25 horas, al menos aproximadamente 26 horas, al menos aproximadamente 27 horas, al menos aproximadamente 28 horas, al menos aproximadamente 29 horas, al menos aproximadamente 30 horas, al menos aproximadamente 31 horas, al menos aproximadamente 32 horas, al menos aproximadamente 33 horas, al menos aproximadamente 34 horas, al menos aproximadamente 35 horas, al menos aproximadamente 36 horas, al menos aproximadamente 48 horas, al menos aproximadamente 60 horas, al menos aproximadamente 72 horas, al menos aproximadamente 84 horas, al menos aproximadamente 96 horas, o al menos aproximadamente 108 horas. En otras realizaciones más, la semivida de FVIII es aproximadamente 15 horas a aproximadamente dos semanas, aproximadamente 16 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 17 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 18 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 19 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 20 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 21 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 22 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 23 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 24 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 36 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 48 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 60 horas a aproximadamente una semana, aproximadamente 24 horas a aproximadamente seis días, aproximadamente 24 horas a aproximadamente cinco días, aproximadamente 24 horas a aproximadamente cuatro días, aproximadamente 24 horas a aproximadamente tres días, o aproximadamente 24 horas a aproximadamente dos días.

25 En algunas realizaciones, la semivida promedio de la proteína FVIII por sujeto es aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas (1 día), aproximadamente 25 horas, aproximadamente 26 horas, aproximadamente 27 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 29 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 33 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 44 horas, aproximadamente 48 horas (2 días), aproximadamente 54 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas (3 días), aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas (4 días), aproximadamente 108 horas, aproximadamente 120 horas (5 días), aproximadamente seis días, aproximadamente siete días (una semana), aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, o aproximadamente 14 días.

35 En una realización específica, una semivida de la proteína quimérica de la invención es aproximadamente dos veces más larga que la semivida de FVIII no mutante o BDD FVIII. En otra realización, una semivida de la proteína quimérica es aproximadamente tres veces más larga que la semivida de FVIII no mutante o BDD FVIII.

40 Además, la divulgación proporciona un método de tratamiento o prevención de una enfermedad hemorrágica o trastorno que comprende administrar una cantidad eficaz del fragmento de VWF o la proteína quimérica (por ejemplo, una proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF unido a un primer resto heterólogo, por ejemplo, una primera región Fc, y una proteína FVIII unida a un segundo resto heterólogo, por ejemplo, una segunda región Fc, en donde el fragmento de VWF se une o asocia a la proteína FVIII). En un caso, la enfermedad hemorrágica o trastorno se selecciona del grupo que consiste en un trastorno hemorrágico de la coagulación, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia dentro de los músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo craneal, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de huesos, sangrado del sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal y sangrado en la vaina del iliopsoas. En un caso específico, la enfermedad hemorrágica o trastorno es hemofilia A.

50 El fragmento de VWF y la proteína quimérica que comprende un resto auxiliar, por ejemplo, el fragmento de VWF descrito en el presente documento y una proteína FVIII preparada por la invención, tienen muchos usos, como se reconocerá por un experto en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, métodos de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno hemostático y métodos de tratamiento de un sujeto en necesidad de un agente hemostático general. En un caso, la divulgación se refiere a un método de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno hemostático que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del fragmento de VWF o la proteína quimérica.

55 La porción de proteína FVIII en la proteína quimérica trata o previene un trastorno hemostático que sirve de cofactor para el factor IX sobre una superficie de fosfolípido negativamente cargada, formando así un complejo de Xasa. La unión de factores de coagulación activados a una superficie de fosfolípido localiza este proceso en sitios de daño vascular. Sobre una superficie de fosfolípido, el factor VIIIa aumenta la máxima velocidad de activación del factor X por el factor IXa, en aproximadamente 200.000 veces, que conduce a la gran segunda explosión de generación de trombina.

60

Se puede usar la proteína quimérica que comprende un resto auxiliar, por ejemplo, un fragmento de VWF, y una proteína FVIII para tratar cualquier trastorno hemostático. Los trastornos hemostáticos que se pueden tratar por la administración de la proteína quimérica de la invención incluyen, pero no se limitan a, hemofilia A, así como deficiencias o anomalías estructurales relacionadas con el factor VIII. En un caso, el trastorno hemostático es hemofilia A.

Se puede usar profilácticamente la proteína quimérica que comprende un resto auxiliar, por ejemplo, un fragmento de VWF, y una proteína FVIII para tratar un sujeto con un trastorno hemostático. La proteína quimérica de la invención se puede usar para tratar un episodio de sangrado agudo en un sujeto con un trastorno hemostático. En otro caso, el trastorno hemostático puede ser el resultado de un factor de coagulación defectuoso, por ejemplo, factor de von Willebrand. En un caso, el trastorno hemostático es un trastorno heredado. En otro caso, el trastorno hemostático es un trastorno adquirido. El trastorno adquirido puede resultar de una enfermedad o afección secundaria subyacente. La condición sin relacionar puede ser, como un ejemplo, pero no como una limitación, cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, o embarazo. El trastorno adquirido puede resultar de vejez o de medicación para tratar un trastorno secundario subyacente (por ejemplo, quimioterapia para el cáncer).

La divulgación también se refiere a métodos de tratamiento de un sujeto que no tiene un trastorno hemostático congénito, pero tiene una enfermedad o afección secundaria que da como resultado la adquisición de un trastorno hemostático, por ejemplo, debido al desarrollo de un anticuerpo anti-FVIII o una cirugía. La divulgación se refiere así a un método de tratamiento de un sujeto en necesidad de un agente hemostático general que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF y una proteína FVIII preparada por los presentes métodos.

La presente divulgación también está relacionada con métodos de reducción de la inmunogenicidad de FVIII o inducción de menos inmunogenicidad contra FVIII que comprenden administrar una cantidad eficaz del fragmento de VWF, las proteínas quiméricas descritas en el presente documento, o los polinucleótidos que las codifican.

En un caso, el sujeto en necesidad de un agente hemostático general está sometiéndose, o está a punto de someterse, a cirugía. La proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF y una proteína FVIII se puede administrar antes de, durante, o después de cirugía como pauta profiláctica. La proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF y una proteína FVIII se puede administrar antes de, durante, o después de la cirugía para controlar un episodio de sangrado agudo.

Se puede usar la proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF y una proteína FVIII para tratar un sujeto que tiene un episodio de sangrado agudo que no tiene un trastorno hemostático. El episodio de sangrado agudo puede resultar de traumatismo severo, por ejemplo, cirugía, un accidente de coche, herida, laceración, disparo, o cualquier otro acontecimiento traumático que da como resultado el sangrado incontrolado. Los ejemplos no limitantes de episodios de sangrado incluyen un trastorno hemorrágico de la coagulación, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia dentro de los músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo craneal, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de huesos, sangrado del sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, sangrado en la vaina del iliopsoas, y cualquier combinación de los mismos.

En aplicaciones profilácticas, se administran una o más composiciones que contienen la proteína quimérica de la invención o una mezcla de la misma a un paciente que ya no está en el estado de enfermedad para potenciar la resistencia del paciente o reducir los síntomas asociados a una enfermedad o trastorno. Dicha cantidad se define como que es una "dosis eficaz profiláctica". En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta (por ejemplo, desde aproximadamente 1 hasta 400 mg/kg de polipéptido por dosis, siendo las dosificaciones de desde 5 hasta 25 mg las más comúnmente usadas para radioinmunoconjugados y dosis más altas para polipéptidos modificados con citotoxina-fármaco) a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de enfermedad. A partir de aquí, el paciente se puede administrar con un régimen profiláctico.

En algunos casos, se usa una proteína quimérica, un fragmento de VWF, o una composición de la divulgación, para el tratamiento a demanda, que incluye tratamiento para un episodio de sangrado, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia dentro de los músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo craneal (traumatismo craneoencefálico), sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de huesos, sangrado del sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, o sangrado en la vaina del iliopsoas. El sujeto puede estar en necesidad de profilaxis quirúrgica, tratamiento perioperatorio, o tratamiento para cirugía. Dichas cirugías incluyen, por ejemplo, cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo total de rodilla, craneotomía, osteosíntesis, cirugía para traumatismo, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, o cirugía de reemplazo articular.

En un caso, la proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF y una proteína FVIII se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intramuscular, o por cualquier superficie mucosa, por ejemplo, por vía oral, por vía sublingual, por vía bucal, por vía nasal, por vía rectal, por vía vaginal o por vía pulmonar. La proteína

quimérica que comprende el fragmento de VWF y una proteína FVIII se puede implantar dentro de o unir a un soporte sólido de biopolímero que permite la lenta liberación de la proteína quimérica al sitio de sangrado o implantarse en venda/apósito. La dosis de la proteína quimérica que comprende el fragmento de VWF y una proteína FVIII variará dependiendo del sujeto y de la vía de administración particular usada. Las dosificaciones pueden variar desde 0,1 hasta 100.000 µg/kg de peso corporal. En un caso, el intervalo de dosis es 0,1-1.000 µg/kg. En otro caso, el intervalo de dosis es 0,1-500 µg/kg. La proteína se puede administrar continuamente o en intervalos de tiempo especificados. Se pueden emplear ensayos *in vitro* para determinar intervalos de dosis óptima y/o programas para administración. Se conocen en la técnica ensayos *in vitro* que miden la actividad del factor de coagulación, por ejemplo, ensayo de coagulación STA-CLOT VIIa-rTF o ensayo de coagulación ROTEM. Además, se pueden extrapolar dosis eficaces de las curvas de dosis-respuesta obtenidas de modelos animales, por ejemplo, un perro hemofílico (Mount et al. 2002, Blood 99(8):2670).

Habiendo ahora descrito la presente invención con detalle, lo mismo será más claramente entendido por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen con la presente para los fines de ilustración solo y no pretenden ser limitantes de la invención.

15 Ejemplos

En todos los ejemplos, se usaron los siguientes materiales y métodos, a menos que se establezca de otro modo.

Materiales y métodos

En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biofísica, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología de anticuerpos), y técnicas convencionales en electroforesis. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., CS.H.L. Press, Pub. (1999); y Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992).

Ejemplo 1: Clonación de diferentes dominios de VWF (Figura 1)

(a) Clonación de pSYN-VWF-001, 002, 003 y 004

pSYN-VWF-001 a 004 contienen secuencias de nucleótidos que codifican fragmentos de VWF, que son los aminoácidos 1-276 (001), aminoácidos 1-477 (002), aminoácidos 1-511 (003) y aminoácidos 1-716 (004) de la secuencia de proteínas VWF-D'D3A. La numeración de aminoácidos representa la secuencia de VWF maduro sin propéptido y corresponde a los aminoácidos 764-1039 (001), aminoácidos 764-1240 (002), aminoácidos 764-1274 (003) y aminoácidos 764-1479 (004) de SEQ ID NO: 2, respectivamente. Las cuatro construcciones tienen el péptido señal de FVIII en el extremo N, que permite la apropiada secreción de la proteína sintetizada y seguido por una marca 6xHis en el extremo C, que se usa para la purificación de proteínas. Las construcciones anteriores se sintetizaron usando las siguientes combinaciones de cebadores:

pSYN VWF- 001:

ESC48- Fwd - VWF-D'D3 con señal de VIII y sitio BsiW1

TGCGGACGTACGGCCGCCACCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGC
CTTTTGCGATTCTGCTTTAGCCTATCCTGTTCGGCCCCCATG (SEQ ID NO: 57)

ESC50- Rev- VWF- D'D3 parcial (1-276 aminoácidos) con 6 His y sitio Not1

TGACCTCGAGCGGCCGCTCAGTGGTGATGGTGATGATGCAGAGGCACCTTTCTGGTG
TCAGCACACTG (SEQ ID NO: 58)

pSYN VWF- 002:

ESC48- Fwd - VWF-D'D3 con señal de VIII y sitio BsiW1

TGCGGACGTACGGCCGCCACCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGC
CTTTTGCGATTCTGCTTTAGCCTATCCTGTTCGGCCCCCATG (SEQ ID NO: 59)

ESC51- Rev- VWF D'D3 (1-477 aminoácidos) con 6His y sitio Not 1

TGACCTCGAGCGGCCGCTCAGTGGTGATGGTGATGATGCAGGCTCCTGGCAGGCTTCA
CAGGTGAGGTTGACAAC (SEQ ID NO: 60)

pSYN VWF- 003:

ESC48- Fwd - VWF-D'D3 con señal de VIII y sitio BsiW1

TCGCGACGTACGGCCGCCACCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGC
CTTTTGGCATTCTGCTTTAGCCTATCCTGTGCGGCCCCCATG (SEQ ID NO: 61)

ESC52- Rev-VWF-D'D3 A1 parcial (1-511 aminoácidos) con 6His y sitio Not1

TGACCTCGAGCGGCGGCTCAGTGGTGTGATGGTGTGATGCCTGCTGCAGTAGAAATCG
TGCAACGGCGGTTC (SEQ ID NO: 62)

5

pSYN VWF- 004:

ESC48- Fwd - VWF-D'D3 con señal de VIII y sitio BsiW1

TCGCGACGTACGGCCGCCACCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGC
CTTTTGGCATTCTGCTTTAGCCTATCCTGTGCGGCCCCCATG (SEQ ID NO:63)

ESC53-Rev- VWF-D'D3A1 (1-716 aminoácidos) con 6His y sitio Not1

TGACCTCGAGCGGCGGCTCAGTGGTGTGATGGTGTGATGGCCACAGTGACTTGTGCC
ATGTGGGG (SEQ ID NO: 64)

10

Se supone que las proteínas de las construcciones VWF-001, 002, 003 y 004 existen como un monómero.

Se llevó a cabo una reacción de PCR de 50 µL con las combinaciones de cebadores ESC48/ESC50, ESC48/ESC 51, ESC48/ESC52, ESC48/ESC53 y el plásmido de VWF de longitud completa como molde, usando el ciclo de amplificación por PCR de 2 etapas: 94 °C 2 minutos; 21 ciclos de (96 °C 30 segundos, 68 °C 2 minuto). Se purificaron en gel las bandas de tamaño correcto (~960 pb para VWF 001; 1460 para VWF 002, 1520 pb para VWF 003; y 2150 pb para VWF 004) con un kit de extracción de gel (Qiagen, Valencia, Calif.) y se clonaron en los sitios de restricción BsiW1 y Not1 de pcDNA 4 para generar pSYN-VWF 001, 002, 003 y 004, respectivamente.

15

(b) Clonación de pSYN-VWF-006

pSYN-VWF-006 contiene el dominio D1D2D'3-CK (nudo de cisteína) de VWF. Para clonar esta construcción, se subcontrató la síntesis del fragmento de ADN que contenía una porción de dominio D3 y dominio CK (número de ID de secuencia de Genscript 122026, mostrada a continuación). Se subclonó un fragmento de construcción de Genscript en pSYN-VWF 008 digerido con BamH1/EcoRV, es decir, el vector que codifica VWF de longitud completa.

20

Número de secuencia de Genscript 122026 (SEQ ID NO: 65)

GGATCCTAGTGGGGAATAAGGGATGCAGCCACCCCTCAGTGAAATGCAAGAAACGGGTACCATCTGGTGG
AGGGAGGAGAGATTGAGCTGTTTGACGGGGAGGTGAATGTGAAGAGGCCATGAAGGATGAGACTCACTTTG
AGGTGGTGGAGTCTGGCCGGTACATCATCTGCTGCTGGGCAAAGCCCTCCCGTGGTCTGGGACCGCCACC
TGAGCATCTCCGTGGTCTGAAGCAGACATACCAGGAGAAAGTGTGTGGCCTGTGTGGGAATTTTGATGGCA
TCCAGAACAATGACCTCACCAGCAGCAACCTCCAAGTGGAGGAAGACCCGTGGACTTTGGGAACCTCGGA
AAGTGAGCTCGCAGTGTGCTGACACCAGAAAAGTGCCCTCTGGACTCATCCCTGCCACCTGCCATAACAACA
TCATGAAGCAGACGATGGTGGATTCTCCTGTAGAATCCTTACCAGTGACGCTTCCAGGACTGCAACAAGC
TGGTGGACCCCGAGCCATATCTGGATGTCTGCATTTACGACACCTGCTCCTGTGAGTCCATTGGGGACTGCG
CCTGCTTCTGCGACACCAATTGCTGCCTATGCCACGCTGTGTGCCAGCATGGCAAGGTGGTGGTGGAGGA
CGGCCACATTTGCCCCCAGAGCTGCGAGGAGAGGAATCTCCGGGAGAACGGGTATGAGTGTGAGTGGCGCT
ATAACAGCTGTGCACCTGCCTGTCAAGTCACGTGTGACACCCCTGAGCCACTGGCCCTGCCTGTGCAAGTGTG
TGGAGGGCTGCCATGCCACTGCCCTCCAGGGAAAATCCTGGATGAGCTTTTGCAGACCTGCGTTGACCCTG
AAGACTGTCCAGTGTGTGAGGTGGCTGGCCGGCGTTTTCCTCAGGAAAGAAAGTCACTTGAATCCCAGTG
ACCCTGAGCACTGCCAGATTTGCCACTGTGATGTGTCAACC TCACCTGTGAAGCCTGCCAGGAGCCGGGAG
GCCTGGTGGTGCCTCCACAGATGCCCGGTGAGCCCCACCACTCTGTATGTGGATGAGACGCTCCAGGATG
GCTGTGATACTCACTTCTGCAAGGTCAATGAGAGAGGAGAGTACTTCTGGGAGAAGAGGGTCCAGGCTGCC
CACCCCTTTGATGAACACAAGTGTCTTCTGCTGAGGGAGGTAAAAATTATGAAAATTCAGGCACCTGCTGTGACA
CATGTGAGGAGCCTGAGTGCAACGACATCACTGCCAGGCTGCAGTATGTCAAGGTGGGAAGCTGTAAGTCTG
AAGTAGAGGTGGATATC

25

(c) Clonación de pSYN-VWF-009, 010, 011, 012 y 013

La construcción pSYN VWF 008 contiene la secuencia de VWF de longitud completa en pcDNA 3.1 (aminoácidos 1-2813 de SEQ ID NO: 2). Incluye propéptido de 763 aminoácidos (es decir, dominios D1D2) seguido por la secuencia restante de 2050 aminoácidos de VWF maduro. pSYN-VWF-009, 010, 011 y 012 contienen las mismas secuencias

codificantes que VWF 001, 002, 003 y 004, respectivamente, pero además tiene dominios D1D2 (propéptido de VWF) en el extremo N en lugar del péptido señal de FVIII. pSYN-VWF- 008 tiene un sitio BamH1 en Arg907 y sitio Not1 en el extremo de la región codificante (después del codón de terminación). Se digirieron pSYN- VWF- 008, 001, 002, 003 y 004 con enzimas de restricción BamH1 y Not1. Se unieron los insertos de pSYN-VWF-001 (423 pb), pSYN- VWF-002 (1026 pb), pSYN-VWF- 003 (1128 pb) y pSYN-VWF-004 (1743 pb) en pSYN-VWF-008 (8242 pb) digerido con BamH1/Not1 para obtener pSYN-VWF-009 (D1D2D'D3: aminoácido 1-1039 de SEQ ID NO: 2); pSYN-VWF -010 (D1D2D'D3: aminoácido 1-1240 de SEQ ID NO: 2); pSYN-VWF-011 (D1D2D'D3: aminoácido 1-1274 de SEQ ID NO: 2); pSYN-VWF-012 (D1D2D'D3: aminoácido 1-1479). Las 4 construcciones tienen marca 6xHis en el extremo C. En células transfectadas, se sintetizan pSYN-VWF-009, 010, 011 y 012 con propéptido, pero debido al procesamiento intracelular, los productos secretados no contienen ningún propéptido (D1D2). La proteína expresada de la construcción de VWF-009 existe como un monómero y se supone que las proteínas expresadas de las construcciones VWF-010, 011 y 012 existen como dímeros, como se muestra en la Figura 6 y Figura 7 usando VWF-009 y VWF-010 como ejemplos, respectivamente.

Se usó pSYN-VWF-010 para generar pSYN-VWF-013, que tiene dos mutaciones puntuales en C336A y C379A correspondientes a SEQ ID NO: 73 (la numeración de aminoácidos representa la secuencia de VWF maduro sin dominio D1D2-VWF secuencia 2). Se predice que estas mutaciones previenen la dimerización del dominio D'D3 de VWF.

(d) Clonación de pSYN-VWF-025 y 029

pSYN-VWF-025 contiene secuencias de D1D2D'D3 no mutantes de VWF de longitud completa en el vector pLIVE mientras que pSYN-VWF-029 contiene dominios D1D2D'D3 con mutaciones C336A/C379A en el vector pLIVE. Para clonar pSYN-VWF-025 y 029, se usó la siguiente combinación de cebadores:

ESC 89-fwd con sitio Nhe1 = CTCACATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCCG (SEQ ID NO: 66)

ESC 91-rev con Sal1= CTGGATCCCGGGAGTCGACTCGTCAGTGGTGATGGTGATGATG (SEQ ID NO: 67)

Se llevó a cabo una reacción de PCR de 50 µL con combinaciones de cebadores ESC89/ESC91 y o plásmido pSYN-VWF-010 (para pSYN-VWF-025) o pSYN-VWF-013 (para pSYN-VWF-029) como molde usando el ciclo de amplificación por PCR de 3 etapas: 94 °C - 2 minutos; 21 ciclos de (96 °C - 30 segundos, 55 °C - 30 segundos, 68 °C - 4 minutos). Se purificó en gel la banda de tamaños esperados (~3800 pb) con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia, Calif.) y se clonó en los sitios de restricción Nhe1 y Sal1 del vector pLIVE-Mirus (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) para generar pSYN-VWF-025 y 029.

(e) Clonación de pSYN-VWF-031

pSYN-VWF-031 es una construcción de D1D2D'D3(C336A/C379A) -Fc que tiene un conector escindible de trombina de 48 aminoácidos de longitud (8x GGGGS (SEQ ID NO: 110) + sitio de trombina) entre VWF D1D2D'D3(C336A/C379A) y las secuencias de Fc. Para preparar esta construcción, se amplificó VWF-región Fc de la construcción pSYN-FVIII-064 (referir a la construcción FVIII-VWF a continuación). Se digirió pSYN-FVIII-VWF con Xba1 y Nhe1. Se usó la región de inserto resultante de 4165 pb, que contenía el fragmento de VWF y la región Fc como molde para amplificar VWF y la región Fc por combinaciones de cebadores LW 22/LW23.

LW 22-FWD-VWF-D'D3 con la secuencia señal de FVIII y sitio BsiW1

GCGCCGGCCGTACGATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGC

GATTCTGCTTTAGCCTATCCTGTGCGCCCCCATG (SEQ ID NO: 68)

LW 23-Rev- Fc con codón de terminación y sitio Not1

TCATCAATGTATCTTATCATGTCTGAATTCGCGGCCGCTCATTTACC (SEQ ID NO: 69)

Secuencia de nucleótidos de VWF 031 (SEQ ID NO: 108)

ES 2 753 124 T3

```

1   ATGATTCTCG CCAGATTTCG CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTC
51  GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACTCG CGGCAGGTCA FCCACGGCCC
101 GATGCAGCCT TTTCGGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG
151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA
201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC
251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTTTGACA TCCATTTGTT TGTCAATGGT
301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG
351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTAATA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT
401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCTCTGTC
451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT
501 CTTTGTGAA  GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC
551 CTTATGACTT TGCCAATCA  TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT
601 GAACGGGCAT CTCTCCCGAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT
651 GCAGAGGGC  CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT
701 TTGCCCGCTG CCACCCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCTCTGTC
751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCCTGC
801 CCTCCTGGAG TACGCCCGGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG
851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCAG  TGTGCCCTGC TGGTATGAG
901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT
951 CAATGAAATG TGTGAGGAGC GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG
1001 GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC
1051 GTGCATTCG  GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG
1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT
1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTC ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC
1201 AACAGATACT TCACCTTTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCGGGA
1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG
1301 ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCTGGC
1351 CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA
1401 TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC
1451 ATACAGTGAC GGCTCCGTG  CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
1501 GACTGGGATG GCGCGGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC
1551 CGGGAAGACC TCGGCCTGT  GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG
1601 ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCGGAGC CCCGGGTGGA GGACTTCGGG
1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGACTGCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG
1701 CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT
1751 GCGCGGTCTT GACGTCCCC  ACATTCGAGG CCTGCCATCG TGCCGTGAGC
1801 CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA
1851 CGGCCCGGAG TGCTGTGCG  GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCCTGCG
1901 CGGGGAGAGG CGTGCAGGTC GCGTGGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG
1951 AACTGCCCGA AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TCGGGGACCC CCTGCAACCT
2001 GACCTGCCGC TCTCTCTTT  ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCTGCC
2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC

```

ES 2 753 124 T3

2101 TCGGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA
 2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG
 2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCGTGAC
 2251 GCTGTCCCTCA GCAGTCCCCCT GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCCTG
 2301 TCGGCCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG
 2351 AAGGGCTCGA GTGTACCAAA ACGTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG
 2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCCTGTC CCCCCGGGCA TGGTCCGGCA
 2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA
 2501 AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC
 2551 TGTCCGGACC GGAAGTGGAA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG
 2601 CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTGACGGG CTCAAATACC
 2651 TGTTCCTCGG GGAGTGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT
 2701 AACCTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC
 2751 CTCAGTGAAG TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA
 2801 TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG
 2851 ACTCACTTTG AGGTGGTGGG GTCTGGCCGG TACATCATTG GACTGCTGGG
 2901 CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC
 2951 TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGTAT
 3001 GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA
 3051 CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA
 3101 CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC
 3151 ATGAAGCAGA CGATGGTGGG TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGAGCT
 3201 CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT
 3251 GCATTTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCGCATTC
 3301 TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCCACGTG TGTGCCCAGC ATGGCAAGGT
 3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA
 3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGGCTGAGT GGCCTATAA CAGCTGTGCA
 3451 CCTGCCGTGC AAGTACCGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT
 3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG
 3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG
 3601 GTGGCTGGCC GCGTTTTTCG CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCCAG
 3651 TGACCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT
 3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG ATATCTGGCG GTGGAGGTTT CCGTGGCGGG
 3751 GGATCCGGCG GTGGAGGTTT CCGCGGTGGA GGTTCGGTG GCGGGGGATC
 3801 CCGTGGCGGG GGATCCCTGG TCCCCCGGG CAGCGCGGT GGAGGTTCCG
 3851 GTGGCGGGGG ATCCGACAAA ACTCACACAT GCCCACCGTG CCCAGCTCCA
 3901 GAATCCTGG GCGGACCGTC AGTCTTCCTC TTCCCCCAA AACCCAAGGA
 3951 CACCCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACATGCGTG GTGGTGGACG
 4001 TGAGCCACGA AGACCCTGAG GTCAAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG
 4051 GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT ACAACAGCAC
 4101 GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCCTCCT GCACCAGGAC TGGCTGAATG
 4151 GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGCCCTCCC AGCCCCATC
 4201 GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG CCCCAGAAC CACAGGTGTA
 4251 CACCCTGCCC CCATCCCGGG ATGAGCTGAC CAAGAACCAG GTCAGCTGA
 4301 CCTGCCCTGGT CAAAGGCTTC TATCCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG
 4351 AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCGTGTGGA
 4401 CTCCGACGGC TCCTTCTTCC TCTACAGCAA GCTCACCGTG GACAAGAGCA
 4451 GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA TGAGGCTCTG
 4501 CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCCGG GTAAATGA

ES 2 753 124 T3

Secuencia de proteínas de VWF 031 (SEQ ID NO: 109)

```

1   MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFNVTDFGSM
51  YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DSGSNFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC

251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTECPC
351 VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLEV TGQSHFKSFD
401 NRYPFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIVETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451 LHNSLVKCLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGDG RIQHTVTASV RLSYGEDLQM
501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTSPG LAEPRVEDFG
551 NAWKLGDCQ DLQKQHSDFC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL
651 NCPKQVYVYQ CGTFCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701 CVPKQPCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGEQ YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKRPMKDE
951 THFEVVESEGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCB CESIGDCAAF
1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGGGGSGGG
1251 GSGGGSGGG GSGGGSGGG GSLVPRGSGG GSGGGGSDK THTCPPCPAP
1301 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
1351 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI
1401 EKTISKAKGQ PREPQVYVTL PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
1451 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
1501 HNHYTQKSL SPSGK*

```

Construcción de ADN	Conector entre VWF y Fc
VWF035	73 aa= IS {11X(GGGGS)} LVPRGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 96)
VWF036	98 aa= IS {16X(GGGGS)} LVPRGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 97)
VWF= D'D3 (1-477 aa con C336A/C379A)	

- 5 Se clonó el producto de PCR obtenido de la amplificación de LW22/LW23 (~2300 pb) en pSYN-VWF-002 digerido con BsiW1/Not1 para obtener el producto intermedio pSYN-VWF-014. pSYN-VWF-014 contiene el péptido señal de FVIII-D'D3-conector escindible de trombina de 20 aminoácidos seguido por la región Fc.

Para generar la construcción de D1D2D'D3-Fc, se amplificó la región D1D2D'D3 de pSYN-VWF-013 usando la combinación de cebadores LW24/LW27 por el método de PCR estándar.

- 10 Oligonucleótido de clonación LW24- Fwd- VWF D1D2D'D3 con sitio BsiW1
GCGCCGCGCGTACGATGATTCTGCCAGATTTGCCGGGGTG (SEQ ID NO: 70)
Oligonucleótido LW27-Rev-VWF D'D3 con EcoRV
CCACCGCCAGATATCGGCTCCTGGCAGGCTTACAGGTGAG (SEQ ID NO: 71)

- 15 Se clonó el producto de PCR obtenido de la amplificación de LW22/LW23 (~3750 pb) en pSYN-VWF-014 digerido con BsiW1/EcoRV para obtener el producto intermedio pSYN-VWF-015. Se cambió la longitud de conector entre el fragmento de VWF y la región Fc para obtener pSYN-VWF-031.

Se muestra la secuencia de proteínas de VWF de longitud completa en la Tabla 1.

Secuencia de proteínas 1b de VWF-D1D2D'D3 (SEQ ID NO: 72)

```

1     MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
51    YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101   TVTQGDQQRVS MPYASKGLYL ETEAGYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
151   SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
201   ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
251   EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME
301   YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTECPC
351   VHS GKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
401   NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIVTV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451   LHNSLVKLVK GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQ M
501   DWDGRGRLLV KLSFVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTSPG LAEPRVEDFG
551   NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
601   PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPRGREL
651   NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701   CVPKACQPCY YDGEIFQPED IFS DHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
751   AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
801   SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
851   CRDRKWNCTD HVC DATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
901   NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKRPMDDE
951   THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
1001  GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
1051  MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS CESIGDCACF
1101  CDTIAAYAHV CAQHGVVTV RTATLCPQSC EERNLRENGY ECEWRYN SCA
1151  PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
1201  VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP*
    
```

Secuencia de proteínas 2 de VWF-D'D3 (SEQ ID NO: 73)

```

1     SLSCRPPMVK LVC PADNLRA EGLECTKTCQ NYDLECMSMG CVSGCLCPPG
51    MVRHENRCVA LERCPCFHQG KEYAPGETVK IGCNTCVCRD RKWNCTDHVC
101   DATCSTIGMA HYLTFDGLKY LFPGECQYVL VQDYCGSNPG TFRILVGNKG
151   CSHPSVKCKK RVTILVEGGE IELFDGEVNV KRPMKDETHF EVVESGRYII
201   LLLGKALS VV WDRHLSISVV LKQTYQEKVC GLCGNFDGIQ NNDLTSSNLQ
251   VEEDPVDFGN SWKVSQCAD TRKVPDSSP ATCHNNIMKQ TMVDS SCRIL
301   TSDVFDQCNK LVDPEPYLDV CIYDTCS CES IGDCACFCDT IAAYAHVCAQ
351   HGKVVTWRTA TLC PQSCEER NLRENGYECE WRYNSCAPAC QVTCQHPEPL
401   ACPVQCVEGC HAHCPGKIL DELLQTCVDF EDCPVCEVAG RRFASGKKVT
451   LNP SDPEHCQ ICHCDV VNL TCEACQEP
    
```

5 **Ejemplo 2: Construcciones heterodiméricas que comprenden FVIII-Fc y VWF-dominio D'D3 en el extremo amino de la segunda cadena de Fc (heterodímero de FVIII-VWF-Fc, Figura 2)**

(a) Clonación de pSYN-FVIII-064

10 El plásmido FVIII-064 comprende un armazón de Fc de cadena sencilla (scFc) con sitios de escisión enzimática que se procesan durante la síntesis en una célula. La construcción tiene un dominio de unión de FVIII de VWF de longitud completa (D'D3).

15 Se diseñó el plásmido (pSYN-FVIII-064) para la expresión del heterodímero FVIII-Fc y VWF-Fc, donde los dominios D'D3 se unen a FVIII y previene la interacción de FVIII con fosfolípidos y proteína C activada y/o previene o inhibe la unión a VWF endógeno. La proteína de pSYN-FVIII-064 se expresa en la célula como un polipéptido individual donde el extremo C de la subunidad de FVIII-Fc se une al extremo N de la subunidad de VWF D'D3-Fc por un conector polipeptídico 6x (GGGGS) (SEQ ID NO: 74). Además, se insertaron secuencias de RRRRS (SEQ ID NO: 75) y RKRRKR (SEQ ID NO: 76) en el extremo 5' y 3' del conector polipeptídico, respectivamente, para escisión intracelular por proteasas convertidas tras la última Arg en cada secuencia. Por tanto, las células pueden expresar una heterodímero FVIII-Fc/D'D3-Fc de cadena doble donde la cadena de FVIII-Fc tiene una secuencia RRRRS (SEQ ID NO: 75) en el extremo C, pero se ha retirado el resto de la secuencia conectora. Se introduce otro conector polipeptídico 3x (GGGGS) (SEQ ID NO: 28) junto con un sitio de escisión de trombina entre los dominios de VWF y la región Fc para facilitar la liberación del fragmento de VWF de FVIII una vez se activa la proteína heterodimérica FVIII-VWF por trombina permitiendo la interacción de FVIII con otros factores de coagulación.

25 Se encargó la síntesis de los fragmentos de ADN que contienen una porción de la primera región Fc seguida por 6x (GGGGS) (SEQ ID NO: 74), VWF-dominio D'D3 (1-477 aa; mutación C336A/C379A), 3x (GGGGS) (SEQ ID NO: 28), el sitio de escisión de trombina y una porción de la segunda Fc (número de secuencia de Genscript 103069, mostrada a continuación). Se subclonó un fragmento de construcción de Genscript en pSYN-FVIII-049 digerida con Sall/RsrII, que es la construcción FVIII-Fc con un conector escindible entre dos dominios Fc.

Número de secuencia de Genscript 103069 (SEQ ID NO: 82):

```
CCGTCGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
ACTACACGCAGAAAGACCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAACGGCGCCGCGGAGCGGTGGCGGGATCAGGTG
GGGGTGGATCAGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGGGGTGGATCAA
GGAAGAGGAGGAAGAGAAGCCTATCCTGTTCGGCCCCCATGGTCAAGCTGGTGTGTCCCGCTGACAACTGC

GGGCTGAAGGGCTCGAGTGTACCAAAACGTGCCAGAATATGACCTGGAGTGCATGAGCATGGGCTGTGTCT
CTGGCTGCCCTTGCCCCCGGGCATGGTCCGGCATGAGAATCGATGTGTGGCCCTGGAAAGGTGTCCCTGCT
TCCATCAGGGCAAGGAGTATGCCCTGGAGAAACAGTGAAGATTGGCTGCAACACTTGTGTGTGTGGGACC
GGAAGTGGAACTGCACAGACCATGTGTGTGATGCCACGTGCTCCACGATCGGCATGGCCACTACCTCACCT
TCGACGGGCTCAAATACCTGTTCGGGGAGTGCCAGTACGTTCTGGTGCAGGATTACTGCGGCAGTAACC
CTGGGACCTTTCGGATCCTAGTGGGGAATAAGGGATGCAGCCACCCCTCAGTGAATGCAAGAAACGGGTCA
CCATCCTGGTGGAGGGAGGAGATTGAGCTGTTTGACGGGGAGGTGAATGTGAAGAGGCCCATGAAGGATG
AGACTCACTTTGAGGTGGTGGAGTCTGGCCGGTACATCATTC TGTGCTGGCAAAGCCCTCTCCGTGGTCT
GGGACCGCCACCTGAGCATCTCCGTGGTCTGAAAGCAGACATAACCAGGAGAAAGTGTGTGGCCTGTGTGGGA
ATTTTGTATGGCATCCAGAAACAATGACCTCACCAGCAGCAACC TCCAAGTGGAGGAAGACCCTGTGGACTTTG
GGAACCTCTGGAAAGTGAAGCTCGCAGTGTGCTGACACCAGAAAAGTGCCTCTGGACTCATCCCTGCCACCT
GCCATAACAACATCATGAAGCAGACGATGGTGGATTCTCTGTAGAAATCCTTACCAGTGACGCTCTTCCAGG
ACTGCAACAAGCTGGTGGACCCCGAGCCATATCTGGATGCTGCATTTACGACACCTGCTCCTGTGAGTCCA
TTGGGGACTGCGCCGCATTCTGCGACACCATTTGCTGCCTATGCCACGTTGTGTGCCAGCATGGCAAGGTGG
TGACCTGGAGGACGGCCACATTGTGCCCCAGAGCTGCGAGGAGAGGAATCTCCGGGAGAACGGGTATGAGG
CTGAGTGGCCCTATAACAGCTGTGCACCTGCCTGTCAAGTCAAGTGTGACGACCCCTGAGCCACTGGCCTGCC
CTGTGCAGTGTGTGGAGGGCTGCCATGCCACTGCCCTCCAGGAAAATCCTGGATGAGCTTTTGCAGACCT
CGTTGACCTGAAGACTGTCCAGTGTGTGAGGTGGCTGGCCGGCGTTTTGCCTCAGGAAAGAAAGTCACT
TGAATCCCAGTGACCTGAGCACTGCCAGATTTGCCACTGTGATGTTGTCAACCTCACCTGTGAAGCCTGCC
AGGAGCCGATCGATGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGGATCCCTGGTCCCCCGGGGAGCGGAGGCGACA
AAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCTCCAGAACTCCTGGCGGACCGTCA
```

(b) Clonación de pSYN-FVIII-065

- 5 El plásmido FVIII-065 comprende los primeros 276 aminoácidos del dominio D'D3 de VWF unido a una segunda región Fc. Se amplificó por PCR el fragmento de VWF del plásmido de VWF de longitud completa pSYN-VWF-008 usando las combinaciones de cebadores ESC17 y ESC41.

Oligonucleótido de clonación ESC17-Fwd- VWF con Cla1

GTCCGGCATGAGAATCGATGTGTG (SEQ ID NO: 77)

- 10 ESC41- Rev-VWF con EcoRV

CCTCCACCGCCAGATATCAGAGGCACTTTTC (SEQ ID NO: 78)

Se purificó en gel la banda de tamaño esperado (~692 pb) con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia, Calif.) y se clonó en los sitios Cla1 y EcoRV de pSYN-FVIII-064 para generar pSYN-FVIII-065.

Ejemplo 3: Clonación de pSYN-FVIII-159, 160, 178, 179 (Figura 3)

- 15 Para variar la longitud de conector entre el fragmento de VWF y la región Fc, se introdujo un sitio EcoRV en el empalme de VWF y el comienzo del conector de 20 aminoácidos en pSYN-FVIII-064, entonces se usaron conectores de tamaño variable para sustituir el conector de 20 aa en PSYN-FVIII-064. Las nuevas construcciones de ADN son: pSYN-FVIII-159, 160, 178 y 179 que contienen conectores de 35 aa, 48 aa, 73 aa y 98 aa, respectivamente.

- 20 Para insertar un conector de 35 aminoácidos en pSYN-FVIII-159, se pidieron dos oligonucleótidos (ESC78- 105 pb y ESC79 -107 pb) de Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA). Los oligonucleótidos se hibridaron y se extendieron usando un método de PCR convencional:

Cebadores:

ESC78- Fwd con sitio EcoRV

AAAGTGCCTCTGATATCTGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGGATCCGGTGGCGGG

GGATCCGGTGGCGGGGGATCCGGTGGCGGGGGATCCCTGGTCCCCCGG (SEQ ID

NO: 79)

ESC79- Rev con sitio RsRII

GAAGAGGAAGACTGACGGTCCGCCCAGGAGTTCTGGAGCTGGGCACGGTGGGCATGT
 GTGAGTTTTGTGCGCTCCGCTGCCCCGGGGGACCAGGGATCCCCCGCCAC (SEQ ID
 NO: 80)

5 Se llevó a cabo una reacción de hibridación y extensión de oligonucleótidos por PCR de 50 µL con la combinación de cebadores ESC78/ESC79 usando la amplificación de 3 etapas por ciclo de PCR: 25 ciclos de (96 °C 30 segundos, 55 °C 30 segundos, 68 °C 30 segundos). Se purificó en gel la banda de tamaño esperado (~186 pb) con un kit de extracción en gel (Qiagen, Valencia, Calif.) y se clonó en los sitios de restricción EcoRV y RsRII de pSYN-FVIII-064 para generar pSYN-FVIII-159.

(b) Clonación de pSYN-FVIII-160, 178 y 179

10 pSYN-VIII-160 tiene un conector de 48 aminoácidos entre el fragmento de VWF y la región Fc. Se encargó la síntesis del fragmento de ADN que codifica el conector de 48 aminoácidos (ISGGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLVPRGSGGGGSGGGG) (SEQ ID NO: 81) y una porción de la región Fc (Nº de secuencia de Genscript 132601, mostrada a continuación). Se subclonó un fragmento de la construcción Genscript en pSYN-FVIII-0159 digerido con EcoRV/RsRII (mencionado anteriormente).

Nº de secuencia de Genscript 132601 (SEQ ID NO: 83)

15 AAAGTGCCCTCTGATATCTGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGCGGTGGA
 GGTTCGGTGGCGGGGATCCGGTGGCGGGGATCCCTGGTCCCCCGGGCAGCGCGGTGGAGGTTCCGGT
 GCGGGGATCCGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCTCCAGAACTCCTGGGCGGACCGTCAGTC
 TTCC

20 pSYN-VIII-178 tiene un conector de 73 aminoácidos entre el fragmento de VWF y la región Fc. Se encargó la síntesis del fragmento de ADN que codifica el conector de 73 aminoácidos (ISGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLVPRGSGGGGSGGGG) (SEQ ID NO: 84) y una porción de región Fc (Nº de secuencia de Genscript 144849, mostrada a continuación). Se subclonó un fragmento de la construcción Genscript en pSYN-FVIII-0159 digerido con EcoRV/RsRII (mencionada anteriormente).

Nº de secuencia de Genscript 144849 (SEQ ID NO: 85)

GCCTGCCAGGAGCCGATATCTGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGCGGT
 GGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGC
 GGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGTGGCGGGGATCCCTGGTCCCCCGGGCAGCGCGGTGGAGGT
 TCCGGTGGCGGGGATCCGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCTCCAGAACTCCTGGGCGGACCGT
 CAGTCTTCCTC

25 pSYN-VIII-179 tiene un conector de 98 aminoácidos entre el fragmento de VWF y la región Fc. Se encargó la síntesis del fragmento de ADN que codifica el conector de 98 aminoácidos (ISGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLVPRGSGGGGSGGGG) (SEQ ID NO: 86) y una porción de región Fc (Nº de secuencia de Genscript 144849, mostrada a continuación). Se subclonó un fragmento de la construcción Genscript en pSYN-FVIII-0159 digerido con EcoRV/RsRII (mencionada anteriormente).

30 Nº de secuencia de Genscript 144849 (SEQ ID NO: 87)

GCCTGCCAGGAGCCGATATCTGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGCGGT
 GGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGC
 GGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGTGGCGGGGATCCCTGGTCCCCCGGGCAGCGCGGTGGA
 GGTTCGGTGGCGGGGATCCGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCTCCAGAACTCCTGGGCGGA
 CGTCACTCTTCCTTCCC

Clonación de pSYN-FVIII-180, 181 y 182

35 Se construyeron pSYN-FVIII-180, 181 y 182 a partir de pSYN-FVIII-160. Se introdujeron las mutaciones K2093A o F2093A o K2093A/F2093A en el dominio C1 de FVIII en pSYN-FVIII-160 para formar pSYN-FVIII-180, pSYN-FVIII-181 y pSYN-FVIII-182, respectivamente.

Secuencia de proteínas del heterodímero FVIII-VWF-Fc (SEQ ID NO: 88)

ES 2 753 124 T3

(posición de aminoácidos de la secuencia de FVIII 1-1457; región subrayada representa la región Fc; subrayado ondulado representa el conector escindible entre la primera Fc y el fragmento de VWF; región doblemente subrayadas representa el fragmento de VWF; región en negrita representa el conector escindible de longitud variable entre el fragmento de VWF y Fc. La longitud de conector varía en las construcciones FVIII-064, 159, 160, 178 y 179).

```

1      MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51     PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101    DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151    GSHTYVQVQL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201    GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251    HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
301    RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351    EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401    WVHYIAAEEE DWDYAPLVL A PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451    TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
501    DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551    YYSSEVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601    NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651    HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFM
701    MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
751    SKNNAIEPRS FSQNPPVLRK HQREITR TTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
801    DFDIYEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LDWYGMSSSP HVLRNRAQSG
851    SVPQFKKVVV QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
901    RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP
951    TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
1001   FALFFTIFDE TKSWYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1051   MDTLPLGLVMA QDQIRRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
1101   YNLYPGVFET VEMLPKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTP
1151   GMASGHIRDF QITASGQYGO WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1201   LAPMIHGIK  TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1251   FFGNVDSGI  KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
1301   MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1351   PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
1401   QNGKVKVFGQ NQDSFTPVVN SLDPPLTRY LRIHPQSVWH QIALRMEVLG
1451   CEAQDLYDKT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1501   VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTPRE EQNSTYRVV SVLTVLHQDW
1551   LNKKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
1601   SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLSDSGS FFLYSKLTVD
1651   KSRWQGNVVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGKRRRRSG GGGSGGGSG
1701   GGGSGGGSGS GGGSGGGGSR KRRKRLSCR PPMVKLVCPA DNLRAEGLEC
1751   TKTCQNYDLE CMSMGCVSGC LCPPGMVRHE NRCVALERCP CFHQGKEYAP
1801   GETVKIGCNT CVCRDRKWCN TDHVCDATCS TIGMAHYLTF DGLKYLEFGE
1851   COYVLVQDYC GSNPGRFRIL VGNKGCSPS VKCKKRV TIL VEGGIELEFD
1901   GEVNVKRPKM DETHFEVVE GRYIILLGK ALSVWDRHL SISVVLKQTY
1951   QEKVCLCGN  FDGIQNNDLT SSNLQVEEDP VDFGNSWKVS SQCADTRKVP
2001   LDSSPATCHN NIMKQTMVDS SCRILTSDFV QDCNKLVDPE PYLDVCTYDT
2051   CSCESIGDCA AFCDTIAAYA HVCAQHGVV TWRTATLCPQ SCEENLREN
2101   GYEAEWRYNS CAPACQVTCQ HPEPLACPVO CVEGCHAHCP PGKILDELLQ
2151   TCVDPEDCPV CEVAGRRFAS GKKVTLNPSD PEHCQICHCD VVNLTCACQ
2201   EPIDGGGGSG GGGSLVPRGS GGDKTHTCP CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK
2251   DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
2301   TYRVSVLTV  LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
2351   YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWE SNGQPE NNYKTTPPVL

2401   DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFCSVM HEALTHHYTQ KSLSLSPGK

```

Ejemplo 4: Ejemplo de construcciones de ADN de FVIII-VWF (Figura 4)

Se pueden unir juntos el fragmento de VWF y la proteína FVIII por un conector u otra proteína o un polipéptido usando técnicas de ADN recombinante convencionales, como se muestra en la Figura 4. En la Figura 4A, los dominios D1D2'D3 de VWF se unen a la proteína FVIII por un conector de 48 aa-
10 ISGGGGSGGGSGGGGGSGGGSGGGGSLVPRGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 89) y protege FVIII de la eliminación prematura. Para potenciar adicionalmente la actividad protectora de FVIII de D'D3, se puede incorporar en la construcción otra proteína o polipéptido que tenga potencial de prolongación de la semivida, tal como albúmina o una secuencia de PAS (restos heterólogos). El resto heterólogo, por ejemplo, proteína de albúmina
15 o secuencia de PAS, se puede incorporar en diferentes posiciones de la molécula de FVIII; se mostraron algunos ejemplos en la Figura 4B-4D: en los extremos N de FVIII (4B), en los extremos C de FVIII (4C), o en la región B (4D). En las construcciones, las secuencias de proteínas adicionales podrían potenciar la actividad protectora de D'D3 y prolongar más la semivida de FVIII.

Además, también se puede incorporar un resto heterólogo, por ejemplo, albúmina o secuencia de PAS, en las construcciones de heterodímero FVIII/VWF como se muestra en la Figura 4E-4G. En la Figura 4E, un resto heterólogo, por ejemplo, albúmina o secuencia de PAS, se incorpora en la región de dominio B de FVIII de FVIII-148; en la Figura 4F, un resto heterólogo, por ejemplo, albúmina o secuencia de PAS, se incorpora en la región de dominio B de FVIII de FVIII-136; en la Figura 4G, un resto heterólogo, por ejemplo, albúmina o secuencia de PAS, se usa como conector para conectar el fragmento D'D3 y Fc. En aquellas configuraciones, se espera un efecto sinérgico de D'D3, Fc y resto heterólogo que es un prolongador de la semivida (por ejemplo, albúmina/secuencia de PAS) sobre la prolongación de la semivida de FVIII.

Ejemplo 5: Construcción de plásmido del sistema de co-transfección para el heterodímero FVIIIc-VWF (Figura 5)

Se generó un sistema de co-transfección para la producción de heterodímeros FVIIIc-VWF, que contiene tres construcciones de ADN. La primera construcción de ADN- pSYN-FVIII-155 está codificando una proteína de fusión FVIII-Fc en la que una proteína FVIII de cadena sencilla se fusionó directamente con un único fragmento Fc, y la segunda construcción de ADN es pSYN-VWF-031, que codifica una proteína de fusión D'D3-Fc (mencionada anteriormente en el Ejemplo 1). Se transfectaron células HEK293F con los dos plásmidos junto con un tercer plásmido (PC5) en una relación 80:15:5. La co-transfección con PC5 es para garantizar el procesamiento de péptidos completos de las regiones D1 y D2 de manera que los presentes inventores tengan dominios D'D3 maduros. Las proteínas sintetizadas se secretaron como heterodímero FVIIIc/D'D3Fc y homodímero D'D3Fc y el heterodímero FVIIIc/D'D3Fc se separó del homodímero D'D3Fc por purificación de proteínas.

Secuenciación de proteínas maduras de pSYN-FVIII-155 (SEQ ID NO: 90):

```

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFFPNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMLL
GPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKEN
GPMASDPLCLTYSYLSHVLDLVKDLNLSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVDFDEGKSWHSETKNSL
MQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTTPVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEI
SPITFLTAQTLMLDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSMDVVRV
DDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYT
DETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPIL
PGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLASGLIGPLLI CYKESVDQGRNQIMSDKRNVI L F
SVFDENRSWYLTENIQRF LPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSLQSVCLHEVAYWYILSIGAQ TDF
LSVFFSGYTFKHKMVEDTLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVS SCDKNTGDYEE
DSYEDISAYLLSKNNAIEPRFSQNPVVKAHQAEITR TTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEFDIYDE DENQ
SPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSPHVLRNRAQSGSV PFKKVVVFQEFDTG SFTQFLYRGE LNEHLGL
LGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSI SYEEDQRQGAEP RKNFVKPNETKTYFWKVQHMMAPT KDEF
DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAP
CNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGNSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMA
LYNLYPGVFTVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCCQ TPLGMASGHIRDFQITASGQYQGW
APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGN
STGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPHYSIRSLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAI SDAQI
TASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSL L TSMYVKEFLI
SSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFOGNQDSFTPVVNSLDP LLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYDK
THTCPCCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDVLNKGKEYCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK
    
```

Secuenciación de ADN de pSYN-FVIII-155 (SEQ ID NO: 91):

```

ATGCAAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTTCGATTCTGCTTTAGTGCCACCAGAAGATAC
TACCTGGGTGCAGTGGAACTGT CATGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCTGTGGACGCAAGA
TTTCTCCTAGAGTGCCAAAATCTTTTCCATTCAACACCTCAGTCGTGTACAAAAGACTCTGTTTGTAGAA
TTCACGGATCACCTTTTCAACATCGCTAAGCCAAGGCCACCTGGATGGGTCTGCTAGGCTCCTACCATCCAG
GCTGAGGTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCTTCCCATCCTGT CAGTCTTCATGCTGTT
GGTGATCCTACTGGAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAAGAGAT
GATAAAGCTTCCCTGGTGAAGCCATACATATGTCTGGCAGGTCCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCT
GACCCACTGTGCCCTTACCTACTCATATCTTTCTCATGTGGACCTGCTAAAAGACTTGAATTCAGGCCCTCATT
GGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAAGGGAGTCTGGCCAAGGAAAAGACACAGACCTTGACACAAATTTATACTA
CTTTTTGCTGTATTTGATGAAGGGAAAAGTTGGCACTCAGAAAACAAAGAACTCCTTGATGCAGGATAGGGAT
GCTGCATCTGCTCGGGCTGGCCATAAATGCACACAGTCAATGGTTATGTAACAGGTCCTGCCAGGTCGTG
ATTGGATGCCACAGGAAATCAGTCTATTGGCATGTGATGGAAATGGGCACCACCTCTGAAGTGCAC TCAATA
TTCCTCGAAGTGCACACATTTCTTTGTGAGGAACCATCGCCAGGCGTCC TTGGAAATCTGCCCAAATAACTTTCT
CTTACTGCTCAAACACTCTTGATGGACCTTGGACAGTTTCTACTGTTTTGT CATATCTCTTCCCACCAACAT
GATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTGTCCAGAGGAACCCCACTACGAATGAAAAATAATGAA
GAAGCGGAAGACTATGATGATGATCTTACTGATTTCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTTGTATGATGACAAC TCT
CCTTCTTTTATCCAAATCGCTCAGTTGCCAAGAAGCATCTAAAACCTGGGTACATTACATTGCTGCTGAA
GAGGAGACTGGGACTATGCTCCCTTAGTCTCGCCCCGATGACAGAAGTTATAAAAAGTCAATATTTG AAC
    
```

AATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAAAAAGTCCGATTTATGGCATAACAGATGAAACCTTTAAG
 ACTCGTGAAGTATTACAGCATGAATCAGGAATCTTGGGACCTTACTTTATGGGGAAGTTGGAGACACACTG
 TTGATTATATTTAAGAATCAAGCAAGCAGACCATATAACATCTACCCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCCT
 TTGATTCAAGGAGATTACCAAAGGTGTAACACATTTGAAGGATTTTCCAATCTGCCAGGAGAAATATTC
 AAATATAAATGGACAGTACTGTAGAAGATGGGCCAACTAAATCAGATCCCTCGGTGCCGACCCCGTATTAC
 TCTAGTTTCGTTAATATGGAGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTCTCCTCATCTGCTACAAAGAA
 TCTGTAGATCAAAGAGGAAACCAGATAATGTGACACAAGAGGAATGTCATCCTGTTTTCTGTATTTGATGAG
 AACCGAAGCTGGTACCTCACAGAGAAATATAACAACGCTTTCTCCCAATCCAGCTGGAGTGCAGCTTGAGGAT
 CCAGAGTTCCAAGCCTCCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTTTTGATAGTTTGCAGTTGTCAGTT
 TGTTTTGCATGAGGTGGCATACTGGTACATTTCTAAGCATTGGAGCACAGACTGACTTCCCTTCTGTCTTCTTC
 TCTGGATATACCTTCAAACACAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCCATTCCCATTTCTCAGGAGAACT
 GTCTTCATGTCGATGGAAAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGGTGCCACAACCTCAGACTTTCGGAACAGAGGC
 ATGACCCCTTACTGAAGGTTTCTAGTTGTGACAGAACACTGGTGATTATACGAGGACAGTTATGAAGAT
 ATTTACAGCATACTTGCTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCAAGAAGCTTCTCTCAAAACCCACCAGTCTTG
 AAAGCCCATCAGGCGGAAATAACTCGTACTACTCTTCAGTCAGATCAAGAGGAAATGACTATGATGATAC
 ATATCAGTTGAAATGAAGAAGGAATTTTGACATTTATGATGAGGATGAAAATCAGAGCCCCGAGCTTT
 CAAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGCTGCAGTGGAGAGGCTCTGGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCA
 CATGTTCTAAGAAAACAGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGTTGTTTTCCAGGAATTTACT
 GATGGCTCCTTACTCAGCCCTTATACCGTGGAGAACTAAATGAACATTTGGGACTCTGGGGCCATATATA
 AGAGCAGAAGTTGAAGATAATATCATGGTAACCTTCAGAAATCAGGCCCTCTCGTCCCTATTCTTCTATTCT
 AGCCTTATTTCTTATGAGGAAGATCAGAGGCAAGGAGCAGAACCTAGAAAAAACTTTGTCAAGCCTAATGAA
 ACCAAAATCTACTTTTGGAAAGTGCACATCATATGGCACCCACTAAAGATGAGTTTGACTGCAAAGCCTGG
 GCTTATTTCTCTGATGTGACCTGGAAAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCCCTCTGTGCTGCCAC
 ACTAACACACTGAACCCCTGCTCATGGGAGACAAGTGACAGTACAGGAATTTGCTCTGTTTTCCACCATCTTT
 GATGAGACCAAAAGCTGGTACTTCACTGAAAATATGGAAAGAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATG
 GAAGATCCCACTTTTAAAGAGAATTAATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTACATAATGGATACACTACCTGGC
 TTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGATTCGATGGTATCTGCTCAGCATGGGCAGCAATGAAAACATCCATTCT
 ATTCATTTCACTGGACATGTGTTCACTGTACGAAAAAAGAGGAGTATAAAATGGCACTGTACAATCTCTAT
 CCAGGTGTTTTGAGACAGTGGAAATGTACCATCCAAAGCTGGAATTTGGCGGGTGGAAATGCCTTATTGGC
 GAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTTTCTGGTGTACAGCAATAAGTGTGACTCCCTGGGAATG
 CTTCTGGACACATTAGAGATTTTCAGATTACAGTTCAGGACAATATGGACAGTGGGCCCAAGCTGGCC
 AGACTTCATTATTCCGGATCAATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTTCTTGGATCAAGGTGGATCTG
 TTGGCACCAATGATTATTCAGGCATCAAGACCCAGGGTGCCTGTCAGAAAGTTCCTCAGCCTCTACATCTCT
 CAGTTTATCATCATGTATAGTCTTGTATGGGAAGAAGTGGCAGACTTATCGAGGAAATTCCTACTGGAACCTTA
 ATGGTCTTCTTTGGCAATGTGGATTTCATCTGGGATAAAACACAATATTTTAAACCCCTCAATTTATTGCTCGA
 TACATCCGTTTGCACCAACTCATTATAGCATTCCGAGCACTCTTCGCATGGAGTTGATGGGCTGTGATTTA
 AATAGTTGCAGCATGCCATTTGGGAATGGAGAGTAAAGCAATAFCAGATGCACAGATTACTGCTTCACTCTAC
 TTTACCAATATGTTTGGCCACCTGGTCTCCTTCAAAAGCTCGACTTCACC'TCCAAGGGAGGAGTAATGCCTGG
 AGACCTCAGGTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCCACAGGAGTA
 ACTACTCAGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCTCATCTCCAGCAGTCAAGAT
 GGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTTCAGAAATGGCAAAGTAAAGGTTTTTTCAGGGAATCAAGACTCCTTCACA
 CCTGTGGTGAACCTCTTAGACCCACCGTTACTGACTCGCTACCTTCGAATTCACCCCCAGAGTTGGGTGCAC
 CAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTTCTGGGCTGCGAGGCACAGGACCTCTACGACAAAACCTCACACATGCCCA
 CCGTGCCAGCTCCAGAACTCCTGGGCGGACCGTCACTCTCTCTTCCCCAAAACCCAAAGGACACCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTC
 AACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGC
 TACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTCTGCACCAAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTC
 TCCAACAAGCCCTCCAGCCCTCCATCGAGAAAACACTCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAACCCACAG
 GTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
 TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC'TACAAGACCACGCT
 CCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
 GGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC'TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG
 TCTCCGGGTAAA

Se enumeran a continuación fragmentos de VWF y heterodímeros de FVIII-F-VWF adicionales que se han construido.

Tabla 6. Fragmentos de VWF y construcciones de heterodímeros FVIII/VWF

Construcción	Descripción	Vector
VWF		
pSYN-VWF-001	Región D'D3 de péptido señal de FVIII (1-276 aminoácidos de longitud 6x His)	pcDNA 4
pSYN-VWF-002	Región D'D3 de péptido señal de FVIII (1-477 aminoácidos de longitud 6x His)	pcDNA 4
pSYN-VWF-003	Región D'D3 A1 parcial de péptido señal de FVIII (1-511 aminoácidos de longitud 6x His)	pcDNA 4

ES 2 753 124 T3

Construcción	Descripción	Vector
pSYN-VWF-004	Región D'D3A1 de péptido señal de FVIII (1-716 aminoácidos de longitud 6x His)	pcDNA 4
pSYN-VWF-006	D1D2D'D3-conector-CK1	pcDNA 3.1
pSYN-VWF-008	WT de longitud completa - VWF	pcDNA 3.1
pSYN-VWF-009	Región D1D2D'D3 (1-276 aa, 6x His)	pcDNA 3.1
pSYN-VWF-010	Región D1D2D'D3 (1-477 aa, 6x His)	pcDNA 3.1
pSYN-VWF-011	Región D1D2D'D3 A1 parcial (1-511 aa, 6x His)	pcDNA 3.1
pSYN-VWF-012	Región D1D2D'D3A1 (1-716 aa, 6x His)	pcDNA 3.1
pSYN-VWF-013	Región D1D2D'D3 (1-477 aa, C336A/C379A, 6x His)	pcDNA 3.1
pSYN-VWF-014	Péptido señal de FVIII-D'D3 (1-477 aa, C336A/C379A)-Fc sencillo con conector de 20 aa que contiene sitio de trombina	pcDNA 4
pSYN-VWF-015	D1D2D'D3 (1-477 aa, C336A/C379A)-Fc sencillo con conector de 20 aa que contiene sitio de trombina	pcDNA 4
pSYN-VWF-016	Péptido señal de FVIII-D'D3 (1-477 aa, WT)-Fc sencillo con conector de 20 aa que contiene sitio de trombina	pcDNA 4
pSYN-VWF-017	D1D2D'D3 (1-477 aa, WT)-Fc sencillo con conector de 20 aa que contiene sitio de trombina	pcDNA 4
pSYN-VWF-025	Región D1D2D'D3 (1-477 aa, 6x His) en pLIVE	pLIVE
pSYN-VWF-029	Región D1D2D'D3 (1-477 aa, C336A/C379A, 6x His) en pLIVE	pLIVE
pSYN-VWF-030	Péptido señal de FVIII-D'D3 (1-477 aa, C336A/C379A)-Fc sencillo con conector de 48 aa que contiene sitio de trombina	pcDNA 4
pSYN-VWF-031	D1D2D'D3 (1-477 aa, C336A/C379A)-Fc sencillo con conector de 48 aa que contiene sitio de trombina	pcDNA 4
pSYN-VWF-032	Péptido señal de FVIII-D'D3 (1-477 aa, WT)-Fc sencillo con conector de 48 aa que contiene sitio de trombina	pcDNA 4
pSYN-VWF-033	Péptido señal de FVIII-D'D3 (1-477 aa, WT)-Fc sencillo con conector de 35 aa que contiene sitio de trombina	pcDNA 4
FVIII		
pSYN-FVIII-055	scFc de BDD-FVIII con R336I y Y1680F	pBUD
pSYN-FVIII-056	scFc de BDD-FVIII con R336I, R562 y Y1680F	pBUD
pSYN-FVIII-057	scFc de BDD-FVIII con Y1680F	pBUD
pSYN-FVIII-058	scFc de BDD-FVIII con S488A	pBUD
pSYN-FVIII-059	scFc de BDD-FVIII con R336I, R562K,S488A	pBUD
pSYN-FVIII-060	scFc de BDD-FVIII con R336I, R562K,Y1680F	pBUD
pSYN-FVIII-061	scFc de BDD-FVIII con R336I, R562K,S488A, Y1680F	pBUD
pSYN-FVIII-064	scFc escindible de BDD-FVIII con VWF D'D3 (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 20 aa escindible de trombina entremedias	pBUD
pSYN-FVIII-065	scFc escindible de BDD-FVIII con VWF D'D3 (1-276aa) en segunda Fc y conector de 20 aa escindible de trombina entremedias	pBUD
pSYN-FVIII-083	scFc de BDD-FVIII con R336I,S488A,R562K, Y1680F,E1984V	pBUD

ES 2 753 124 T3

Construcción	Descripción	Vector
pSYN-FVIII-086	scFc de BDD-FVIII con conector 6x(GGGGS) entremedias de C2 de FVIII y Fc	pBUD
pSYN-FVIII-095	scFc de BDD-FVIII con S104C, R562K, Y1680F, G1960C	pBUD
pSYN-FVIII-101	scFc de BDD-FVIII de FVIII-041 en pcDNA 3.3. Topo	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-102	BDD-FVIII (M662C/D1828C para enlace disulfuro; mutaciones de escisión de APC R336I/R562K; junto con mutación Y1680F para unión de VWF)	pBUD
pSYN-FVIII-103	scFc de BDD-FVIII (Y662C/T1828C)	pBUD
pSYN-FVIII-104	scFc de BDD-FVIII (G655C/ST1788C)	pBUD
pSYN-FVIII-113	scFc escindible de BDD-FVIII (R490A/H497A) con VWF D'D3 (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 20 aa escindible de trombina entremedias	pBUD
pSYN-FVIII-114	scFc escindible de BDD-FVIII (R490A/H497A) con VWF D'D3 (1-276) en segunda Fc y conector de 20 aa escindible de trombina entremedias	pBUD
pSYN-FVIII-126	scFc de BDD-FVIII (M662C/D1828C)	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-127	scFc de BDD-FVIII (M662C/D1828C para enlace disulfuro; mutaciones de escisión de APC R336I/R562K; junto con mutación Y1680F para unión de VWF)	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-128	scFc de BDD-FVIII (Y664C/T1826C)	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-129	mutación de R336I R562K R490A H497A N1224A en el fondo de pSYN-VIII-64	pBUD
pSYN-FVIII-130	mutación de R336I R562K R490A H497A N1224A en el fondo de pSYN-VIII-65	pBUD
pSYN-FVIII-131	mutación de R471A Y487A R490A H497A N1224A en el fondo de pSYN-VIII-64	pBUD
pSYN-FVIII-132	mutación de R471A Y487A R490A H497A N1224A en el fondo de pSYN-VIII-65	pBUD
pSYN-FVIII-135	BDD- SCFVIII Fc con R1645A/R1648A	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-136	scFc escindible de BDD-FVIII con D'D3 de VWF (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 20 aa escindible de trombina entremedias	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-137	scFc escindible de BDD-FVIII con D'D3 de VWF (1-276aa) en segunda Fc y conector de 20 aa escindible de trombina entremedias	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-145	BDD- SCFVIII Fc con R471A/Y487A, R490A/H497A	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-146	scFc escindible de BDD-FVIII (R471A/Y487A) con D'D3 de VWF (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 20 aa escindible de trombina	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-147	scFc escindible de BDD-FVIII (R471A/Y487A) con D'D3 de VWF (1-276 aa) en segunda Fc y conector de 20 aa escindible de trombina entremedias	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-148	scFc escindible de BDD-FVIII (R1645A/R1648A) con D'D3 de VWF (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 20 aa escindible de trombina	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-149	scFc escindible de BDD-FVIII (R1645A/R1648A) con D'D3 de VWF (1-276 aa) en segunda Fc y conector de 20 aa escindible de trombina	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-155	BDD-FVIII fusionado con Fc sencillo (R1645A/R1648A)	pcDNA 4
pSYN-FVIII-159	scFc escindible de BDD-FVIII con D'D3 de VWF (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 35 aa escindible de trombina entremedias	pBUD

Construcción	Descripción	Vector
pSYN-FVIII-160	scFc escindible de BDD-FVIII con D'D3 de VWF (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 48 aa escindible de trombina entremedias	pBUD
pSYN-FVIII-164	scFc escindible de BDD-FVIII (R490A/H497A, R1645A/R1648A) con D'D3 de VWF (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 20 aa escindible de trombina	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-165	scFc escindible de BDD-FVIII (R336I/R562K, R490A/H497A, R1645A/R1648A) con D'D3 de VWF (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 20 aa escindible de trombina	pcDNA 3.3 Topo
pSYN-FVIII-178	scFc escindible de BDD-FVIII con D'D3 de VWF (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 73 aa escindible de trombina entremedias	pBUD
pSYN-FVIII-179	scFc escindible de BDD-FVIII con D'D3 de VWF (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 98 aa escindible de trombina entremedias	pBUD
pSYN-FVIII-180	scFc escindible de BDD-FVIII (K2092A) con D'D3 de VWF (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 48 aa escindible de trombina entremedias	pBUD
pSYN-FVIII-181	scFc escindible de BDD-FVIII (F2093A) con D'D3 de VWF (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 48 aa escindible de trombina entremedias	pBUD
pSYN-FVIII-182	scFc escindible de BDD-FVIII (K2092A/F2093A) con D'D3 de VWF (1-477 aa, C336A/C379A) en segunda Fc y conector de 48 aa escindible de trombina entremedias	pBUD

Ejemplo 6: Purificación de proteínas

Purificación de proteínas de fragmentos de VWF

5 Se purificaron los fragmentos de VWF mediante un método de purificación de dos etapas. Se usó una columna IMAC (cromatografía de afinidad por metal inmovilizado) cargada con sulfato de níquel para la purificación primaria, se usó una columna de intercambio iónico Fractogel DEAE para la purificación final. Se describe a continuación método de purificación detallado.

(a) Purificación primaria de fragmento de VWF sobre de IMAC de níquel

10 Se equilibró una columna IMAC Sepharose HP de níquel de 14 mL [XK26/3] con HEPES 25 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, y 0,05 % de Tween-20 a pH 7,5. Se ajustaron aproximadamente 7,2 L de medio acondicionado de VWF con 100 mL de HEPES 1 M a pH 7,5 y 600 mL de NaCl 5 M. Entonces se añadieron 80 mL de imidazol 1 M (a pH 7,5) a una concentración final de 10 mM. Entonces se cargaron 7,8 L del medio acondicionado de VWF ajustado sobre la columna a 2-8 °C a 10 mL/min [113 cm/hora]. Las etapas de lavado se realizaron a 13,3 mL/minuto [150 cm/hora]. Primero, se realizó un lavado de 2x volumen de columna (VC) con HEPES 25 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM y 0,05 % de Tween-20 a pH 7,5 en flujo normal {"Flujo descendente"}. A continuación, se realizó un lavado 3xVC con HEPES 25 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM y 0,05 % de Tween-20 a pH 7,5 en flujo inverso {"Flujo ascendente"}. Finalmente, se realizó un lavado 3xVC con HEPES 25 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM y 0,05 % de Tween-20 a pH 7,5 en flujo normal {"Flujo descendente"}. La elución se realizó como un gradiente 10xVC hasta 50 % de B1 (HEPES 25 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM y 0,05 % de Tween-20 a pH 7,5). Se estableció el volumen de fracción a 10 mL. Entonces, se sometió a arrastre la columna con 100 % de B1. Esto fue seguido por un lavado con HEPES 25 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM y 0,05 % de Tween-20 a pH 7,5. Se realizó un segundo arrastre con NaOH 1 N. Entonces se lavó la columna con TRIS 1 M, NaCl 1 M a pH 7,8, seguido por HEPES 25 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM y 0,05 % de Tween-20 a pH 7,5. Finalmente, se lavó la columna con 5 VC de DPBS + 20 % de etanol y se guardó a 4 °C.

25 (b) Purificación secundaria de fragmento de VWF sobre Fractogel DEAE

30 Se realizó la purificación secundaria del fragmento de VWF sobre Fractogel DEAE a pH 7,5. En primer lugar, se ajustaron 20 mL de eluato de IMAC de níquel de VWF (correspondiente al pico del fragmento de VWF) con 200 mg de detergente de ión bipolar Zwittergent 3-14 en un intento por romper las especies agregadas sin usar excipientes desnaturizantes o reductores. Después de disolver el detergente, la proteína se dejó a TA durante aproximadamente 15 minutos. Entonces, la proteína se ajustó con 4 o de trehalosa, 1 mL de 10 % de Tween-20, 5 mL de HEPES 1 M a pH 7,5 y 174 mL de agua "Milli-Q". El tampón de equilibrio "A12" fue HEPES 25 mM, NaCl 50 mM, 1 % de trehalosa, 0,05 % de Tween-20 a pH 7,5. El tampón de elución "B1" fue HEPES 25 mM, NaCl 1000 mM, 1 % de trehalosa, 0,05 % de Tween-20 a pH 7,5. La elución se realizó como un gradiente de 10 VC hasta 50 % de

B1, con un mantenimiento de 5+ VC seguido por una etapa hasta 100 % de B1. Entonces se sometió a arrastre la columna con 0,85 % de ácido fosfórico, seguido por TRIS 1 M, NaCl 1 M a pH 7,5. Entonces, se sometió a arrastre la columna con NaOH 1 N, NaCl 2 M seguido por TRIS 1 M, NaCl 1 M a pH 7,5. Entonces, se lavó la columna con HEPES 25 mM, NaCl 100 mM + 20 % de etanol a pH 7,5 para almacenamiento.

5 (c) Purificación de proteínas de heterodímero FVIII-VWF

Se purificó primero el heterodímero FVIII-VWF por una columna de afinidad (GE VIIISelect), luego seguido por una columna de intercambio iónico Fractogal TMAE (McCue JT, Selvitelli K, Walker J, J Chromatogr A. 2009 Nov 6; 1216(45):7824-30. Publicación electrónica 23 de septiembre de 2009).

10 Para la purificación de FVIII-155/VWF-31, se usó una etapa de filtración de flujo tangencial (TFF) para intercambiar de tampón el medio acondicionado clarificado. Entonces se capturaron las proteínas elegidas como diana en el filtrado usando cromatografía de afinidad. Siguió una etapa de cromatografía de intercambio aniónico débil para reducir las especies de HMW. Se accedió tanto a la pureza como al tamaño de la molécula por HPLC-SEC y SDS-PAGE. Se confirmó adicionalmente por transferencia Western la presencia de diferentes dominios de FVIII-155/VWF-31. La actividad específica de la molécula fue comparable a FVIII de dominio B delecionado.

15 (d) Digestión con trombina del heterodímero FVIII-VWF (Figura 8)

Se mezcló el heterodímero FVIII-VWF-Fc o FVIII-Fc (control) con trombina en relación 1:10 en tampón de escisión de trombina (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, 5 % de glicerol). Se incubó la reacción a 37 °C durante 20 minutos. Se ejecutó el producto digerido en gel reductor de Tris-glicina a 4-12 %. La proteína no digerida se usó como control. Las bandas se visualizaron por tinción con Coomassie.

20 (e) Evaluación de la capacidad de unión de VWF de FVIII-155/VWF-031 por ensayo Octet

Se determinó la capacidad de unión de VWF de FVIII-155/VWF-031 por mediciones basadas en interferometría de biocapa (BLI) (ensayo Octet) a 25 °C con un instrumento ForteBio Octet 384 usando tampón de unión Tris (Tris 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). El ensayo Octet para determinar la unión de FVIII se basó en la inmovilización hidrófoba de factor humano de von Willebrand (hVWF) (Nº de catálogo de Haematologic Technologies HCVWF-0191) sobre el biosensor de APS, seguido por la unión de 1,0 % de albúmina de suero bovino (Nº de catálogo de Jackson ImmunoResearch 001-000-161). Brevemente, se diluyó hVWF (38,5 nM) en tampón Tris y se cargó a través de biosensores de APS durante 600 s, dando aproximadamente 3,0 - 3,5 nm de unión sobre las sondas de reacción. Se cargaron las sondas de APS de control APS con 1,0 % de BSA en ausencia de hVWF para la resta de referencia. Después de la carga, todas las sondas se incubaron en tampón Tris durante 300 segundos para establecer un nuevo nivel inicial. Posteriormente, se incubaron sondas de biosensor en disoluciones de FVIII-155/VWF-031, principio activo de FVIII-Fc, o rFVIII (60 nM) durante 5 min a temperatura ambiente, seguido por una etapa de disociación de 5 min. Usando el software de análisis de datos Octet, la respuesta de unión (nm) derivó de los datos restados (Sonda de reacción menos Sonda de referencia). Como se muestra en la Figura 15, en comparación con la afinidad de unión de VWF de rFVIII-Fc y rFVIII, la afinidad de unión de VWF de FVIII-155/VWF-031 fue gravemente afectada. Esto indica la protección satisfactoria de FVIII de VWF de longitud completa por el fragmento D'D3 dentro del heterodímero FVIII-Fc/VWF.

Ejemplo 7. La interacción VWF-FVIII es un factor limitante para la prolongación de la semivida de FVIII

La mayoría de FVIII en circulación existe como un complejo FVIII-VWF (>95 % de FVIII en plasma). Esta interacción FVIII-VWF promueve la eliminación de FVIII mediante la vía de eliminación de VWF, haciendo así la semivida de VWF (T_{1/2}) una limitación de la prolongación de la semivida de FVIII. Para evaluar esta hipótesis, se probó la limitación de la prolongación de la semivida de FVIII por tecnología de Fc en ratones deficientes en FVIII (ratones HemaA, que tienen gen VWF intacto) y ratones deficientes en FVIII/VWF (doblemente inactivados en FVIII-VWF (DKO)).

45 Se trataron los ratones HemaA o ratones DKO FVIII-VWF con una única dosis intravenosa de rFVIII o rFVIII-Fc a 125 UI/kg en ratones HemaA o 200 UI/kg en ratones DKO. Se recogieron muestras de sangre hasta 72 horas en los ratones HemaA o hasta 8 horas en los ratones DKO FVIII/VWF. Entonces se midió la actividad de la muestra de plasma de FVIII por un ensayo cromogénico de FVIII. Se analizó el perfil farmacocinético (FC) de las dos varianzas de rFVIII usando el programa WinNonlin.

50 Como se muestra en la Tabla 7 y la Figura 9, en los ratones DKO FVIII/VWF, rFVIII-Fc mostró T_{1/2} aproximadamente 4,8 veces más larga (es decir, T_{1/2} de 1,2 horas) en comparación con T_{1/2} de rFVIII (es decir, T_{1/2} de 0,25 horas). A diferencia, cuando se probó en ratones HemaA, rFVIII-Fc solo tuvo T_{1/2} 1,8 veces más larga en comparación con rFVIII. La T_{1/2} de rFVIII-Fc fue 13,7 horas, que está en línea con la semivida de VWF murino endógeno. Esto indica que la interacción FVIII-VWF es un factor limitante para la prolongación de la semivida de FVIII. Para lograr una prolongación de la semivida de FVIII superior a 2 veces, se tendrá que eliminar la interacción FVIII-VWF.

55

Tabla 7: FC de FVIII en ratones HemA y DKO FVIII/VWF

Molécula de prueba	Ratones deficientes en FVIII		Ratones deficientes en FVIII/VWF	
	T _{1/2} (h)	Relación de T _{1/2} frente a rFVIII	T _{1/2} (h)	Relación de T _{1/2}
rFVIII	7,6	1	0,25	1
rFVIII/Fc	13,7	1,8	1,2	4,8

Ensayo cromogénico de FVIII

5 Se midió la actividad de FVIII usando el kit de FVIII COATEST SP de DiaPharma (lote N° N089019) y todas las incubaciones se realizaron sobre un calentador de placa a 37 °C con agitación.

10 El intervalo de patrón de rFVIII fue desde 100 mUI/mL hasta 0,78 mUI/mL. Se añadieron muestras de control de ensayo de plasma humano normal reunido y de plasma (diluidas con tampón IX Coatest) en placas de 96 pocillos Immulon 2HB por duplicado (25 µL/pocillo). Se añadieron secuencialmente mezcla recién preparada de IXa/FX/fosfolípido (50 µL), 25 µL de CaCl₂ 25 mM y 50 µL de sustrato FXa en cada pocillo con incubación de 5 minutos entre cada adición. Después de la incubación con el sustrato, se añadieron 25 µL de 20 % de ácido acético para terminar la reacción de color, y se midió la absorbancia de DO405 con un instrumento SpectraMAX plus (Molecular Devices). Los datos se analizaron con el software SoftMax Pro (versión 5.2). El nivel más bajo de cuantificación (LLOQ) es 7,8 mUI/mL.

Ejemplo 8. El dímero VWF D'D3 protege FVIII de la proteólisis y eliminación de FVIII (Figura 10)

15 Se evaluó la actividad de protección de FVIII de los fragmentos de VWF por su capacidad para proteger FVIII murino endógeno de su eliminación en ratones deficientes en VWF. Se introdujeron diferentes fragmentos de VWF como se enumera en la Tabla 8 Columna 1 (Figura 1, Ejemplo 1) en la circulación sanguínea de los ratones deficientes en VWF por inyección hidrodinámica de sus construcciones de ADN correspondientes a 100 µg/ratón. Se recogieron las muestras de plasma 48 horas después de la inyección, y se midió la actividad plasmática de FVIII murino por un ensayo cromogénico de FVIII. Se midió el nivel de expresión de VWF por ELISA de VWF.

20 Cuatro longitudes diferentes de los fragmentos de VWF que se han probado son 276, 477, 511 y 716 aminoácidos. Se probó el intervalo de 276 a 716 aminoácidos para encontrar la longitud de los fragmentos de VWF requerida para la unión de FVIII (276 aa) sin dominio de unión de receptor de eliminación de VWF (716 aa). Se usaron VWF de longitud completa y el multímero D1D2D'D3CK como control positivo para la protección de FVIII. En la circulación sanguínea, los fragmentos de VWF sintetizados con el dominio D1D2 existen como un dímero y existen como monómeros cuando se sintetizan sin el dominio D1D2.

25 El aumento de la actividad de FVIII murino en plasma después de la inyección hidrodinámica mide el efecto de protección de FVIII de los fragmentos de VWF. Como se muestra en la Tabla 8 y la Figura 10A-B, los primeros 276 aa del fragmento D'D3 no tuvieron actividad de protección de FVIII como se demuestra por el nivel de FVIII similar antes/después de la inyección en plasma (Figura 10A). Sin embargo, la introducción de los otros fragmentos de VWF indujo un aumento significativo en el nivel de FVIII en plasma, que indica que los fragmentos de VWF pueden proteger FVIII de su vía de eliminación.

30 Tabla 8: Nivel en plasma de FVIII murino de ratones DKO FVIII/VWF antes/después de la introducción de fragmentos de VWF (las construcciones de ADN se ilustraron en la Figura 1)

CONSTRUCCIÓN DE ADN	Que codifica fragmento de VWF	Actividad de FVIII - Antes (mUI/mL)		Actividad de FVIII - 48 h (mUI/mL)		Antígeno de VWF - 48 h (nM/mL)	
		Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
VWF-001	D'D3 _{276aa}	53	31	86	16	2,8	1,9
VWF-009	D1D2D'D3 _{276aa}	45	20	65	17	1,8	1,3
VWF-002	D'D3 _{477 aa}	56	3	257	38	17,0	0,5
VWF-010	D1D2D'D3 _{477 aa}	42	11	387	22	8,2	1,6
VWF-003	D'D3A1 _{511aa}	88	21	253	47	12,9	2,2

CONSTRUCCIÓN DE ADN	Que codifica fragmento de VWF	Actividad de FVIII - Antes (mUI/mL)		Actividad de FVIII - 48 h (mUI/mL)		Antígeno de VWF - 48 h (nM/mL)	
		Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
VWF-011	D1D2D'D3A1 _{511aa}	63	42	360	15	9,3	2,3
VWF-004	D'D3A1 _{716aa}	87	8	239	56		
VWF-012	D1D2D'D3A1 _{716aa}	64	22	307	29		
VWF-006	D1D2D'D3CK	38	10	249	20	2,4	1,0
VWF-008	VWF de longitud completa	51	8	380	41	10,6	2,3

Se enumeraron en la Tabla 8 la relación de la actividad de FVIII en plasma después de la inyección y el nivel de antígeno en plasma de los fragmentos de VWF que contienen el dominio D'D3 de VWF de longitud completa. Se observó relación de FVIII/VWF después de la inyección similar de VWF de longitud completa y las dos formas de dímero de los fragmentos de VWF, que significa que los dos dímeros de fragmentos de VWF proporcionan la misma protección de FVIII que VWF de longitud completa. Además, se observó relación de FVIII/VWF tres veces más alta a partir de las isoformas de dímeros de fragmentos de VWF en comparación con sus monómeros correspondientes: el dímero D'D3 (477 aa) tiene la relación FVIII/VWF de 38,7 mUI/nmol; el monómero D'D3 (477 aa) tiene la relación FVIII/VWF de 11,6 mUI/nmol; el dímero D'D3A1 (511aa) tiene la relación FVIII/VWF de 32,9 mUI/nmol; y el monómero D'D3 (511 aa) tiene la relación FVIII/VWF de 13,8 mUI/nmol, que indica que las isoformas de dímeros de los fragmentos de VWF proporcionan mejores protecciones de FVIII en comparación con sus monómeros correspondientes.

Tabla 9: Efecto de protección de FVIII del fragmento D'D3 de longitud completa

Construcción de ADN	Que codifica fragmento de VWF	Estado de multímero	FVIII/VWF (mUI/nmol)	
			Media	(DE)
VWF-002	D'D3 _{477 aa}	Monómero	11,6	(4,4)
VWF-010	D1D2D'D3 _{477 aa}	Dímero	38,7	(11,7)
VWF-003	D'D3A1 _{511aa}	Monómero	13,8	(1,3)
VWF-011	D1D2D'D3A1 _{511aa}	Dímero	32,9	(5,5)
VWF-008	VWF de longitud completa	Multímero	31,1	(6,7)

15 Inyección hidrodinámica:

La inyección hidrodinámica es un método de administración génica no viral eficiente y segunda al hígado en animales pequeños, tales como ratones y ratas. Se describió originalmente como una inyección rápida de un ADN de plásmido desnudo/solución salina libre de endotoxina a un décimo de volumen del peso corporal del animal en aproximadamente 5-7 segundos. El ADN de plásmido desnudo contiene el gen de interés y la proteína diana producida por el hígado del ADN inyectado se puede detectar en el plazo de 24 horas después de la inyección. Entonces se recogieron muestras de plasma para estudiar la propiedad terapéutica de la proteína expresada.

Para todas las inyecciones hidrodinámicas que se realizaron en el presente documento en la presente solicitud de patente, se administraron por inyección intravenosa 2 mL de ADN de plásmido en 0,9 % de solución salina estéril en la vena de la cola en el plazo de aproximadamente 4-7 segundos a ratones que pesaban 20-35 gramos. Los ratones se monitorizaron estrechamente durante el primer par de horas hasta que se reanudó la actividad normal. Después de recoger muestras de sangre por extracción de sangre retro-orbital, entonces se obtuvieron muestras de plasma y se guardaron a -80 °C para análisis adicionales.

ELISA DE VWF:

Se usó anticuerpo de cabra anti-VWF humano (purificado por afinidad, Affinity Biologicals, GAVWF-AP) como el anticuerpo de captura a 0,5 ug/pocillo y se usó VWF-EIA-D (Affinity Biologicals, VWF-EIA-D, dilución 1:100) como el anticuerpo de detección para ELISA de VWF. Se realizó ensayo de ELISA siguiendo el procedimiento convencional de ELISA, se usó TMB como el sustrato de HRP, se usó tampón PBST/1,5 % de BSA/ NaCl 0,5 M como tampón de

boqueo y de unión. El intervalo de patrón del ensayo es 100 ng a 0,78 ng, y el límite de cuantificación más bajo del ensayo (LLOQ) es 7,8 ng/mL.

Ejemplo 9: Coadministración del fragmento D'D3 de VWF de longitud completa extiende la semivida de BDD-FVIII en ratones DKO FVIII-VWF (Figura 11)

5 El Ejemplo 8 ha demostrado que el fragmento D'D3 de longitud completa puede proteger FVIII endógeno de su vía de eliminación. Para evaluar adicionalmente la actividad de protección de FVIII de la proteína D'D3, se coadministraron ratones DKO FVIII-VWF con FVIII de dominio B delecionado (rBDD-FVIII) y dímero D'D3 (VWF-010) o rBDD-FVIII y monómero D'D3 (VWF-002), por inyección intravenosa a 200 UI/kg para rBDD-FVIII, 770 µg/kg para el dímero D'D3 y 590 µg/kg para el monómero D'D3. Entonces se monitorizó el perfil FC de rBDD-FVIII para su actividad de plasma después de la inyección. Debido a la corta semivida *in vivo* de los fragmentos D'D3, tres horas después de la co-inyección inicial, se administró otra dosis de D'D3 mediante la misma vía para mantener un nivel en plasma de D'D3 deseable.

10 Para análisis FC, se obtuvo muestra de plasma mediante extracción de sangre retro-orbital 5 min, 30 min, 1 hora, 2 hora, 4 horas y 6 horas después de la inyección, se analizó la actividad de FVIII en plasma y el nivel de antígeno de D'D3 por ensayo cromogénico de FVIII y ELISA de VWF.

15 Como se muestra en la Figura 11 y la Tabla 10, el monómero D'D3 prolongó la semivida de rBDD-FVIII 2,5 veces y mejoró su recuperación en 1,8 veces. El dímero D'D3 prolongó la semivida de rBDD-FVIII en 4,1 veces y mejoró su recuperación en 3,5 veces. También se observaron el tiempo de residencia medio mejorado, eliminación y ABC de ambas de las isoformas de D'D3. El dímero D'D3, sin embargo, logró mejores resultados en todos los parámetros FC en comparación con su forma de monómero.

20 En resumen, la co-inyección de D'D3 de longitud completa protege FVIII de su vía de eliminación, como se muestra en el perfil FC mejorado de rBDD-FVIII. El posible valor clínico de este hallazgo necesita ser evaluado más a fondo.

Tabla 10: Parámetro FC de BDD-FVIII en ratones DKO FVIII-VWF cuando se co-administran con fragmentos D'D3

Tratamiento	Recuperación de 5 min (%)	T _{1/2} (h)	MRT (h)	Cl (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	ABC_D (h*kg*mUI/mL/mUI)	Aumento en veces de T _{1/2}	Aumento de veces de recuperación
rBDD-FVIII	25	0,23	0,24	407,72	133,14	0,0025		
rBDD-FVIII VWF-002	44	0,57	0,58	151,93	124,63	0,0066	2,5	1,8
rBDD-FVIII VWF-010	87	0,95	0,98	71,48	97,54	0,014	4,1	3,5

25 **Ejemplo 10. El monómero D'D3 sintetizado con dominio D1D2 y su isoforma de dímero tiene la misma actividad de protección de FVIII y además prolongaron la semivida de FVIII_{IFc} en ~4 veces en ratones DKO FVIII-VWF (Figura 12)**

30 Para cuantificar la capacidad de protección de FVIII de los dominios D'D3 y determinar si la dimerización de D'D3 es necesaria para su actividad de protección de FVIII, se administró cada una de dos construcciones de ADN (es decir, VWF-025 (que contiene la secuencia de ADN que codifica D1D2D'D3) y VWF-029 (que contiene ADN de codón de D1D2D'D3 con mutación C336A y C379A)) en ratones DKO FVIII/VWF por inyección hidrodinámica. Esta inyección produjo expresión de dímero D'D3 (VWF-025) o monómero (VWF-029) en los ratones DKO FVIII/VWF. En el día 5 después de la inyección hidrodinámica, se administró una dosis intravenosa única de rFVIII_{IFc} a 200 UI/kg, y se recogieron muestras de plasma 5 min, 4, 8,16, 24, 31, 40, 55, 66 horas después de la inyección IV de rFVIII_{IFc}. Se usó un estudio FC de rFVIII_{IFc} que se realizó en ratones DKO FVIII-VWF sin tratamiento previo a la misma dosis como nivel inicial de la semivida de rFVIII_{IFc}. Se analizó la actividad de FVIII en plasma por un ensayo cromogénico de FVIII. Se midió el nivel de D'D3 en plasma por ELISA de VWF, y se analizó el perfil FC de rFVIII_{IFc} usando el programa WinNonlin.

40 Como se muestra en la Tabla 11 y la Figura 12, con los fragmentos D'D3 de VWF en la circulación, la recuperación inicial de rFVIII_{IFc} aumentó desde 42 % hasta 75 % con el dímero D'D3 y 60 % con el monómero D'D3. También aumentó la T_{1/2} de rFVIII_{IFc} desde 2,5 horas hasta 9,3 horas y 9,2 horas, respectivamente. Similar a T_{1/2}, también se observaron tiempo de residencia medio, eliminación y distribución de volumen mejorados de los ratones que expresan monómero y dímero D'D3. En general, los presentes inventores observan mejoras de aproximadamente 8 veces en la semivida de rFVIII_{IFc} y mejoras de 6 veces en ABC en tanto los ratones que expresan el monómero D'D3 como el dímero. Al igual que con su isoforma de dímero, el monómero D'D3 de VWF de longitud completa que se

5 sintetizó con el propéptido (D1D2) de VWF es suficiente para proporcionar el efecto de protección completa de FVIII como la molécula de VWF de longitud completa.

En ratones DKO FVIII/VWF, WT-FVIII tiene una $T_{1/2}$ de 0,25 h. La tecnología de fusión de Fc aumentó la $T_{1/2}$ de FVIII a 1,2 horas, que es un aumento de aproximadamente 4,8 veces. Cuando se combinó la tecnología de fusión de Fc con los dominios D'D3, $T_{1/2}$ de FVIII aumentó hasta 9,3 horas (dímero D'D3) y 9,2 horas (monómero D'D3), que son aumentos de aproximadamente 37 veces en total. (Tabla 10) Este resultado demostró el efecto sinérgico de la fusión de Fc y el fragmento D'D3 de VWF sobre la prolongación de la semivida de FVIII.

Tabla 11: Parámetro FC de rFVIII-Fc con/sin fragmento D'D3 en circulación sanguínea

Tratamiento	Recuperación de 5 min (%)	$T_{1/2}$ (h)	MRT (h)	Cl (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	AUC_D (h*kg*mUI/mL/mUI)	Aumento en veces de $T_{1/2}$	Aumento de veces de ABC D
rFVIII-Fc	43	1,2	0,76	39,5	67,0	0,025		
rFVIII-Fc VWF-025	75	9,3	11,1	6,1	67,6	0,164	7,8	6,6
rFVIII-Fc VWF-029	60	9,2	11,3	6,7	75,7	0,149	7,7	6,0

10 Ejemplo 11: FC de heterodímero FVIII-VWF en ratones Hema

Se probará el perfil FC de los candidatos a cabeza de serie del heterodímero FVIII-VWF (tal como FVIII-155/VWF-031) en ratones Hema para evaluar su capacidad de protección de FVIII de VWF endógeno y su capacidad para prolongación de la semivida de FVIII.

15 Se tratarán ratones Hema con una dosis intravenosa única de los candidatos a cabeza de serie a 200 UI/kg, entonces se recogerán muestras de plasma 5 min, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h y 120 h, se probará la actividad en plasma por ensayo cromogénico de FVIII, y se calculará la semivida de la varianza de FVIII por el programa WinNonlin.

20 En una configuración óptima de heterodímeros FVIII/VWF, la unión de FVIII a VWF endógeno será completamente inhibida, para lo que la semivida inicial de rFVIII disminuirá desde 7,6 h hasta 0,25 h, como se muestra en el Ejemplo 7. Cuando el fragmento D'D3 se asoció no covalentemente a FVIII, se observó un beneficio de semivida de aproximadamente 8 veces (Ejemplo 9). En los candidatos a cabeza de serie del heterodímero FVIII/VWF, el fragmento de VWF se asocia covalentemente a la molécula de FVIII, podría ser capaz de lograrse mejor protección de FVIII. La invención de la presente solicitud abrió la posibilidad de prologar más la semivida de FVIII más allá del techo de dos veces, con la combinación de las tecnologías de prolongación de la semivida disponibles, los pacientes Hema podrían esperar una mejor varianza de FVIII de acción prolongada en el futuro cercano.

25 Se probó el perfil FC de FVIII-155/VWF-031 en ratones Hema y DKO FVIII/VWF para evaluar la capacidad del fragmento D'D3 para proteger el resto de FVIII de VWF endógeno. Se trataron ratones Hema o DKO FVIII/VWF con una dosis intravenosa única de FVIII-155/VWF-031 a 200 UI/kg, entonces se recogieron muestras de plasma 5 min, 8 horas, 24 horas y 48 horas después de la dosis. Se probó la actividad de FVIII de la muestra de plasma por un ensayo cromogénico de FVIII, y se calculó la semivida de FVIII-155/VWF-031 usando el programa WinNonlin.

30 Se detectó unión gravemente alterada a VWF inmovilizado por interferometría de biocapa (Figura 15, Octet; ForteBio Inc., Menlo Park, CA) para FVIII-155/VWF-031 en comparación con rFVIII-Fc y rFVIII. Esto muestra que el dominio D'D3 en la molécula había bloqueado satisfactoriamente la unión de FVIII a moléculas nativas de VWF. Por tanto, se esperaba semivida de rFVIII-155/VWF-031 similar en las dos cepas de ratón diferentes. Los resultados del estudio se enumeran en la Figura 16 y la Tabla 12A. Como se predijo, rFVIII-155NWF-031 tuvo perfil FC comparable en tanto ratones Hema como DKO FVIII/VWF, que indica que la semivida del heterodímero FVIII-Fc/VWF es independiente de la semivida de VWF endógeno. Los resultados muestran que la inhibición de la interacción entre rFVIII-Fc con VWF endógeno por los dominios D'D3 de VWF permite la eliminación del techo de semivida de FVIII y abre la posibilidad de prolongar la semivida de FVIII más allá de la semivida que puede lograrse sin los dominios D'D3 de VWF (aproximadamente dos veces de FVIII no mutante).

Tabla 12A. FC de FVIII-155/VWF-031 en ratones DKO FVIII/VWF y ratones HemA

Tratamiento	Recuperación de 5 min (%)	T _{1/2} (h)	MRT (h)	CI (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	ABC_D (h*kg*mUI/mL/mUI)
FVIII-155/VWF-031 DKO	49	9,9	6,9	11,6	80,5	0,09
FVIII-155/VWF-031 HemA	69	10,8	707	11,9	92,1	0,08

Se evaluó la capacidad protectora de FVIII de los dominios D'D3 comparando t_{1/2} de FVIII-155/VWF-031 con FVIII Fc en ratones DKO FVIII/VWF. Después de una única administración IV, se recogieron muestras de sangre a los 5 min, 8 horas, 24 horas y 48 horas para FVIII-155/VWF-031, y a los 5 min, 1 horas, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 8 horas para FVIII Fc. Se probó la actividad de FVIII de la muestra de plasma por un ensayo cromogénico de FVIII, y se calculó la semivida de FVIII-155/VWF-031 usando el programa WinNonlin.

La Figura 16B y la Tabla 12B muestran un perfil FC significativamente mejorado para FVIII-155/VWF-031 en comparación con rFVIII Fc en ratones DKO: aumento de aproximadamente 6 veces en t_{1/2}; y aumento de aproximadamente 5 veces en la eliminación y ABC. Este resultado demuestra que el dominio D'D3 en el heterodímero FVIII Fc/VWF protege el resto de FVIII de algunas vías de eliminación, proporcionando así alguna de la protección normalmente proporcionada por VWF de longitud completa. Esta conclusión también se confirma en ratones HemA. Cuando se compara con rFVIII Fc en ratones HemA, rFVIII-155/VWF-031 ha mostrado t_{1/2} más corta y menor ABC, que significa en esta configuración que los dominios D'D3 (VWF-031) previenen satisfactoriamente la unión de la proteína FVIII (rFVIII-155) a VWF endógeno, que tiene propiedades de prolongación de la semivida hasta cierto grado, así como una propiedad limitante de la semivida de FVIII. VWF de longitud completa tiene 250 kDa, y forma multímeros de forma que VWF endógeno puede tener hasta 2 MDa, y por tanto está de acuerdo con esta hipótesis de que la región D'D3 de VWF de 55 kDa no proporciona la misma protección normalmente proporcionada por el VWF endógeno mucho más grande en este contexto. Puesto que el fragmento de VWF previene que VWF endógeno se una a rFVIII-155/VWF-031, en esta construcción particular, la semivida disminuye en el ratón HemA. Por tanto, los resultados en la Tabla 12B indican que la molécula de rFVIII-155/VWF-031 es capaz de prevenir que el prolongador de la semivida de FVIII (VWF endógeno) se una a rFVIII-155/VWF-031. Sin embargo, el experimento muestra que el retirar el factor limitante de la semivida de FVIII ha abierto la posibilidad de prolongar una semivida de la proteína FVIII más allá de las 1,5 veces o 2 veces mostradas previamente. Cuando FVIII se combina con otros elementos de prolongación de la semivida como se muestra en la Figura 4, se podría conseguir un logro del techo de prolongación de la semivida de 2 veces de FVIII.

Tabla 12B. FC de FVIII-155/VWF-031 y FVIII Fc en ratones DKO FVIII/VWF

Tratamiento	Recuperación de 5 min (%)	T _{1/2} (h)	MRT (h)	CI (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	ABC_D (h*kg*mUI/mL/mUI)
DKO FVIII Fc	43	1,6	1,9	63,9	123,2	0,02
DKO FVIII-155/VWF-031	49	9,9	6,9	11,6	80,5	0,09
Aumento en veces		6,2	3,6	5,5		4,5
HemA FVIII-155/VWF-031	69	10,8	7,7	11,9	92,1	0,08
HemA FVIII Fc	86	16,4	20,3	2,9	57,7	0,35

Ejemplo 12: Optimización del conector de D'D3-Fc del heterodímero FVIII/D'D3 (Figura 13)

Para permitir que rFVIII Fc escape de la vía de eliminación de VWF y elimine el techo de prolongación de la semivida de FVIII de 2 veces, el fragmento de D'D3 de VWF se ha incorporado en la molécula de rFVIII Fc (Figura 2), dando como resultado un heterodímero FVIII Fc/VWF. Para eliminar la interacción entre rFVIII Fc y VWF endógeno y maximizar el potencial de protección de D'D3 FVIII, se ajustó el conector entre el dominio D'D3 y la región Fc para permitir la óptima unión a FVIII/D'D3. Un conector más óptimo permitirá que el dominio D'D3 tenga mayor protección de FVIII que una construcción de conector menos óptima. Esto se puede probar por inyección hidrodinámica de las construcciones de ADN en ratones DKO FVIII/VWF. Una construcción más óptima dará mayor expresión de proteínas en estado estacionario del heterodímero FVIII Fc/D'D3.

Se manipularon tres heterodímeros FVIII_{Fc}/D'D3 diferentes (Figura 3, Ejemplo 3) para la selección óptima de conectores. Los posibles conectores entre los dominios D'D3 y la región Fc se enumeraron en la Tabla 13. Se administraron construcciones de ADN en ratones DKO FVIII/VWF por inyección hidrodinámica ("HDI") a 100 µg/ratón, y se recogieron muestras de plasma 48 h después de HDI. Se analizó la actividad de heterodímero FVIII_{Fc}/D'D3 en circulación por un ensayo cromogénico de FVIII.

El resultado del estudio se mostró en la Figura 13. 48 horas después de HDI, se alcanzaron niveles de expresión similares por FVIII-064 y FVIII-159, que indica que el conector de 20 aa y el conector de 35 aa promueven nivel similar de interacción FVIII/D'D3. Por otra parte, FVIII-160 mostró expresión significativamente más alta que FVIII-064, que significa que el conector de 48 aa permite mejor unión a FVIII/D'D3 en comparación con los conectores de 20 aa y 35 aa.

Un conector óptimo entre el fragmento de VWF y la región Fc es uno de los elementos clave del heterodímero FVIII_{Fc}/VWF. Encontrar el mejor conector permitirá la interacción óptima entre FVIII y el fragmento de VWF, prevendrá la unión de FVIII a VWF endógeno, permitirá que FVIII escape de la vía de eliminación de VWF, y prolongará la semivida de FVIII más allá de la semivida de VWF en plasma.

Tabla 13: Diferentes conectores entre D'D3 y fragmento Fc

Construcción de ADN	Conector entre D'D3 y Fc
FVIII-064 (SEQ ID NO: 92)	20 aa= I D G G G G S G G G S L V P R G S G G
FVIII-159 (SEQ ID NO: 93)	35 aa= I S G G G G S G G G S G G G S G G G G S G G G G S L V P R G S G G
FVIII-160 (SEQ ID NO: 94)	48 aa= I S G G G G S G G G S G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S

Ejemplo 13: Estabilidad de FVIII de cadena sencilla

La proteína FVIII de cadena sencilla podría ser más estable que su isoforma de cadena dual. Para probar esta hipótesis, se hicieron dos construcciones de ADN: FVIII-136 (FVIII_{Fc} procesable con el dominio D'D3) y FVIII-148 (FVIII_{Fc} de cadena sencilla (SC) con el dominio D'D3, que contiene la mutación R1645A/R1648A para prevenir la escisión entre la cadena pesada y cadena ligera de FVIII).

Se administraron ambos plásmidos en ratones DKO FVIII/VWF por inyección hidrodinámica. Se recogieron muestras de plasma 24 h y 48 h después de las inyecciones para medir el nivel de expresión de las dos isoformas de FVIII_{Fc}/D'D3. Como se muestra en la Figura 14, en ambos puntos de tiempo, se observó una tendencia de mejor expresión por la construcción de SC-FVIII_{Fc}/D'D3 (FVIII-148) (p=0,12, p=0,19), indicando que FVIII de cadena sencilla podría ser más estable o expresarse mejor que su isoforma de cadena doble (FVIII-136). El perfil FC de las dos isoformas de FVIII y se investigarán adicionalmente sus niveles de expresión en cultivo celular. La isoforma de FVIII de cadena sencilla podría ser posiblemente usada para sustituir la isoforma de cadena doble convencional para lograr mejor producción de proteínas y mejor semivida de FVIII *in vivo*.

Ejemplo 14. PEGilación

Se pueden unir una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) dentro de cualquier región de la proteína FVIII, el fragmento de VWF, o ambos. Como FVIII no tiene una cisteína libre en su superficie basándose en la estructura cristalina (PDB:2R7E, Shen et al., Blood 111:1240 (2008); PDB:3CDZ, Ngo, Structure, 16:597-606 (2008)), un enfoque es insertar un péptido que contiene cisteína (por ejemplo, GGGSGCGGS) (SEQ ID NO: 107) en o asociarlo a la proteína FVIII, el fragmento de VWF, o ambos. Las moléculas de PEG que contienen maleimida se pueden conjugar entonces específicamente con la cisteína introducida sobre la proteína FVIII recombinante. Brevemente, la proteína FVIII recombinante que contiene la inserción de Cys se puede construir por tecnología molecular convencional, y la proteína FVIII recombinante expresada en el sistema de expresión en mamífero (por ejemplo, células HEK293, CHO, BHK21, PER.C6, y CAP) se puede purificar por cromatografía de afinidad y de intercambio iónico. La proteína FVIII recombinante purificada se reduce por Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) para exponer el grupo tiol de la cisteína introducida y luego reacciona con maleimida-PEG. La proteína FVIII recombinante resultante se prueba para actividad procoagulante y semivida prolongada.

PEG se une a al menos una de las localizaciones desveladas en la solicitud de EE. UU. Nº 61/670.553, u otros sitios de inserción adecuados. La actividad de FVIII de la proteína FVIII recombinante PEGilada se analiza usando un ensayo cromogénico de FVIII. La FC de la proteína FVIII recombinante PEGilada se analiza en ratones Hema y ratones DKO FVIII-VWF como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 15: Estabilidad de FVIII en plasma de HemA y de inactivación doble (DKO) de FVIII/VWF

Se probó la estabilidad en plasma de diferentes fusiones de FVIII₁₅₅Fc en plasma de HemA o de inactivación doble (DKO) de FVIII/VWF. Para el ensayo de estabilidad, se incubaron 5 UI/mL de diversas proteínas FVIII₁₅₅Fc con o HemA de ratón o plasma DKO a 37 °C. Se recogieron las alícuotas en diferentes puntos de tiempo para medir la actividad por ensayo cromogénico de FVIII. Se midió la actividad en cada punto de tiempo por duplicado y se representó la actividad promedio en función del tiempo.

Para el ensayo de inmunoprecipitación de FVIII₁₅₅Fc, se incubaron 5 µg de FVIII₁₅₅Fc con o 250 µl de PBS o plasma de ratón DKO durante 24 horas a 37 °C. Se inmunoprecipitó FVIII₁₅₅Fc añadiendo 5 µg anticuerpo policlonal de oveja anti-FVIII (ab61370) durante 1 h a temperatura ambiente y 100 µl de perlas de proteína A. Después de 4x lavados de 1 mL de PBS, las perlas se resuspendieron en 50 µl de 1x tampón reductor de SDS-PAGE. Después de hervir, se cargaron 20 µl de muestra (es decir, ~ 1 µg de FVIII₁₅₅Fc) sobre 4-15 % de gel sin tinción Bio-Rad. Se obtuvieron imágenes de gel por el sistema Bio-rad, seguido por análisis western con anticuerpo anti-cadena pesada de FVIII (GMA012).

La actividad de FVIII₁₅₅Fc (molécula de FVIII de cadena doble, que tiene cadenas pesadas y ligeras de FVIII separadas, mantenidas juntas por interacciones no covalentes) disminuye con el tiempo en tanto plasma de HemA como de DKO (Figura 18A). Debido a la ausencia de protección mediada por VWF, la pérdida en la actividad de FVIII₁₅₅Fc fue más pronunciada en plasma de DKO. Esta pérdida en la actividad de FVIII fue principalmente debida a la disociación o degradación de la cadena pesada de FVIII (HC). Se observó una reducción de aproximadamente 75 % de reducción en cadena pesada de FVIII₁₅₅Fc después de una incubación de 24 h en plasma de DKO (Figura 18B). No se observó reducción significativa ni para la cadena ligera (LC) (datos no mostrados) ni FVIII₁₅₅Fc no procesado/de cadena sencilla (es decir, molécula FVIII en la que la cadena ligera y cadena pesada se mantiene todavía juntas covalentemente- banda superior en la imagen de gel) (Figura 18B).

Como VWF se propone para aumentar la estabilidad de FVIII *in vivo*, los presentes inventores probaron si la proteína quimérica - heterodímero FVIII-VWF (FVIII₁₅₅:VWF31, que tiene D'D3 de VWF covalentemente unido a FVIII mediante Fc) era más estable en plasma de HemA y DKO. A partir de los datos de estabilidad en plasma mostrados en la Figura 19, la presencia de D'D3 aumentó la estabilidad de FVIII₁₅₅Fc, tanto en plasma de HemA como de DKO. Se usó FVIII₁₅₅Fc de cadena sencilla sin D'D3 como control en estos experimentos (SCFVIII). A partir de la Figura 19, el FVIII de cadena sencilla era más estable que FVIII₁₅₅Fc de cadena doble; sin embargo, la presencia de D'D3 aumentó significativamente más la estabilidad en plasma de la molécula de FVIII₁₅₅Fc de cadena sencilla. Esto sugiere que D'D3 estabiliza FVIII, no solo manteniendo la cadena pesada y ligera juntas, sino también mediante algunos otros mecanismos desconocidos.

Ejemplo 16: Uso de furina/PACE para procesamiento de VWF

VWF es una proteína única en el sentido de que contiene un pro-péptido muy grande (es decir, dominio D1D2 de VWF, ~85 kDa). El pro-péptido de VWF sirve de chaperona interna para el apropiado plegamiento de la molécula de VWF. Se probaron dos enzimas para el procesamiento de VWF - PC5 y furina (PACE). Se co-transfectó transitoriamente la construcción de VWF031 (D1D2D'D3Fc) en células HEK293 con diversas concentraciones de o PC5 o PACE. Después de cuatro días, se recogió el medio de cultivo de tejido y se sometió a captura de proteína A. Incluso a una concentración más baja (2,5 %), la furina (PACE) fue más eficiente que 10 % de PC5, en eliminar el pro-péptido (D1D2) de D'D3Fc (Figura 20). La retirada de D1D2 es importante, ya que la presencia de D1D2 participa en la prevención de la interacción de D'D3 con FVIII.

Ejemplo 17: El fragmento de VWF en heterodímero FVIII-VWF previene la interacción de FVIII con VWF de longitud completa

Se usó un instrumento Octet de ForteBio para probar que la construcción de FVIII el heterodímero 155/VWF31 se une a VWF de longitud completa (Figura 21A). Para el ensayo de unión, se capturó VWF de longitud completa usando sensor de APS, seguido por el bloqueo con 1 % de BSA. Después del bloqueo, se probaron diferentes construcciones de FVIII para la unión de VWF. Como se predice, se unieron fuertemente FVIII no mutante y FVIII₁₅₅Fc a los sensores de VWF. FVIII Y1680F mutante, que se conoce por tener baja o ninguna afinidad por VWF, mostró unión de VWF significativamente reducida. El heterodímero FVIII₁₅₅:VWF31 no se unió en absoluto a VWF de longitud completa, confirmando la protección de FVIII con D'D3 en el heterodímero FVIII-VWF.

Se realizó el mismo experimento en orientación inversa para determinar si la porción de D'D3 en el heterodímero FVIII-VWF podía interactuar con otras moléculas de FVIII no covalentemente unidas a D'D3. Como se muestra en la Figura 21B, la construcción de VWF31 (D'D3Fc) sola, cuando se inmoviliza sobre el sensor de proteína G, se puede unir fuertemente a FVIII, sin embargo D'D3 en el heterodímero FVIII₁₅₅:VWF31 no mostró ninguna unión a FVIII. Se usó la proteína G sola con FVIII como control. Estos experimentos de unión confirmaron que D'D3 en el heterodímero puede interactuar con solo una molécula de FVIII que se une covalentemente a ella y previene que FVIII interactúe con moléculas de VWF no mutante de longitud completa.

Para determinar la afinidad de unión exacta de VWF D'D3 por la molécula de FVIII, se realizaron experimentos de resonancia plasmática superficial con VWF031 (Figura 22). Se capturó la construcción VWF031 (D'D3Fc) usando

IgG anti-humana y se pasó FVIII de dominio B delecionado sobre chip que contenía D'D3Fc. Se observó una K_D de aproximadamente 10 nM para FVIII. Esta afinidad es aproximadamente 25 veces más baja en comparación con la molécula de VWF no mutante de longitud completa y es similar a lo que se informa previamente en la bibliografía.

Ejemplo 18: Efecto de la diferente longitud de conector entre D'D3 y Fc sobre la actividad de heterodímero y FC

Para comprobar si variar la longitud de conector escindible de trombina entre D'D3 y Fc tiene algún efecto sobre la FC y actividad del heterodímero FVIII-VWF, se co-expresaron diferentes construcciones de VWF junto con FVIII 155. Se probaron tres construcciones de longitudes de conector diferentes enumeradas en la Tabla 14A (VWF031, VWF035 y VWF036). Se mezcló cada plásmido con el plásmido FVIII155 (Ejemplo 5) y se transfectó en células HEK293. El día cuatro después de la transfección, se recogió el medio de cultivo celular y se concentró hasta 10 UI/mL de actividad cromogénica de FVIII.

Entonces se administró medio concentrado de células en ratones DKO FVIII/VWF de 8-12 semanas de edad a 100 UI/10 mL/kg de dosis. Se recogieron muestras de plasma a los 5 min, 8 h, 16 h, 24 h, 32 h y 48 h después de la dosis. Se analizó la actividad de FVIII de las muestras de plasma por ensayo cromogénico de FVIII y se calculó la semivida usando el programa WinNonlin-Phoenix.

Como se muestra en la Figura 23, cuando la longitud de conector entre D'D3 y el fragmento Fc aumentó desde 48 aa hasta 73 aa o 98 aa, la semivida del heterodímero FVIII/Fc/VWF correspondiente aumentó y alcanzó 12,2 h y 13,3 h respectivamente. Esto representa un aumento de 1,5 a 1,6 veces con respecto a la variate de 48 aa de longitud. Hasta la fecha, el conector de 98 aa es el conector más óptimo para utilizar la actividad de protección de FVIII del fragmento D'D3, y se incorporará en el heterodímero FVIII/Fc/VWF para mejorar más su semivida.

Para comparar el efecto del conector sobre la actividad de FVIII, se realizaron ensayo cromogénico de FVIII y de aPTT en medio de cultivo de tejido de células que expresan diferentes heterodímeros FVIII-VWF. Aunque la actividad de aPTT era 2 veces reducida en comparación con la actividad cromogénica para construcciones heterodímeras, no se observó diferencia significativa entre diversos conectores, excepto cuando el conector también contenía un sitio PAR1 próximo al sitio de trombina (Tabla 14B).

Tabla 14A. Secuencia de conector variable entre VWF D'D3 y Fc

Construcción de ADN	Conector entre D'D3 y Fc
VWF031	48 aa = I S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S L V P R G S G G G G S G G G G S (SEQ ID NO: 95)
VWF035	73aa= I S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S L V P R G S G G G G S G G G G S (SEQ ID NO: 96)
VWF036	98aa= I S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S L V P R G S G G G G S G G G G S (SEQ ID NO: 97)

Tabla 14B: Actividad de heterodímero con diferente longitud de conector

ID de muestra	Descripción de muestra	Longitud de conector entre D'D3 y Fc (aa)	Cromogénico UI/mL	aPTT UI/mL	Cromogénico/aPTT
1	FVIII Fc 155+VWF15	20	1,81	0,85	2,14
2	FVIII Fc 155+VWF31	48	2,32	1,05	2,21
3	FVIII Fc 155+VWF33	35	2,21	1,02	2,16
4	FVIII Fc 155+VWF35	73	2,65	1,24	2,14

ID de muestra	Descripción de muestra	Longitud de conector entre D'D3 y Fc (aa)	Cromogénico UI/mL	aPTT UI/mL	Cromogénico/aPTT
5	FVIII Fc 155+VWF36	98	2,75	1,11	2,47
6	FVIII Fc 155+VWF39	26 (trombina+PAR1)	1,85	1,21	1,53

Ejemplo 19: Unión de FVIII con fragmento de VWF usando enzima sortasa

En otro aspecto, un fragmento de VWF (por ejemplo D1D2D'D3 o dominio D'D3) se une a FVIII usando el método de unión de proteínas in vitro mediado por sortasa. En un ejemplo, se introdujo el motivo de reconocimiento de sortasa A (LPXTG) de *Staphylococcus aureus* en el extremo C del fragmento de VWF y resto Gly(n) en el extremo N de FVIII (donde el número de restos de glicina es variable). La molécula de FVIII usada pueden ser o de cadena sencilla o de cadena doble. La reacción de trans-peptidación catalizada por sortasa unirá covalentemente el fragmento de VWF a FVIII. También se pueden usar la orientación inversa del motivo de reconocimiento para unir estas dos proteínas, donde los presentes inventores tienen FVIII en el extremo N con motivo LPXTG y fragmento de VWF en el extremo C con Gly(n) (véase la Figura 24- ejemplo de unión de sortasa para referencia). El motivo LPXTG y los restos de glicina se pueden sustituir con otras secuencias de reconocimiento de sortasa.

También se preparó el fragmento de VWF que contiene la proteína de fusión de secuencia de reconocimiento de sortasa A-Fc. Para construcciones de fusión de Fc, se fusionó el fragmento D1D2D'D3 de VWF con la región Fc de IgG mediante un conector GS que contenía una secuencia de reconocimiento de sortasa y un sitio de escisión de trombina (Tabla 15 y 16). Una vez se expresa y purifica la proteína en columna de proteína A, la región Fc se pueden retirar por escisión de trombina. El fragmento de VWF resultante con el sitio de reconocimiento de sortasa A se puede usar entonces para la ligación con molécula de FVIII (Figura 24 - Ejemplo de unión de sortasa para referencia - fila E).

pSYN-VWF-051 tiene un conector de 54 aminoácidos con sortasa y sitio de trombina entre el fragmento de VWF y la región Fc. Se encargó la síntesis de fragmento de ADN que codifica el conector de 54 aminoácidos (ISGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSLPETGALR PRVVGGGGSG GGGS) (SEQ ID NO: 98) y una porción de la región Fc (Secuencia de Genewiz N° 10-210746313, mostrada a continuación). Se subclonó un fragmento de la construcción de Genewiz en pSYN-VWF-031 digerido con EcoRV/RsRII.

Secuencia de Genewiz N° 10-210746313 (SEQ ID NO: 99)

```

AGGAGCCGATATCTGGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGCGGTGGAGGTTCCGGCGC
GTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGGTGGCGGGGATCCTTACCTGAAACTGGAGCCCTGCGGCCCC
GGGTCTCGCGCGGTGGAGGTTCCGGTGGCGGGGATCCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAG
CTCCAGAACCTCTGGCGGACCGTCAGTCTT

```

La secuencia de pentaglicina de extremo N que contiene FVIII de cadena sencilla se muestra en la Tabla 17 y 18.

Tabla 15: Secuencia de nucleótidos de pSYN-VWF051 (D1D2D'D3Fc de VWF con motivo de reconocimiento de sortasa A y conector escindible por trombina entre el fragmento de VWF y Fc) (SEQ ID NO: 100)

```

1   ATGATTCCCTG CCAGATTTGC CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTT
51  GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACTCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC
101 GATGCAGCCT TTTCGGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG
151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA
201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC
251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTTTGACA TCCATTTGTT TGTCAAATGGT
301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG
351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT
401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCTCTGTG
451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT
501 CTTTGTGAA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC
551 CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT
601 GAACGGGCAT CTCCTCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT

```

ES 2 753 124 T3

651 GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT
701 TTGCCCGCTG CCACCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT
751 GAGAAGACTT TGTTGAGTGT TGCTGGGGGG CTGGAGTGGC CCTGCCCTGC
801 CCTCCTGGAG TACGCCCCGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGTGTACG
851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG
901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT
951 CAATGAAATG TGTGAGGAGC GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG
1001 GACAGTCCTT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC
1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG
1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT
1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTC ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC
1201 AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCCGGA
1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG
1301 ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCTGGC
1351 CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA
1401 TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC
1451 ATACAGTGAC GGCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
1501 GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC
1551 CGGGAAGACC TCGGGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG
1601 ACTTCCTTAC CCCTCTGGG CTGGCGGAGC CCGGGGTGGA GGACTTCGGG
1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGACTGCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG
1701 CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT
1751 GCGCGTCCCT GACGTCCCCC ACATTGAGG CCTGCCATCG TGCCCTGAGC
1801 CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCCTGGA
1851 CCGCCGCGAG TGCTGTGCG CGCCTTGGC CAGCTATGCC GCGGCTGCG
1901 CGGGGAGAGG CGTGCGCGTC GCGTGGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG
1951 AACTGCCCCG AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TCGGGGACCC CCTGCAACCT
2001 GACCTGCCGC TCTCTCTCTT ACCCGGATGA GGAAATGCAAT GAGGCCTGCC
2051 TGGAGGGCTG CTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC
2101 TGCGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTAC TATGACGGTG AGATCTCCA
2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG
2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC
2251 GCTGTCTTCA GCAGTCCCTT GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCTTG
2301 TCGGCCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG
2351 AAGGGCTCGA GTGTACCAA ACCTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTCCATG
2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCCTGTC CCCCCGGCA TGGTCCGGCA
2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA
2501 AGGAGTATGC CCTTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC
2551 TGTCGGGACC GGAAGTGGAA CTGCACAGC CATGTGTGTG ATGCCACGTG
2601 CTCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTGACGGG CTCAAAATCC
2651 TGTTCGCCGG GGAGTGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT
2701 AACCTTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC
2751 CTCAGTAAA TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA
2801 TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG
2851 ACTCACTTTG AGGTGGTGGG GTCTGGCCGG TACATCATTG TGCTGTGGG
2901 CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC
2951 TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGTG
3001 GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA
3051 CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA
3101 CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC
3151 ATGAAGCAGA CGATGGTGGG TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT
3201 CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT
3251 GCATTTACGA CACTGTCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCGCATTC
3301 TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCACGTG TGTGCCACG ATGGCAAGGT
3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA
3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGGCTGAGT GGCCTATAA CAGCTGTGCA
3451 CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT
3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG
3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG

ES 2 753 124 T3

```

3601 GTGGCTGGCC GCGTTTTGTC CTCAGGAAAAG AAAGTCACCT TGAATCCCAG
3651 TGACCCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT
3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG ATATCTGGCG GTGGAGGTTT CCGTGGCGGG
3751 GGATCCGGCG GTGGAGGTTT CCGCGGTGGA GGTTCGGTG GCGGGGGATC
3801 CCGTGGCGGG GGATCCTTAC CTGAAACTGG AGCCCTGCGG CCCCAGGTCG
3851 TCGGCGGTGG AGGTTCCGGT GCGGGGGGAT CCGACAAAAC TCACACATGC
3901 CCACCGTGCC CAGCTCCAGA ACTCCTGGGC GGACCGTCAG TCTTCCTCTT
3951 CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
4001 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCTGAGGT CAAGTTC AAC
4051 TGGTACGTGG ACGGCGTGGG GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGG
4101 GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGCTCTGC
4151 ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
4201 GCCCTCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC
4251 CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCC ATCCCGGGAT GAGCTGACCA
4301 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC
4351 ATCGCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
4401 CACGCCTCCC GTGTTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC
4451 TCACCGTGG CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
4501 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT
4551 GTCTCCGGGT AAATGA

```

Tabla 16: Secuencia de proteínas de VWF051 (D1D2D'D3Fc de VWF con motivo de reconocimiento de sortasa A y conector escindible por trombina entre el fragmento de VWF y Fc; el sitio de sortasa A mostrado en negrita) (SEQ ID NO: 101)

```

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFNVTFDGSM
51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQRVSPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVC PAGME
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTECPC
351 VHSKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451 LHNSLVKLLK GAGVAMDGQD IQLPLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
501 DWLGRGRLLV KLSVPYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
601 PLYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPRGCEL
651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGEQ YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKRPKDE
951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDEPEY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVTV RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGGGSGGG
1251 GSGGGSGGG GSGGGSGGG GSLPETGALR PRVVGSGGG GGGSDKTHTC
1301 PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMSRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
1351 WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK
1401 ALPAPIEKTI SKAKQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD
1451 IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDS DGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS
1501 VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG K*

```

ES 2 753 124 T3

Tabla 17: Secuencia de nucleótidos de FVIII 265 (molécula de cadena sencilla de FVIII con pentaglicinas en el extremo N) (SEQ ID NO: 102)

1	ATGCAAAATAG	AGCTCTCCAC	CTGCTTCITT	CTGTGCCTTT	TGCGATTCTG
51	CTTTAGTGGG	GGAGGAGGAG	GAGCCACCAG	AAGATACTAC	CTGGGTGCAG
101	TGGAAGTGTG	ATGGGACTAT	ATGCAAAGTG	ATCTCGGTGA	GCTGCCTGTG
151	GACGCAAGAT	TTCCTCCTAG	AGTGCCAAAA	TCTTTTCCAT	TCAACACCTC
201	AGTCGTGTAC	AAAAAGACTC	TGTTTGTAGA	ATTCACGGAT	CACCTTTTCA
251	ACATCGCTAA	GCCAAGGCCA	CCCTGGATGG	GTCTGCTAGG	TCCTAGCATC
301	CAGGCTGAGG	TTTATGATAC	AGTGGTCATT	ACACTTAAGA	ACATGGCCTC
351	CCATCCTGTC	AGTCTTCATC	CTGTTGGTGT	ATCCTACTGG	AAAGCTTCTG
401	AGGGAGCTGA	ATATGATGAT	CAGACCAGTC	AAAGGGAGAA	AGAAGATGAT
451	AAAGTCTTCC	CTGGTGGGAG	CCATACATAT	GTCTGGCAGG	TCCTGAAAGA
501	GAATGGTCCA	ATGGCCTCTG	ACCCACTGTG	CCTTACCTAC	TCATATCTTG
551	CTCATGTGGA	CCTGGTAAAA	GACTTGAATT	CAGGCCCTCAT	TGGAGCCCTA
601	CTAGTATGTA	GAGAAGGGAG	TCTGGCCAAG	GAAAAGACAC	AGACCTTGCA
651	CAAAATTTATA	CTACTTTTTC	CTGTATTIGA	TGAAGGGAAA	AGTTGGCACT
701	CAGAAACAAA	GAACCTCTTC	ATGCAGGATA	GGGATGCTGC	ATCTGCTCGG
751	GCCTGGCCTA	AAATGCACAC	AGTCAATGGT	TATGTAAACA	GGTCTCTGCC
801	AGGTCTGATT	GGATGCCACA	GGAAATCAGT	CTATTGGCAT	GTGATTGGAA
851	TGGGCACCAC	TCCTGAAGTC	CACTCAATAT	TCCTCGAAGG	TCACACATTT
901	CTTGTGAGGA	ACCATCGCCA	GGCGTCCITG	GAAATCTCGC	CAATAACTTT
951	CCTTACTGCT	CAAACTCTCT	TGATGGACCT	TGGACAGTTT	CTACTGTTTT
1001	GTCATATCTC	TGCCACCATA	CATGATGGCA	TGGAAGCTTA	TGTCAAAAGTA
1051	GACAGCTGTC	CAGAGGAACC	CCAACTACGA	ATGAAAAATA	ATGAAGAAGC
1101	GGAAAGACTAT	GATGATGATC	TTACTGATTC	TGAAATGGAT	GTGGTCAGGT
1151	TTGATGATGA	CAACTCTCCI	TCCTTTAATC	AAATTCGCTC	AGTTGCCAAG
1201	AAGCATCCTA	AAACTTGGGT	ACATTACATT	GCTGCTGAAG	AGGAGGACTG
1251	GGACTATGCT	CCCTTAGTCC	TGCGCCCGCA	TGACAGAAGT	TATAAAAGTA
1301	AATATTTGAA	CAATGGCCCT	CAGCGGATTG	GTAGGAAGTA	CAAAAAAGTC
1351	CGATTTATGG	CATACACAGA	TGAAACCTTT	AAGACTCGTG	AAGCTATTCA
1401	GCATGAATCA	GGAACTTTGG	GACCTTTACT	TTATGGGGAA	GTTGGAGACA
1451	CACTGTTGAT	TATATTTAAG	AATCAAGCAA	GCAGACCATA	TAACATCTAC
1501	CCTCACGGAA	TCACTGATGT	CCGTCTTTTG	TATTCAAAGG	GATTACCAAA
1551	AGGTGTAAAA	CATTTGAAGG	ATTTTCCAAT	TCTGCCAGGA	GAAATATTC
1601	AATATAAATG	GACAGTGAAT	GTAGAAGATG	GGCCAACTAA	ATCAGATCCT
1651	CGGTGCCTGA	CCCGCTATTA	CTCTAGTTTC	GTTAATATGG	AGAGAGATCT
1701	AGCTTCAGGA	CTCATTGGCC	CTCTCCTCAT	CTGCTACAAA	GAATCTGTAG
1751	ATCAAAGAGG	AAACCAGATA	ATGTCAGACA	AGAGGAATGT	CATCTGTGTT
1801	TCTGTATTTG	ATGAGAACCG	AAGCTGGTAC	CTCACAGAGA	ATATAACAAG
1851	CTTTCTCCCC	AATCCAGCTC	GAGTGCAGCT	TGAGGATCCA	GAGTTCCAAG
1901	CCTCCAACAT	CATGCACAGC	ATCAATGGCT	ATGTTTTTGA	TAGTTTGCAG
1951	TTGTCAGTTT	GTTTGCATGA	GGTGGCATA	TGGTACATTC	TAAGCATTTG
2001	AGCACAGACT	GACTTCCCTT	CTGTCTTCTT	CTCTGGATAT	ACCTTCAAAC
2051	ACAAAATGGT	CTATGAAGAC	ACACTCACCC	TATTCCCATT	CTCAGGAGAA
2101	ACTGTCTTCA	TGTCGATGGA	AAACCCAGGT	CTATGGATTC	TGGGGTGCCA
2151	CAACTCAGAC	TTTCGCAACA	CAGGCATGAC	CGCCTTACTC	AAGCTTTCTA
2201	GTGTGACAAA	GAACACTGGT	GATTATTACG	AGGACAGTTA	TGAAGATATT
2251	TCAGCATACT	TGCTGAGTAA	AAACAATGCC	ATTGAACCAA	GAAGCTTCTC
2301	TCAAAAACCA	CCAGTCTTGA	AGGCCCATCA	GGCCGAAATA	ACTCGTACTA
2351	CTCTTCAGTC	AGATCAAGAC	GAAATGACT	ATGATGATAC	CATATCAGTT
2401	GAAATGAAGA	AGGAAGATTT	TGACATTTAT	GATGAGGATG	AAAATCAGAG
2451	CCCCCGCAGC	TTTCAAAAAG	AAACACGACA	CTATTTTATT	GCTGCAGTGG
2501	AGAGGCTCTG	GGATTATGGG	ATGAGTAGCT	CCCCACATGT	CTAAGAAATC
2551	AGGGCTCAGA	GTGGCAGTGT	CCCTCAGTTC	AAGAAAGTTG	TTTTCCAGGA
2601	ATTTACTGAT	GGCTCCTTTA	CTCAGCCCTT	ATACCGTGGG	GAACATAAAT
2651	AACATTTGGG	CCTCCTCGGC	CCATATATAA	GAGCAGAAGT	TGAAGATAAT
2701	ATCATGGTAA	CTTTCAGAAA	TCAGGCCCTC	CGTCCCATT	CCTTCTATT
2751	TAGCCTTATT	TCTTATGAGG	AAGATCAGAG	GCAAGGAGCA	GAACCTAGAA
2801	AAAACCTTGT	CAAGCCTAAT	GAAACCAAAA	CTTACTTTTG	GAAAGTGCAA

ES 2 753 124 T3

2851	CATCATATGG	CACCCACTAA	AGATGAGTTT	GACTGCAAAG	CCTGGGCTTA
2901	TTTCTCTGAT	GTTGACCTGG	AAAAAGATGT	GCACTCAGGC	CTGATTGGAC
2951	CCCTTCTGGT	CTGCCACACT	AACACACTGA	ACCTTGCTCA	TGGGAGACAA
3001	GTGACAGTAC	AGGAATTTGC	TCTGTTTTTC	ACCATCTTTG	ATGAGACCAA
3051	AAGCTGGTAC	TTCAGTAAA	ATATGGAAAG	AAACTGCAGG	GCTCCCTGCA
3101	ATATCCAGAT	GGAAGATCCC	ACTTTTAAAG	AGAATTATCG	CTTCCATGCA
3151	ATCAATGGCT	ACATAATGGA	TACACTACCT	GGCTTAGTAA	TGGCTCAGGA
3201	TCAAAGGATT	CGATGGTATC	TGCTCAGCAT	GGGCAGCAAT	GAAAACATCC
3251	ATTCTATTCA	TTTCAGTGGG	CATGTGTTCA	CTGTACGAAA	AAAAGAGGAG
3301	TATAAAATGG	CACTGTACAA	TCTCTATCCA	GGTGTTTTGG	AGACAGTGGG
3351	AATGTTACCA	TCCAAAGCTG	GAATTTGGCG	GGTGAATGC	CTTATTGGCG
3401	AGCATCTACA	TGCTGGGATG	AGCACACTTT	TTCTGGTGTA	CAGCAATAAG
3451	TGTCAGACTC	CCCTGGGAAT	GGCTTCTGGA	CACATTAGAG	ATTTTCAGAT
3501	TACAGCTTCA	GGACAATATG	GACAGTGGGC	CCCAAAGCTG	GCCAGACTTC
3551	ATTATTCGGG	ATCAATCAAT	GCCTGGAGCA	CCAAGGAGCC	CTTTTCTTGG
3601	ATCAAGGTGG	ATCTGTTGGC	ACCAATGATT	ATTCACGGCA	TCAAGACCCA
3651	GGGTGCCCGT	CAGAAGTTCT	CCAGCCTCTA	CATCTCTCAG	TTTATCATCA
3701	TGTATAGTCT	TGATGGGAAG	AAGTGGCAGA	CTTATCGAGG	AAATTCCTACT
3751	GGAACCTTAA	TGGTCTTCTT	TGGCAATGTG	GATTCATCTG	GGATAAAAACA
3801	CAATATTTTT	AACCCTCCAA	TTATTGCTCG	ATACATCCGT	TTGCACCCAA
3851	CTCATTATAG	CATTCGCAGC	ACTCTTCGCA	TGGAGTTGAT	GGGCTGTGAT
3901	TTAAATAGTT	GCAGCATGCC	ATTGGGAATG	GAGAGTAAAG	CAATATCAGA
3951	TGCACAGATT	ACTGCTTCAT	CCTACTTTAC	CAATATGTTT	GCCACCTGGT
4001	CTCCTTCAAA	AGCTCGACTT	CACCTCCAAG	GGAGGAGTAA	TGCCTGGAGA
4051	CCTCAGGTGA	ATAATCCAAA	AGAGTGGCTG	CAAGTGGACT	TCCAGAAGAC
4101	AATGAAAGTC	ACAGGAGTAA	CTACTCAGGG	AGTAAAATCT	CTGCTTACCA
4151	GCATGTATGT	GAAGGAGTTC	CTCATCTCCA	GCAGTCAAGA	TGGCCATCAG
4201	TGGACTCTCT	TTTTTCAGAA	TGGCAAAGTA	AAGGTTTTTC	AGGGAAATCA
4251	AGACTCCTTC	ACACCTGTGG	TGAACCTCT	AGACCCACCG	TTACTGACTC
4301	GCTACCTTCG	AATTCACCCC	CAGAGTTGGG	TGCACCAGAT	TGCCCTGAGG
4351	ATGGAGGTTT	TGGGCTGCGA	GGCACAGGAC	CTCTACTGA	

Tabla 18: Secuencia de proteínas de FVIII 265 (molécula de cadena sencilla de FVIII con pentaglicinas en el extremo N; pentaglicina mostrada en negrita) (SEQ ID NO: 103)

1	MQIELSTCFF	LCLLRFCFSG	GGGG ATRRYY	LGAVELSWDY	MQSDLGELPV
51	DARFPPRVPK	SFPFNSTSVVY	KKTLFVEFTD	HLFNIAKPRP	PWMGLLGPTI
101	QAEVYDVTVI	TLKNMASHPV	SLHAVGVSYW	KASEGAEYDD	QTSQREKEDD
151	KVFPGGSHTY	VWQVLKENG	MASDPLCLTY	SYLSHVDLVK	DLNSQLIGAL
201	LVCREGSLAK	EKTQTLHKFI	LLFAVFDEGK	SWHSETKNSL	MQDRDAASAR
251	AWPKMHTVNG	YVNRSLPLGI	GCHRKSVYWH	VIGMGTTPEV	HSIFLEGHTF
301	LVRNHRQASL	EISPITFLTA	QTLMLDLGQF	LLFCHISSHQ	HDGMEAYVKV
351	DSCPEEPQLR	MKNNEEAEDY	DDDLTDSEMD	VVRFDDDNSP	SFIQIRSVAK
401	KHPKTWVHYI	AAEEEDWDYA	PLVLPAPDRS	YKSQYLNNGP	QRIGRKYKVV
451	RFMAYTDEF	KTREAIQHES	GILGPLLYGE	VGDTLLLIIFK	NQASRPYNIY
501	PHGITDVRPL	YSRRLPKGVK	HLKDFPILPG	EIFKYKWTVT	VEDGPTKSDP
551	RCLTRYSSSF	VNMRDLASG	LIGPLLCYK	ESVDQRGNQI	MSDKRNVILF
601	SVFDENRSWY	LTENIQRFPL	NPAGVQLEDP	EFQASNIMHS	INGYVFDLSQ
651	LSVCLHEVAY	WYILSIGAQT	DFLSVFFSGY	TFKHKMVYED	TLTLFPFSGE
701	TVFMSMENPG	LWILGCHNSD	FRNRGMTALL	KVSSCDKNTG	DYYEDSYEDI
751	SAYLLSKNNA	IEPRSFQNP	PVLKAHQAEI	TRTTLQSDQE	EIDYDDTISV
801	EMKKEFDIY	DEDENQSPRS	FQKKTRHYFI	AAVERLWDYG	MSSSPHVLRN
851	RAQSGSVPQF	KKVVFQFTD	GSFTQPLYRG	ELNEHLGLLG	PYIRAEVEDN
901	IMVTFRNQAS	RPYSFYSSLI	SYEEDQRQGA	EPRKNFVKPN	ETKTYFWKVQ
951	HMAPTKDEF	DCKAWAYFSD	VDLEKDVHSG	LIGPLLVCHT	NTLNPAGHRQ
1001	VTVQEFALFF	TIFDETKSWY	FTENMERNCR	APCNIQMEDP	TFKENYRFHA
1051	INGYIMDTLP	GLVMAQDQRI	RWYLLSMGSN	ENIHSIHFSG	HVFTVRKKEE
1101	YKMALYNLYP	GVFETVEMLP	SKAGIWRVEC	LIGELHLHAGM	STLFLVYSNK
1151	CQTPLGMSAG	HIRDFQITAS	GQYGQWAPKL	ARLHYSGSIN	AWSTKEPFSW
1201	IKVDLLAPMI	IHGIKTQGAR	QKFSSLYISQ	FIIMYSLDGK	KWQTYRGNST
1251	GTLMVFFGNV	DSSGIKHNIF	NPPIIARYIR	LHPHYSIRS	TLRMELMGCD
1301	LNSCSMPLGM	ESKAISDAQI	TASSYFTNMF	ATWSFSKARL	HLQGRSNAWR
1351	PQVNNPKEWL	QVDFQKTMKV	TGVTTQGVKS	LLTSMYVKEF	LISSSQDGHQ
1401	WTLFFQNGKV	KVFQGNQDSF	TPVVNSLDPP	LLTRYLRIHP	QSWVHQIALR
1451	MEVLGCEAQD	LY*			

Ejemplo 20: Estabilidad en plasma y FC de FVIII198 en plasma de HemA y de inactivación doble (DKO) en FVIII/VWF

5 Se comparó la estabilidad en plasma de FVIII 198 (que es una molécula de FVIII Fc de cadena sencilla que contiene dominio B parcial-226N6; donde 226 representa los 226 aminoácidos del extremo N del dominio B de FVIII y N6 representa los seis sitios de N-glucosilación en el dominio B) con FVIII Fc de cadena sencilla (FVIII 155/Fc) en plasma de inactivación doble en FVIII/VWF (DKO). Se puede observar la representación esquemática de FVIII155 y FVIII198 en la Figura 25.

10 Para el ensayo de estabilidad, se incubaron 5 UI/mL de proteínas FVIII 198 o FVIII Fc con plasma de ratón o DKO a 37 °C. Se recogieron alícuotas en diferentes puntos de tiempo para la medición de actividad por ensayo cromogénico de FVIII. Se midió la actividad en cada momento de tiempo por duplicado y se representó la actividad promedio en función del tiempo. En el ensayo de estabilidad, la presencia de dominio B parcial aumentó la estabilidad de FVIII Fc de cadena sencilla (Figura 26A).

15 También se comparó la semivida de FVIII 198 (de cadena sencilla-B226N6) con FVIII155 (FVIII de dominio B delecionado de cadena sencilla) en ratones DKO. FVIII 198 tiene una semivida al menos aproximadamente 1,5 veces más larga en comparación con FVIII155 (Figura 26B). Estos experimentos sugieren que podría haber una correlación entre la estabilidad de FVIII y su semivida *in vivo*.

Secuencia de nucleótidos de FVIII198 (FVIII Fc con dominio B parcial, 226N6) (SEQ ID NO: 104)

```

1   ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGATTCTG
51  CTTTAGTGCC ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG
101 ACTATATGCA AAGTGATCTC GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCTT
151 CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC ACCTCAGTCG TGTACAAAAA
201 GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC GCTAAGCCAA
251 GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT
351 TCATGCTGTT GGTGTATCCT ACTGAAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG
401 ATGATCAGAC CAGTCAAAGG GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCTGGT
451 GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG AAAGAGAATG GTCCAATGGC
501 CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT GTGGACCTGG
551 TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT
651 TTTTGCTGTA TTTGATGAAG GAAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT
701 CCTTGATGCA GGATAGGGAT GCTGCATCTG CTCGGGCCTG GCCTAAAAATG
751 CACACAGTCA ATGGTTATGT AACAGGTCT CTGCCAGGTC TGATTGGATG
801 CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGAATGGGC ACCACTCTCTG
    
```

ES 2 753 124 T3

851 AAGTGCACCTC AATATTCCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
901 CGCCAGGCCGT CCTTGGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCCTTA CTGCTCAAAC
951 ACTCTTGATG GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCAT ATCTCTTCCC
1001 ACCAACATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG
1051 GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA GAAGCGGAAG ACTATGATGA
1101 TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT GATGACAACT
1151 CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACT
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT
1251 AGTCCTCGCC CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAAACAATG
1301 GCCCTCAGCG GATTGGTAGG AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAAC
1351 ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT ATTCAGCATG AATCAGGAAT
1401 CTTGGGACCT TACTTTTATG GGGAAAGTTG AGACACACTG TTGATATATAT
1451 TTAAGAAATCA AGCAAGCAGA CCATAAFAACA TCTACCCITCA CGGAATFCACI
1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTTC AAGGAGATTA CCAAAAAGGTG TAAAAACATTT
1551 GAAGGAIITTT CCAAITCTGC CAGGAGAAAAT AITCAAATAAI AAATGGACAG
1601 TGACTGTAGA AGATGGGCCA ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCCG
1651 TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA GATCTAGCTT CAGGACTCAT
1701 TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA AGAGGAAAACC
1751 AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCAATCC
1851 AGCTGGAGTG CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCAGC
1901 ACAGCATCAA TGGCTATGTT TTTGATAGTT TGCAAGTTGC AGTTTGTTTG
1951 CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCCTAAGC ATTGAGCAGC AGACTGACTT
2001 CCTTTCTGTG TCTTCTCTG GATATACTTT CAAAACAAAA ATGGTCTATG
2051 AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAAACTGT CTTTATGTGCG
2101 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAACCT CAGACTTTCCG
2151 GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACTA
2201 CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTTTCCG ATACTTGCTG
2251 AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC TTCTCTCAGA ATTCAGACA
2301 CCCTAGCACT AGGCAAAAAGC AATTTAATGC CACCACAATT CCAGAAAATG
2351 ACATAGAGAA GACTGACCCCT TGGTTTGCAC ACAGAACACC TATGCTTAAA
2401 ATACAAAATG TCTCCTCTAG TGATTTGTTG ATGCTCTTGC GACAGAGTCC
2451 TACTCCACAT GGGCTATCCT TATCTGATCT CCAAGAAGCC AAATATGAGA
2501 CTTTTTCTGA TGATCCATCA CCTGGAGCAA TAGACAGTAA TAACGCTCTG
2551 TCTGAAATGA CACACTTCAG GCCACAGCTC CATCACAGTG GGGACATGGT
2601 ATTTACCCCT GAGTCAGGCC TCCAATTAAG ATTAATGAG AAACCTGGGG
2651 CCACTGCAGC AACAGAGTTG AAGAACTTG ATTTCAAAGT TTCTAGTACA
2701 TCAAATAATC TGATTTCAAC AATTCATCA GACAATTTGG CAGCAGGTAC
2751 TGATAATACA AGTTCCTTAG CACCCCAAG TATGCCAGTT CATTATGATA
2801 GTCAATTAGA TACCACCTTA TTTGGCAAAA AGTCATCTCC CCTTACTGAG
2851 TCTGGTGGAC CTCTGAGCTT GAGTGAAGAA AATAATGATT AAGATTTGTT
2901 AGAATCAGGT TTAATGAATA GCCAAGAAAG TTCATGGGGA AAAAATGTAT
2951 CGTCAGAAAT AACTCGTACT ACTCTCAGT CAGATCAAGA GGAATTTGAC
3001 TATGATGATA CCATATCAGT TGAATGAAG AAGGAAGATT TTGACATTTA
3051 TGATGAGGAT GAAAATCAGA GCCCCCGCAG CTTTCAAAAAG AAAACACGAC
3101 ACTATTTTAT TGCTGCAGTG GAGAGGCTCT GGGATTATGG GATGAGTAGC
3151 TCCCCACATG TTCTAAGAAA CAGGGCTCAG AGTGGCAGTG TCCCTCAGTT
3201 CAAGAAAAGTT GTTTTCCAGG AATTTACTGA TGGCTCCTTT ACTCAGCCCT
3251 TATACCGTGG AGAACTAAAT GAACATTTGG GACTCCTGGG GCCATATATA
3301 AGAGCAGAAG TTGAAGATAA TATCATGGTA ACTTTTCAAG ATCAGGCCCTC
3351 TCGTCCCTAT TCCTTCTATT CTAGCCTTAT TTCTTATGAG GAAGATCAGA
3401 GGCAAGGAGC AGAACCTAGA AAAAACTTTG TCAAGCCTAA TGAAACCAAA
3451 ACTTACTTTT GGAAGTGCA ACATCATATG GCACCCACTA AAGATGAGTT
3501 TGACTGCAAA GCCTGGGCTT ATTTCTCTGA TGTTGACCTG GAAAAAGATG
3551 TGCACTCAGG CCTGATTGGA CCCCCTCTGG TCTGCCACAC TAACACACTG
3601 AACCTGCTC ATGGGAGACA AGTGACAGTA CAGGAATTTG CTCTGTTTTT
3651 CACCATCTTT GATGAGACCA AAAGCTGGTA CTTCACTGAA AATATGAAAA
3701 GAAACTGCAG GGCTCCCTGC AATATCCAGA TGGAAAGATCC CACTTTTAAA
3751 GAGAATTATC GCTTCCATGC AATCAATGGC TACATAATGG ATACACTACC
3801 TGGCTTAGTA ATGGCTCAGG ATCAAAGGAT TCGATGGTAT CTGCTCAGCA
3851 TGGGCAGCAA TGA AACATC CATTCTATT CATTTCAGTGG ACATGTGTTT
3901 ACTGTACGAA AAAAAGAGGA GTATAAAATG GCACTGTACA ATCTCTATCC
3951 AGGTGTTTTT GAGACAGTGG AAATGTTACC ATCCAAAGCT GGAATTTGGC
4001 GGGTGGAAATG CCTTATTGGC GAGCATCTAC ATGCTGGGAT GAGCACACTT
4051 TTTCTGGTGT ACAGCAATAA GTGTCAGACT CCCCCTGGGAA TGGCTTCTGG
4101 ACACATTAGA GATTTTCAGA TTACAGCTTC AGGACAATAT GGACAGTGGG
4151 CCCCAAAGCT GGCCAGACTT CATTATTCGG GATCAATCAA TGCCTGGAGC

ES 2 753 124 T3

```

4201   ACCAAGGAGC CCTTTTCTTG GATCAAGGTG GATCTGTTGG CACCAATGAT
4251   TATTCAACGGC ATCAAGACCC AGGGTGCCTG TCAGAAAGTTC TCCAGCCTCT
4301   ACATCTCTCA GTTTATCATC ATGTATAGTC TTGATGGGAA GAAGTGGCAG
4351   ACTTATCGAG GAAATTCCAC TGGAACCTTA ATGGTCTTCT TTGGCAATGT
4401   GGATTTCATCT GGGATAAAAC ACAATATTTT TAACCCTCCA ATTATTGCTC
4451   GATACATCCG TTTGCACCCA ACTCATATA GCATTCGCAG CACTCTTCGC
4501   ATGGAGTTGA TGGGCTGTGA TTTAAATAGT TGCAGCATGC CATTGGGAAT
4551   GGAGAGTAAA GCAATATCAG ATGCACAGAT TACTGCTTCA TCCTACTTTA
4601   CCAATATGTT TGCCACCTGG TCTCCTCAA AAGCTCGACT TCACCTCCAA
4651   GGGAGGAGTA ATGCCTGGAG ACCTCAGGTG AATAATCCAA AAGAGTGGCT
4701   GCAAGTGGAC TTCCAGAAGA CAATGAAAGT CACAGGAGTA ACTACTCAGG
4751   GAGTAAAATC TCTGCTTACC AGCATGTATG TGAAGGAGTT CCTCATCTCC
4801   AGCAGTCAAG ATGGCCATCA GTGGACTCTC TTTTTCAGA ATGGCAAAGT
4851   AAAGTTTTT CAGGGAAATC AAGACTCCTT CACACCTGTG GTGAACCTC
4901   TAGACCCACC GTTACTGACT CGCTACCTTC GAATTCACCC CCAGAGTTGG
4951   GTGCACCAGA TTGCCCTGAG GATGGAGGTT CTGGGCTGCG AGGCACAGGA
5001   CCTCTACGAC AAAACTCACA CATGCCACC GTGCCAGCT CCAGAACTCC
5051   TGGGCGGACC GTCAGTCTTC CTCTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC
5101   ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA
5151   CGAAGACCCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC
5201   ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCCT
5251   GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAAGG
5301   GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAAA
5351   CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACACAGGT GTACACCCTG
5401   CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC CAGTTCAGCC TGACCTGCTT
5451   GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
5501   GGCAGCCGGA GAACAACACT AAGACCACGC CTCCCGTGTG GGACTCCGAC
5551   GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
5601   GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTCACAACC
5651   ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGTAAATG A

```

Secuencia de proteínas de FVIII 198 (SEQ ID NO: 105)

```

1      MQIELSTCFE LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51     PRVPKSFPFN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMLG LGPTIQAEVY
101    DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151    GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201    GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251    HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPPEVHSIFL EGTFLVLRNH
301    RQASLEISPI TFLTAQTLIM DLGQFLFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCEPE
351    EPQLRMKNNE EABDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401    WVHYIAABEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451    TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIIYHGIT
501    DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551    YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601    NRSWYLTEI QRFLEPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQSLVCL
651    HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEBDTLTLF PFSGLETSPMS
701    MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYIED SYEDISAYLL
751    SKNNAIEPRS FSQNSRHPST RQKQFNATTI PENDIEKTD PFAHRTMPPK
801    IQNVSSDDL MLRLQSPTPH GLSLSDLQEA KYETFSDDPS PGAIDSNNSL
851    SEMTHFRPQL HHSQDMVFTP ESGLQLRLNE KLGTTAATEL KKLDFKVSST
901    SNNLISTIPS DNLAAGTDNT SSLGPPSMPV HYDSQLDRTL FGKKSPLTE
951    YGGPLSLSEE NNSKLLLESG LMNSQESSWG KNVSEITRT TLQSDQBEID
1001   YDDTISVEMK KEDFDIYDED ENQSPRSFQK KTRHYFIAAV ERLWDYGMSS
1051   SPHVLNRNAQ SSVVPQFKKV VFQEFDTGSE TQPLYRGELN EHLGLLGPYI
1101   RAEVEDNIMV TFRNQASRPY SFYSSLISYE EDQRQGAEP RKNFVKNETK
1151   TYFWKVOHHM APTKDEFDCK AWAYFSDVDL EKDVHSLIG PLLVCHTNTL
1201   NPAHGRQVTV QEFALFFTIF DETKSWYFTE NMERNCRAPC NIQMEDPTFK
1251   ENYRPHAING YIMDTLPGLV MAQDQIRWY LLSMGSNENI HSIHFSGHVF
1301   TVRKKEEYKM ALYNLYPGVF ETVEMLPSKA GIWRVECLIG EHLHAGMSTL
1351   FLVYSNKQCT PLGMASGHIR DFQITASGQY GQWAPKLARL HYSGSINAW
1401   TKEPFSWIKV DLLAPMIIHG IKTQGARQKF SSLYISQFII MYSLDGKKWQ
1451   TYRGNSTGTL MVFFGNVDSS GIKHNIENPP I IARYIRLHP THYSIRSTLR
1501   MELMGCDLNS CSMPLGMESE AISDAQITAS SYFTNMFATW SPSKARLHLQ
1551   GRSNAWRPQV NNPKEWLQVD FQKTMKVTGV TTQGVKSLLT SMYVKEFLIS
1601   SSQDGHQWTL FFQNGKVKVF QCNQDSFTPV VNSLDPPLLT RYLRIHPQSW
1651   VHQIALRMEV LGCEAQDLYD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPKPKDRTL

1701   MISRTEPVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
1751   VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
1801   PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD
1851   GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK*

```

5 Ejemplo 21. Expresión de proteína D1D2 de VWF

Es esencial el apropiado plegamiento del dominio D'D3 para su unión a FVIII. Se requiere el propéptido de VWF (D1D2-aminoácidos 1-763) para la eficiente formación de enlaces disulfuro y plegamiento de D'D3. Actúa como una chaperona interna para el plegamiento de D'D3. Las construcciones de VWF que preparan los fragmentos de VWF

ES 2 753 124 T3

pueden o expresarse donde el propéptido VWF (es decir, dominio D1D2) se une directamente al dominio D'D3 y se retira durante el procesamiento intracelular regular de D'D3 (es decir, en cis), o se puede expresar a partir de otro plásmido, es decir, en trans. Los presentes inventores diseñaron el heterodímero FVIII-VWF de tal forma que D1D2 se puedan expresar en cis o en trans.

- 5 Clonación de VWF 053: El clon VWF 053 expresa el propéptido VWF (dominio D1D2) para expresión en trans de D1D2 . Se amplificó por PCR el propéptido VWF a partir de la longitud completa usando ESC 54 y ESC124.

ESC54-VWF directo con sitio BsiW1 (SEQ ID NO: 111)

(CGCTTCGCGACGTACGGCCGCCACCATGATTCTGCCAGATTTGCCGGGGTGCTGCTTGCTC)

Oligonucleótido de clonación ESC 124 - D1D2 con Not1 sitio-inverso (SEQ ID NO: 112)

- 10 (CTAGACTCGAGCGGCCGCTCACCTTTTGCTGCGATGAGACAGGGGACTGCTGAGGACAGC)

Se digirió el producto de PCR con BsiW1 y Not1 y se unió en pcDNA 4 digerido con BsiW1/Not1.

Secuencia de nucleótidos de VWF 053 (VWF D1D2-propéptido) (SEQ ID NO: 113)

```

1   ATGATTCCTG CCAGATTTGC CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCTCATTTTT
51  GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACTCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC
101 GATGCAGCCT TTTCCGGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG
151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA
201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC
251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTTTGACA TCCATTTGTT TGTCAATGGT
301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAGG
351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT
401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCTGTCTG
451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTAAACAT
501 CTTTGCTGAA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC
551 CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT
601 GAACGGGCAT CTCTCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT
651 GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT
701 TTGCCCGCTG CCACCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT
751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCTGC
801 CCTCCTGGAG TACGCCCGGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGTGTACG
851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG

901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT
951 CAATGAAATG TGTGAGGAGC GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG
1001 GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC
1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG
1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT
1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTC ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC
1201 AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCGGGA
1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG
1301 ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGTCCG TCACCGTCCG GCTGCCTGGC
1351 CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA
1401 TTGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC
1451 ATACAGTGAC GGCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
1501 GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC
1551 CGGGAAGACC TGCGGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG
1601 ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCGGAGC CCCGGGTGGA GGACTTCGGG
1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGACTGCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG
1701 GCATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT
1751 GCGCGGTCTT GACGTCCCC ACATTCGAGG CCTGCCATCG TGCCGTACAGC
1801 CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA
1851 CGGCCGCGAG TGCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCCTGCG
1901 CGGGGAGAGG CGTGCGCGTC GCGTGGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG
1951 AACTGCCCCA AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TGCGGGACCC CCTGCAACCT
2001 GACCTGCCGC TCTCTCTCTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCTGCC
2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC
2101 TGCGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA
2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGTAC TGTGAGGATG
2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC
2251 GCTGTCCCTA GCAGTCCCCT GTCTCATCGC AGCAAAAGG

```

Secuencia de proteínas de VWF 053 (VWF D1D2-Propéptido) (SEQ ID NO: 114)

```

1     MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
51    YSFAGYCSYL LAGGCQKRSE SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101   TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
151   SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
201   ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
251   ERTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME
301   YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLEDEG LCVESTTEPC
351   VHSQKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
401   NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFIVIVETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451   LHNSLVKCLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGDG RIQHTVTVASV RLSYGEDLQM
501   DWDGRGRLLV KLSPEVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
551   NAWKLHGDCQ DLQKQHSDFC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
601   PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL
651   NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701   CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
751   AVLSSPLSHR SKR
    
```

5 La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará tan completamente la naturaleza general de la invención que otros puedan, aplicando conocimiento dentro de la experiencia de la técnica, modificar y/o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones dichas realizaciones específicas, sin excesiva experimentación, sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por tanto, dichas adaptaciones y modificaciones pretenden estar dentro del significado e intervalo de equivalentes de las realizaciones desveladas, basadas en la enseñanza y orientación presentada en el presente documento. Se debe entender que la fraseología o terminología en el presente documento es con el fin de descripción y no de limitación, de forma que la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva se debe interpretar por el experto en vista de las enseñanzas y orientación.

10 Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva y práctica de la invención desvelada en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren como a modo de ejemplo solo, con un alcance y espíritu verdadero de la invención que se indica por las siguientes reivindicaciones.

15 Listado de secuencias

<110> Biogen Idec MA Inc. CHHABRA, EKTA SETH LIU, TONGYAO PETERS, ROBERT

<120> POLIPÉPTIDOS QUIMÉRICOS DE FACTOR VIII Y USOS DE LOS MISMOS

20 <130> 2159.359PC04/EKS/C-K/E-H

<140> Por asignar

<141> 11-01-2013

25 <150> US 61/586.099

<151> 12-01-2012

<150> US 61/586.654

<151> 13-01-2012

30

<150> US 61/667.901

<151> 03-07-2012

ES 2 753 124 T3

<150>US 61/734.954

<151> 07-12-2012

<160> 114

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 16842

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt gccagggacc      60
ctttgtgcag aaggaactcg cggcaggtca tccacggccc tactaaggac ggtctaaacg      120
gccccacgac gaacgagacc gggagtaaaa cggtcctctg gaaacacgtc ttcttgagc      180
gccgtccagt aggtgccggg gatgcagcct tttcggaagt gacttcgtca acacetttga      240
tgggagcatg tacagctttg cgggatactg cagttacctc ctggcagggg gctgccagaa      300
ctacgtcggg aaagccttca ctgaagcagt tgtggaaact accctcgtac atgtcgaaac      360
gccctatgac gtcaatggag gaccgtcccc cgaaggctct acgctccttc tcgattattg      420
gggacttcca gaatggcaag agagtgagcc tctcogtcta tcttggggaa ttttttgaca      480
tccatttggt tgtcaatggt tgcgaggaag agctaataac ccctgaaggt cttaccgttc      540
tctcaactcg agaggcacat agaaccctt aaaaaactgt aggtaaacaa acagttacca      600
accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg gctgtatcta      660
gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct tggcactgtg tccccctggt      720
ttctcagagg tacgggatac ggaggtttcc cgacatagat ctttgactcc gacctatgat      780
gttcgacagg ccaactccgga atggctttgt ggccaggatc gatggcagcg gcaactttca      840

```

ES 2 753 124 T3

agtctgctg tcagacagat acttcaacaa gacctgctgg ctgtgtggca actttaacat	900
taccgaaaca ccggtcctag ctaccgtcgc cgttgaaagt tcaggacgac agtctgtcta	960
tgaagttgtt ctggacgccc gacacaccgt tgaattgta ctttgctgaa gatgacttta	1020
tgaccaaga agggacctg acctcgacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga	1080
gcagtggaga acagtgggtg gaaacgactt ctactgaaat actgggttct tccctggaac	1140
tggagcctgg gaatactgaa acggttgagt acccgagact cgtcacctct tgtcaccaca	1200
gaacgggcat ctctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat gcagaagggc	1260
ctgtgggagc agtgccagct totgaagagc acctcggtgt cttgcccgta gaggagggtc	1320
gtcgagtacg ttgtagagga gacccttta cgtcttcccg gacaccctcg tcacggtcga	1380
agacttctcg tggagccaca ttgcccctg ccaccctctg gtggaccccg agccttttgt	1440
ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg tgctgggggg ctggagtgcg cctgccctgc	1500
aacggggcag ggtgggagac cacctggggc tcggaaaaca ccgggacaca ctcttctgaa	1560
acacactcac acgaccccc gacctcacgc ggacgggagc cctcctggag tacgcccgga	1620
cctgtgccca ggagggaatg gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgacgccag	1680
tgtgccctgc tggatggag ggaggacctc atgcgggcct ggacacgggt cctcccttac	1740
cacgacatgc cgacctggt ggtgtcgcgc acgtcgggtc acacgggagc accatacctc	1800
tataggcagt gtgtgtccc ttgcccagg acctgccaga gcctgcacat caatgaaatg	1860
tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgccctgagg atatccgtca cacacagggg	1920
aacgcggtcc tggacggtct cggacgtgta gttactttac acagtcctcg ctacgcacct	1980
accgacgtcg acgggactcc gacagctcct ggatgaaggc ctctgcgtgg agagcaccga	2040
gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgeta cctcccgc acctccctct ctcgagactg	2100
ctgtcgagga cctacttccg gagacgcacc tctcgtggct cacagggagc cacgtaaggc	2160
ctttcgcgat gggagggccg tggagggaga gagctctgac caacacctgc atttgccgaa	2220
acagccagtg gatctgcagc aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc actggtcaat	2280
cccacttcaa gagctttgac gttgtggacg taaacggctt tgtcggtcac ctacagctcg	2340
ttacttctta caggtcccct cacggaacag tgaccagtta gggatgaagt ctcgaaactg	2400
aacagatact tcacctcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga ttgccaggac	2460
cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg ttgtctatga agtgggaagtc	2520
accctagacg gtcattggac accgggccct aacggctctg gtgaggaaga ggtaacagta	2580
actctgacag gtcacacgac atgaccgcga cgtctgtgtc acccgctccg tcaccgtccg	2640
gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtgaa actgaagcat ggggcaggag ttgccatgga	2700

ES 2 753 124 T3

tactggcgtc gcgacacacg tgggcgaggc agtggcaggc cgacggaccg gacgtgttgt 2760
 cggaacactt tgacttcgta ccccgctctc aacggtaacct tggccaggac atccagctcc 2820
 ccctcctgaa aggtgacctc cgcattccagc atacagtgac ggcctccgtg cgcctcagct 2880
 acggggagga cctgcagatg accggctctg taggtcgagg gggaggactt tccaactggag 2940
 gcgtaggctg tatgtcactg ccggaggcac gcggagtcca tgccccctct ggacgtctac 3000
 gactgggatg gccgcgggag gctgctggtg aagctgtccc ccgtctatgc cgggaagacc 3060
 tgccggcctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg ctgaccctac cggcgcctct 3120
 cgacgaccac ttcgacaggg ggcagatacg gcccttctgg acgccggaca caccettaat 3180
 gttaccgttg gtcccgtgc acttccttac cccctctggg ctggcrgagc cccgggtgga 3240
 ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg ggactgccag gacctgcaga agcagcacag 3300
 tgaaggaatg ggggagaccg gaccgyctcg gggccacact cctgaagccc ttgcggacct 3360
 tcgacgtgcc cctgacggtc ctggacgtct tcgtcgtgtc cgatccctgc gccctcaacc 3420
 cgcgcatgac caggttctcc gaggaggcgt gcgcggctct gacgtcccc acattcgagg 3480
 cctgccatcg tgccgtcagc gctagggacg cgggagttgg gcgcgtactg gtccaagagg 3540
 ctctccgca cgcgccagga ctgcaggggg tgtaaagctcc ggacggtagc acggcagtcg 3600
 ccgctgccct acctgcggaa ctgccgtac gacgtgtgct cctgctcggg cggccgcgag 3660
 tgctgtgctg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctcgc ggcgacggga tggacgcctt 3720
 gacggcgatg ctgcacacga ggacgagcct gccggcgctc acggacacgc cgcgggaccg 3780
 gtcgatacgg cgcgccagc cggggagagg cgtgcgcgtc gcgtggcgcg agccaggccc 3840
 ctgtgagctg aactgccca aaggccagggt gtacctgcag tgcgggaccc cctgcaacct 3900
 gccctctcc gcacgcgcag cgcaccgcgc tcggctccgg gacactcgac ttgacgggct 3960
 ttccggtcca catggacgtc accccctggg ggacgttggg gacctgccgc tctctctctt 4020
 acccgatga ggaatgcaat gaggcctgcc tggagggctg cttctgcccc ccagggtctt 4080
 acatggatga gaggggggac ctggacggcg agagagagaa tgggcctact ccttacgtta 4140
 ctccggacgg acctcccac gaagacgggg ggtcccgaga tgtacctact ctccccctg 4200
 tgctgcccc aggccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca gccagaagac 4260
 atcttctcag accatcacac catgtgctac tgtgaggatg acgcacgggt tccgggtcac 4320
 ggggacaatg atactgccac tctagaaggc cggctctctg tagaagagtc tggtagtgtg 4380
 gtacacgatg acactcctac gcttcatgca ctgtaccatg agtggagtcc ccggaagctt 4440
 gctgctgac gctgtctca gcagtcccct gtctcatcgc agcaaaagga gcctatcctg 4500
 cgaagtacgt gacatggtac tcacctcagg gcccttcgaa cgacggactg cgacaggagt 4560
 cgtcagggga cagagtagcg tcgttttctt cggataggac tcggccccc atggtcaagc 4620

ES 2 753 124 T3

tggtgtgtcc	cgctgacaac	ctgcgggctg	aagggtctga	gtgtaccaaa	acgtgccaga	4680
actatgacct	ggagtgcattg	agccgggggg	taccagttcg	accacacagg	gcgactgttg	4740
gacgccccac	ttccccgagct	cacatggttt	tgacaggtct	tgatactgga	cctcacgtac	4800
agcatgggct	gtgtctctgg	ctgcctctgc	ccccggggca	tggtccggca	tgagaacaga	4860
tgtgtggccc	tggaaagggtg	tccctgcttc	catcagggca	tcgtaccoga	cacagagacc	4920
gacggagacg	gggggcccgt	accaggccgt	actcttctct	acacaccggg	acctttccac	4980
agggacgaag	gtagtcccgt	aggagtatgc	ccttgagaaa	acagtgaaga	ttggctgcaa	5040
cacttgtgtc	tgctgggacc	ggaagtggaa	ctgcacagac	catgtgtgtg	atgccacgtg	5100
tcctcatacg	gggacctctt	tgtcacttct	aaccgacgtt	gtgaacacag	acagccctgg	5160
ccttcacctt	gacgtgtctg	gtacacacac	tacgggtgcac	ctccacgatc	ggcatggccc	5220
actacctcac	cttcgacggg	ctcaaatacc	tgttccccgg	ggagtgccag	tacgttctgg	5280
tgcaggatta	ctgcggcagt	gaggtgctag	cgtaccggg	tgatggagtg	gaagctgccc	5340
gagtttatgg	acaagggggc	cctcacggtc	atgcaagacc	acgtcctaata	gacgcccgtca	5400
aaccctggga	cctttcggat	cctagtgggg	aataagggat	gcagccaccc	ctcagtgaaa	5460
tgcaagaaac	gggtcaccat	cctggtggag	ggaggagaga	ttgggaccct	ggaaagccta	5520
ggatcacccc	ttattcccta	cgctcgtggg	gagtcacttt	acgttctttg	cccagtggta	5580
ggaccacctc	cctcctctct	ttgagctgtt	tgacggggag	gtgaatgtga	agaggcccat	5640
gaaggatgag	actcactttg	aggtggtgga	gtctggccgg	tacatcattc	tgctgctggg	5700
aactcgacaa	actgcccctc	cacttacact	tctccgggta	cttcctactc	tgagtgaaac	5760
tccaccacct	cagaccggcc	atgtagtaag	acgacgacct	caaagccctc	tccgtggtct	5820
gggaccgcca	cctgagcattc	tccgtggtcc	tgaagcagac	ataccaggag	aaagtgtgtg	5880
gcctgtgtgg	gaatthttag	gtttcgggag	aggcaccaga	ccctggcggg	ggactcgtag	5940
aggcaccagg	acttcgtctg	tatggtcctc	ttcacacac	oggacacacc	cttaaaacta	6000
ggcatccaga	acaatgacct	caccagcagc	aacctccaag	tggaggaaga	ccctgtggac	6060
tttgggaact	cctggaaagt	gagctcgcag	tgtgctgaca	ccgtaggtct	tgttactgga	6120
gtggtcgtcg	ttggaggttc	acctccttct	gggacacctg	aaacccttga	ggacctttca	6180
ctcgagcgtc	acacgactgt	ccagaaaagt	gcctctggac	tcacccctg	ccacctgcca	6240
taacaacatc	atgaagcaga	cgatggtgga	ttcctcctgt	agaatcctta	ccagtgcagt	6300
ggctctttca	cggagacctg	agtaggggac	ggtggacggg	attgtttag	tacttcgtct	6360
gctaccacct	aaggaggaca	tottaggaat	ggtcactgca	cttcaggac	tgcaacaagc	6420
tggtggaccc	cgagccatat	ctggatgtct	gcatttacga	cacctgctcc	tgtgagtcca	6480

ES 2 753 124 T3

ttggggactg cgctgcttc gaaggtcctg acgttgctcg accacctggg gctcggata 6540
 gacctacaga cgtaaatgct gtggacgagg aactcaggt aacctctgac gcgacgaag 6600
 tggacacca ttgctgccta tgccacgtg tgtgccagc atggcaaggt ggtgacctg 6660
 aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga acgctgtggt aacgacggat 6720
 acgggtgac acacgggtcg taccgttcca ccactggacc tcctgccggt gtaacacggg 6780
 ggtctcgacg ctctctcct atctccggga gaacgggtat gagtgtgagt ggcgctataa 6840
 cagctgtgca cctgcctgtc aagtacgtg tcagaccct gagccactgg cctgcctgt 6900
 tagaggccct ctggccata ctcaactca ccgcgatatt gtcgacacgt ggacggacag 6960
 ttcagtgac agtcgtggga ctgggtgacc ggacgggaca gcagtgtgtg gagggtgcc 7020
 atgccactg cctccaggg aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgacctg 7080
 aagactgtcc agtgtgtgag cgtcacacac ctcccgacgg tacgggtgac gggaggtccc 7140
 ttttaggacc tactcgaaa cgtctggacg caactgggac ttctgacag tcacacactc 7200
 gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaaag aaagtacct tgaatccag tgacctgag 7260
 cactgccaga ttggccactg tgatgttgc aacctcacct caccgaccg ccgaaaacg 7320
 gagtcccttc ttctcagtga acttaggtc actgggactc gtgacggtct aaacgggtgac 7380
 actacaacag ttggagtgga gtgaagcctg ccaggagccg ggaggcctgg tgggtcctcc 7440
 cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct gtatgtggag gacatctcg aaccgctt 7500
 cacttcggac ggtcctcggc cctccggacc accacggagg gtgtctacgg ggccactcgg 7560
 ggtggtgaga catacacctc ctgtagagcc ttggggcaa gcacgattc tactgcagca 7620
 ggctactgga cctggctctc ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagttg 7680
 aagtgtgaa ggcctttgtg cgtgctaaag atgacgtcgt ccgatgacct ggaccagaag 7740
 gacgacctac cgaggaggtc cgacaggctc cgactcaaac ttacgactt ccgaaacac 7800
 gtggacatga tggagcggct gcgcactctc cagaagtggg tccgcgtggc cgtggtggag 7860
 taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc cacctgtact acctcgcca 7920
 cgcgtagagg gtcttcaacc aggcgcaccg gcaccacctc atggtgctgc cgagggtgcg 7980
 gatgtagccc gagttcctgg ggaagcgacc gtcagagctg cggcgcattg ccagccaggt 8040
 gaagtatgcy ggcagccagg tgccctccac cagcgggtc ttgaaataca cactgttcca 8100
 ccttcgctgg cagtctcgac gccgcgtaac ggtcgggtcca ctccatacgc ccgtcggtec 8160
 accggaggtg gtcgctccag aactttatgt gtgacaaggt aatcttcagc aagatcgacc 8220
 gccctgaagc ctcccgcac gccctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt 8280
 ccggaactt tgtccgctac ttagaagtcg ttctagctgg cgggacttcg gaggcgtag 8340
 cgggacgagg actaccggtc ggtcctcggg gttgcctaca gggccttga acaggcgatg 8400

ES 2 753 124 T3

gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccgg tgggcattgg gcccctgcc	8460
aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggcccctg caggcccgg acttcttctt	8520
cttccagtaa cactagggcc acccgtaacc cggggtagcg ttggagtctg tctaggcggg	8580
gtagctcttc gtccggggac agaacaaggc ctctgtgctg agcagtgtgg atgagctgga	8640
gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct ctgtgacctt gccctgaag cccctcctcc	8700
tcttgttccg gaagcacgac tcgtcacacc tactcgacct cgtcgtttcc ctgctctagc	8760
aatcgatgga gacctggaa cggggacttc ggggaggagg tactctgcc cccgacatgg	8820
cacaagtcac tgtgggcccg gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact	8880
ccatggttct ggatgtggcg atgagacggg gggctgtacc gtgttcagtg acaccgggc	8940
cccgagaacc cccaaagctg ggaccccggg ttctccttga ggtaccaaga cctacaccgc	9000
ttcgtcctgg aagatcggg caaaattggt gaagccgact tcaacaggag caaggagttc	9060
atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg gccaggaca aagcaggacc ttcttagcct	9120
gttttaacca ctccggctga agttgtcctc gttcctcaag tacctcctcc actaagtcgc	9180
ctacctacac ccggtcctgt gcatccacgt cacggtgctg cagtactcct acatggtgac	9240
cgtggagtac ccctcagcg aggcacagtc caaaggggac atcctgcagc gggtgcgaga	9300
cgtaggtgca gtgccacgac gtcattgagga tgtaccactg gcacctcatg ggaagtgcg	9360
tccgtgtcag gtttcccctg taggacgtcg cccacgctct gatccgctac cagggcggca	9420
acaggaccaa cactgggctg gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc	9480
agggtgaccg ggagcagggc ctaggcgatg gtcccgcctg tgtcctggtt gtgaccgcg	9540
cgggacgcca tggagagact ggtgtcgaag aaccagtcgg tcccactggc cctcgtccgc	9600
cccaacctgg tetacatggt caccggaat cctgcctctg atgagatcaa gaggtgcct	9660
ggagacatcc aggtggtgcc cattggagtg gccctaata gggttggacc agatgtacca	9720
gtggccttta ggacggagac tactctagtt ctccgacgga cctctgtagg tccaccaggy	9780
gtaacctcac ccgggattac ccaactgca ggagctggag aggattggct ggccaatgc	9840
ccctatcctc atccaggact ttgagacgct cccccgagag gctcctgacc tgggtctgca	9900
ggttgcacgt cctcgacctc tcctaaccga ccgggttacg gggataggag taggtcctga	9960
aactctgcga ggggctctc cgaggactgg accacgacgt gaggtgctgc tccggagag	10020
gggtgcagat ccccaacctc tcccctgcac ctgactgcag ccagcccctg gacgtgatcc	10080
ttctcctgga tggctcctcc ctccacgacg aggcctctcc ccgacgtcta ggggtgggag	10140
aggggacgtg gactgacgtc ggtcggggac ctgcactagg aagaggacct accgaggag	10200
agtttcccag cttcttattt tgatgaaatg aagagtttcg ccaaggcttt catttcaaaa	10260

ES 2 753 124 T3

gccaatatag ggcctcgtct cactcaggtg tcagtgtctg tcaaagggtc gaagaataaa 10320
 actactttac ttctcaaagc ggttccgaaa gtaaagtttt cggttatata ccggagcaga 10380
 gtgagtcacc agtcacgacg agtatggaag catcaccacc attgacgtgc catggaacgt 10440
 ggtcccggag aaagcccatt tgetgagcct tgtggacgtc atgcagcggg agggaggccc 10500
 tcataccttc gtagtgtgg taactgcacg gtacottgca ccagggcctc tttcgggtaa 10560
 acgactcggg acacctgcag tacgtcggcc tcctccggg cagccaaatc ggggatgcct 10620
 tgggcctttg tgtgcgatac ttgacttcag aaatgcatgg tgccaggccg ggagcctcaa 10680
 agggcgtggt catcctcgtc gtcggtttag cccctacgga acccgaaacg acacgctatg 10740
 aactgaagtc tttacgtacc acggtccggc cctcggagtt tccgccacca gtaggaccag 10800
 acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc caacagagtg 10860
 acagtgttc ctattggaat tgagatcgc tacgatgcag tgctgcaga gacacctaag 10920
 tcacctacgt cgtcgactac ggcgggtccag gttgtctcac tgtcacaagg gataacctta 10980
 acctctagc atgctacgtc cccagctacg gatcctggca ggcccagcag gccactcaa 11040
 cgtggtgaag ctccagcga tcaagacct ccctaccatg gtcaccttg gcaattcctt 11100
 gggtcgatgc ctagaaccgt ccgggtcgtc cgtgaggtt gcaccacttc gaggtcgtt 11160
 agcttctgga gggatgttac cagtggaaac cgttaaggaa cctccacaaa ctgtgctctg 11220
 gatttgttag gatttgcata gatgaggatg ggaatgagaa gaggccggg gacgtctgga 11280
 ccttgccaga ccagtgccac ggaggtggtt gacacgagac ctaaaacatc ctaaacttac 11340
 ctactctac ccttactctt ctccgggccc ctgcagacct ggaacggctt ggtcacgggtg 11400
 accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcacgggt caactgtgac 11460
 cgggggctga ggccttcgtg ccctaacagc cagtcccctg tggcactgaa cggtcgggtc 11520
 accggtctgg aacgacttct cagttagcca gttgacactg gccccgact ccggaagcac 11580
 gggattgtcg gtcaggggac ttaaagtgga agagacctgt ggtgcccgt ggacctgcc 11640
 ctgygtgtgc acaggcagct ccaactcggca catcgtgacc tttgatggg agaatttcaa 11700
 aatttcacct tctctggaca ccgacggcga cctggacggg gacrcacacg tgtccgtcga 11760
 ggtgagccgt gtagcactgg aaactaccg tcttaaagt gctgactggc agctgttctt 11820
 atgtctatt tcaaaacaag gacgaggacc tggaggtgat tctccataat ggtgcctgca 11880
 gccctggagc aaggcagggc cgactgaccg tcgacaagaa tacaggataa agttttgttc 11940
 ctcgtcctgg acctccacta agaggtatta ccacggacgt cgggacctcg ttccgtccc 12000
 tgcatgaaat ccatcgaggt gaagcacagt gccctctccg tcgagstgca cagtgacatg 12060
 gaggtgacgg tgaatgggag actggctctt gttccttacg acgtacttta ggtagctcca 12120
 cttcgtgtca cgggagaggc agctcsacgt gtcactgtac ctccactgcc acttacctc 12180

ES 2 753 124 T3

tgaccagaga caaggaatgc tgggtgggaa catggaagtc aacgtttatg gtgccatcat 12240
 gcatgaggtc agattcaatc accttggtea catcttcaca ttcactccac aaaacaatga 12300
 acccaccctt gtaccttcag ttgcaaatac cacggtagta cgtactccag tctaagttag 12360
 ttgaaccagt gtagaagtgt aagtgaggtg ttttgttact gttccaactg cagctcagcc 12420
 ccaagacttt tgcttcaaag acgtatggtc tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca 12480
 atgacttcat gctgagggat caaggttgac gtcogagtcgg ggttctgaaa acgaagtttc 12540
 tgcataccag acacacccta gacactactc ttgcctcggg tactgaagta cgactcccta 12600
 ggcacagtca ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca gcggccaggg 12660
 cagacgtgcc agcccatcct ggaggagcag tgtcttgtcc ccgtgtcagt ggtgtctgac 12720
 cttttgtgaa caagtcctta cctgacacgt cgcgggtccc gtctgcacgg tcgggtagga 12780
 cctcctcgtc acagaacagg ccgacagctc ccactgccag gtcctcctct taccactgtt 12840
 tgctgaatgc cacaaggtcc tggctccagc cacattctat gccatctgcc agcaggacag 12900
 ggctgtcag ggtgacggtc caggaggaga atggtgacaa acgacttacg gtgttcaggg 12960
 accgaggtcg gtgtaagata cggtagacgg tcgtcctgtc ttgccaccag gagcaagtgt 13020
 gtgaggtgat cgcctcttat gccacacctc gtcggaccaa cggggtctgc gttgactgga 13080
 ggacacctga tttctgtgct aacgggtggtc ctcgttcaca cactccacta gcggagaata 13140
 cgggtggaga cagcctggtt gcccagacg caactgacct cctgtggact aaagacacga 13200
 atgtcatgcc caccatctct ggtctacaac cactgtgagc atggctgtcc ccggcactgt 13260
 gatggcaacg tgagctcctg tggggaccat ccctccgaag tacagtacgg gtggtagaga 13320
 ccagatgttg gtgacactcg taccgacagg ggcctgaca ctaccgttgc actcgaggac 13380
 acccctgta gggaggcttc gctgtttctg ccctccagat aaagtcatgt tggaggcag 13440
 ctgtgtccct gaagaggcct gcactcagtg cattggtgag gatggagtcc agcaccagtt 13500
 cgacaaaagac gggagggtcta tttcagtaca acctccgtc gacacagga cttctccgga 13560
 cgtgagtcac gtaaccactc ctacctcagg tcgtggtcaa cctggaagcc tgggtcccgg 13620
 accaccagcc ctgtcagatc tgcacatgcc tcagcgggag gaaggtcaac tgcacaacgc 13680
 agccctgccc cacggccaaa ggaccttcgg acccagggcc tgggtggtcgg gacagtctag 13740
 acgtgtacgg agtcgcccgc cttccagttg acgtgttgcg tcgggacggg gtgccggttt 13800
 gctcccacgt gtggcctgtg tgaagtagcc cgcctccgcc agaatgcaga ccagtgtctc 13860
 cccgagtatg agtgtgtgtg tgacctcagtg agctgtgacc cgagggtgca caccggacac 13920
 acttcategg gcggaggcgg tottacgtct ggtcacgacg gggctcatac tcacacacac 13980
 actgggtcac tcgacactgg tgccccaggt gcctcactgt gaacgtggcc tccagcccac 14040

ES 2 753 124 T3

actgaccaac cctggcgagt gcagacccaa cttcacctgc gcctgcagga aggaggagt 14100
acgggggtca cggagtgaca cttgcaccgg aggtcgggtg tgactggttg ggaccgctca 14160
cgtctgggtt gaagtggacg cggacgtcct tcctcctcac caaaagagtg tccccaccct 14220
cctgcecccc gcaccgtttg cccacccttc ggaagaccca gtgtgtgat gagtatgagt 14280
gtgcctgcaa ctgtgtcaac gttttctcac aggggtggga ggacgggggg cgtggcaaac 14340
gggtgggaag ccttctgggt cactgacctc ctcatactca cacggacgtt gacacagttg 14400
tccacagtga gctgtccctt tgggtacttg gcctcaaccg ccaccaatga ctgtggctgt 14460
accacaacca cctgccttcc cgacaagggt tgtgtccacc aggtgtcact cgacagggga 14520
acctatgaac cggagttggc ggtggttact gacaccgaca tgggtgttgt ggacggaagg 14580
gctgttccac acacaggtgg gaagcaccat ctaccctgtg ggccagttct gggaggaggg 14640
ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga ggatgccgtg atgggcctcc gcgtggccca 14700
cttcgtggta gatgggacac ccggtcaaga ccctcctccc gacgctacac acgtggacgt 14760
ggctgtacct cctacggcac taccggagg cgaccgggt gtgctcccag aagccctgtg 14820
aggacagctg tcggtcgggc ttcacttacg ttctgcatga aggcgagtgc tgtggaagg 14880
gcctgccatc tgctgtgag cactgagggtc ttcgggacac tcctgtcgac agccagcccc 14940
aagtgaatgc aagacgtact tccgctcacg acaccttcca cggacggtag acggacactc 15000
tgggtgactg gctcaccgcg gggggactcc cagtcttctt ggaagagtgt cggctcccag 15060
tgggcctccc cggagaaccc ctgcctcatc aatgagtgtg caccactgac cgagtggcgc 15120
ccccctgagg gtcagaagga ccttctcaca gccgagggtc acccggaggg gcctcttggg 15180
gacggagtag ttactcacac tccgagtga ggaggaggtc tttatacaac aaaggaacgt 15240
ctctgcccc cagctggagg tccctgtctg cccctcgggc tttcagctga gctgtaagac 15300
aggctcactt cctcctccag aaatatgtt tttccttgca gaggacgggg gtcgacctcc 15360
agggacagac ggggagcccc aaagtgcact cgacattctg ctacagctgc tgcccaagct 15420
gtcgtgtgta gcgcatggag gcctgcatgc tcaatggcac tgtcattggg cccggaaga 15480
ctgtgatgat cgatgtgtgc gactgcacg acgggttcga cagcgacact cgcgtacctc 15540
cggacgtacg agttaccgtg acagtaaccg gggcccttct gacactacta gctacacacg 15600
acgacctgcc gctgcatggt gcagggtggg gtcactctct gattcaagct ggagtgcagg 15660
aagaccacct gcaaccctg cccctgggt tacaaggaag tgetggacgg cgacgtacca 15720
cgtccacccc cagtagagac ctaagttcga cctcacgtcc ttctgggtga cgttggggac 15780
gggggaccca atgttctctc aaaataacac aggtgaatgt tgtgggagat gtttgcttac 15840
ggcttgacac attcagctaa gaggaggaca gatcatgaca ctgaagcgtg atgagacgt 15900
ttttattgtg tccacttaca acaccctcta caaacggatg ccgaacgtgg taagtcgatt 15960

ES 2 753 124 T3

ctcctcctgt ctagtactgt gacttcgcac tactctgcga ccaggatggc tgtgatactc 16020
 acttctgcaa ggtcaatgag agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc 16080
 caccctttga tgaacacaag ggtcctaccg aactatgag tgaagacggt ccagttactc 16140
 tctcctctca tgaagaccct cttctcccag tgtccgacgg gtgggaaact acttgtgttc 16200
 tgtcttgctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgctgtga cacatgtgag 16260
 gagcctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg acagaacgac tccctccatt 16320
 ttaatacttt taagggtccgt ggacgacact gtgtacactc ctggactca cgttgtgtga 16380
 gtgacgggtcc gacgtcatac tcaagggtggg aagctgtaag tctgaagtag aggtggatat 16440
 ccactactgc cagggcaaat gtgccagcaa agccatgtac tccattgaca tcaacgatgt 16500
 agttccacc ttcgacattc agacttcac tccacctata ggtgatgacg gtcccgttta 16560
 cacggtcgtt tcggtacatg aggtaactgt agttgctaca gcaggaccag tgctcctgct 16620
 gctctccgac acggacggag cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg 16680
 tgtaccatga ggttctcaat cgtcctggtc acgaggacga cgagaggctg tgctgcctc 16740
 ggttacgtcc accgggacgt gacgtgggta ccgagacaac acatggtact ccaagagtta 16800
 gccatggagt gcaaatgctc cccaggaag tgcagcaagt ga 16842

<210> 2

<211> 2813

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (1)..(22)

<223> Péptido señal de VWF

<220>

<221> característica_misc

15 <222> (23)..(763)

<223> Región D1D2 de VWF

<220>

<221> característica_misc

20 <222> (764)..(866)

<223> Dominio D' de VWF

<220>

<221> característica_misc

<222> (867)..(1240)

<223> Dominio D3 de VWF

5

<220>

<221> característica_misc

<222> (1241)..(1479)

<223> Dominio A1 de VWF

10

<220>

<221> característica_misc

<222> (2016)..(2016)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que existe de forma natural

15

<400> 2

ES 2 753 124 T3

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
 20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
 35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
 50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
 65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
 85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
 100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
 115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
 130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
 145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
 165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
 180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
 195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
 210 215 220

ES 2 753 124 T3

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
 225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
 245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
 260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
 275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
 290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
 305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
 325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
 340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
 355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
 370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
 385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
 405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
 420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
 435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
 450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
 465 470 475 480

ES 2 753 124 T3

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

ES 2 753 124 T3

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
 740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
 755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
 770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
 785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
 805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
 820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
 835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
 850 855 860

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
 865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
 885 890 895

Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
 900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
 915 920 925

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
 930 935 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
 945 950 955 960

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
 965 970 975

His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val

ES 2 753 124 T3

		980						985						990			
Cys	Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asp	Gly	Ile	Gln	Asn	Asn	Asp	Leu	Thr		
		995					1000						1005				
Ser	Ser	Asn	Leu	Gln	Val	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Asp	Phe	Gly	Asn			
	1010					1015					1020						
Ser	Trp	Lys	Val	Ser	Ser	Gln	Cys	Ala	Asp	Thr	Arg	Lys	Val	Pro			
	1025					1030					1035						
Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Ala	Thr	Cys	His	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Gln			
	1040					1045					1050						
Thr	Met	Val	Asp	Ser	Ser	Cys	Arg	Ile	Leu	Thr	Ser	Asp	Val	Phe			
	1055					1060					1065						
Gln	Asp	Cys	Asn	Lys	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Tyr	Leu	Asp	Val			
	1070					1075					1080						
Cys	Ile	Tyr	Asp	Thr	Cys	Ser	Cys	Glu	Ser	Ile	Gly	Asp	Cys	Ala			
	1085					1090					1095						
Cys	Phe	Cys	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Tyr	Ala	His	Val	Cys	Ala	Gln			
	1100					1105					1110						
His	Gly	Lys	Val	Val	Thr	Trp	Arg	Thr	Ala	Thr	Leu	Cys	Pro	Gln			
	1115					1120					1125						
Ser	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Asn	Gly	Tyr	Glu	Cys	Glu			
	1130					1135					1140						
Trp	Arg	Tyr	Asn	Ser	Cys	Ala	Pro	Ala	Cys	Gln	Val	Thr	Cys	Gln			
	1145					1150					1155						
His	Pro	Glu	Pro	Leu	Ala	Cys	Pro	Val	Gln	Cys	Val	Glu	Gly	Cys			
	1160					1165					1170						
His	Ala	His	Cys	Pro	Pro	Gly	Lys	Ile	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln			
	1175					1180					1185						
Thr	Cys	Val	Asp	Pro	Glu	Asp	Cys	Pro	Val	Cys	Glu	Val	Ala	Gly			
	1190					1195					1200						
Arg	Arg	Phe	Ala	Ser	Gly	Lys	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Pro	Ser	Asp			
	1205					1210					1215						

ES 2 753 124 T3

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr
1235 1240 1245

Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser
1250 1255 1260

Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu
1265 1270 1275

Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe
1280 1285 1290

Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg
1295 1300 1305

Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
1310 1315 1320

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser
1325 1330 1335

Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln
1340 1345 1350

Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile
1355 1360 1365

Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu
1370 1375 1380

Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val
1385 1390 1395

Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro
1400 1405 1410

Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile
1415 1420 1425

Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val
1430 1435 1440

Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys
1445 1450 1455

ES 2 753 124 T3

Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met
 1460 1465 1470

Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu
 1475 1480 1485

Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu
 1490 1495 1500

Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys
 1505 1510 1515

Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp
 1520 1525 1530

Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val
 1535 1540 1545

Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln
 1550 1555 1560

Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr
 1565 1570 1575

Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser
 1580 1585 1590

Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr
 1595 1600 1605

Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile
 1610 1615 1620

Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu
 1625 1630 1635

Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp
 1640 1645 1650

Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg
 1655 1660 1665

Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala
 1670 1675 1680

Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly
 1685 1690 1695

ES 2 753 124 T3

Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe
 1700 1705 1710

Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr
 1715 1720 1725

Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val
 1730 1735 1740

Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val
 1745 1750 1755

Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala
 1760 1765 1770

Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala
 1775 1780 1785

Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val
 1790 1795 1800

Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn
 1805 1810 1815

Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala
 1820 1825 1830

Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val
 1835 1840 1845

Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu
 1850 1855 1860

Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile
 1865 1870 1875

Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp
 1880 1885 1890

Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly
 1895 1900 1905

Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu
 1910 1915 1920

Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu

ES 2 753 124 T3

1925						1930						1935			
Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser 1940 1945 1950															
Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu 1955 1960 1965															
Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp 1970 1975 1980															
Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg 1985 1990 1995															
Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser 2000 2005 2010															
Val Glu Xaa His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu 2015 2020 2025															
Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr 2030 2035 2040															
Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile 2045 2050 2055															
Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser 2060 2065 2070															
Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys 2075 2080 2085															
Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val 2090 2095 2100															
Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg 2105 2110 2115															
Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys Leu Val 2120 2125 2130															
Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala 2135 2140 2145															
Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys 2150 2155 2160															

ES 2 753 124 T3

Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala
 2165 2170 2175

Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp
 2180 2185 2190

Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val
 2195 2200 2205

Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn
 2210 2215 2220

Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro
 2225 2230

Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala
 2240 2245 2250

Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu
 2255 2260

Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys
 2270 2275 2280

Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr
 2285 2290

Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg
 2300 2305 2310

Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp
 2315 2320 2325

Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly
 2330 2335 2340

Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe
 2345 2350 2355

Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro
 2360 2365 2370

Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys
 2375 2380 2385

Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val
 2390 2395 2400

ES 2 753 124 T3

Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys
 2405 2410 2415

Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His
 2420 2425 2430

Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys
 2435 2440 2445

Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu
 2450 2455 2460

Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg
 2465 2470 2475

Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg
 2480 2485 2490

Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly
 2495 2500 2505

Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser
 2510 2515 2520

Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu
 2525 2530 2535

Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu
 2540 2545 2550

Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser
 2555 2560 2565

Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met
 2570 2575 2580

Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp
 2585 2590 2595

Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser
 2600 2605 2610

Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro
 2615 2620 2625

Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg
 2630 2635 2640

ES 2 753 124 T3

Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile
 2645 2650 2655

Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr
 2660 2665 2670

His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys
 2675 2680 2685

Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala
 2690 2695 2700

Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr
 2705 2710 2715

Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr
 2720 2725 2730

Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His
 2735 2740 2745

Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp
 2750 2755 2760

Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg
 2765 2770 2775

Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val
 2780 2785 2790

Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro
 2795 2800 2805

Arg Lys Cys Ser Lys
 2810

<210> 3

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido

10

<400> 3

Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro
 1 5 10

ES 2 753 124 T3

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> polipéptido

<400> 4

10

His Gln Ser Leu Gly Thr Gln
1 5

<210> 5

<211> 8

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

20

<400> 5

His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys
1 5

25

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> polipéptido

<400> 6

35

His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys
1 5

ES 2 753 124 T3

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
5
<220>
<223> polipéptido

<400> 7
10
Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln
1 5

<210> 8
<211> 20
15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de PAS
20
<400> 8

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15
Ser Ala Pro Ala
20

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de PAS
30
<400> 9

ES 2 753 124 T3

Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser
20

5 <210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de PAS

10

<400> 10

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala
1 5 10 15

Ser Pro Ser Ser
20

15 <210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Secuencia de PAS

<400> 11

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala
1 5 10 15

25 Ser Pro Ser

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de PAS

<400> 12

5

Ser Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ala Ser Pro Ser Pro
1 5 10 15

Ser Ser Pro Ala
20

<210> 13

<211> 24

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de PAS

15

<400> 13

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala
20

20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia de PAS

<400> 14

ES 2 753 124 T3

Ala Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Pro
1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala
20

<210> 15

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido señal de FVIII

10

<400> 15

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

Cys Phe Ser

15 <210> 16

<211> 2332

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 16

ES 2 753 124 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 753 124 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 2 753 124 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 2 753 124 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 2 753 124 T3

930						935										940
Ser	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Leu	Met	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Ser	Trp	
945					950					955					960	
Gly	Lys	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Glu	Ser	Gly	Arg	Leu	Phe	Lys	Gly	Lys	
				965					970					975		
Arg	Ala	His	Gly	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Lys	Asp	Asn	Ala	Leu	Phe	Lys	
			980					985					990			
Val	Ser	Ile	Ser	Leu	Leu	Lys	Thr	Asn	Lys	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Ala	
		995					1000					1005				
Thr	Asn	Arg	Lys	Thr	His	Ile	Asp	Gly	Pro	Ser	Leu	Leu	Ile	Glu		
1010						1015					1020					
Asn	Ser	Pro	Ser	Val	Trp	Gln	Asn	Ile	Leu	Glu	Ser	Asp	Thr	Glu		
1025						1030					1035					
Phe	Lys	Lys	Val	Thr	Pro	Leu	Ile	His	Asp	Arg	Met	Leu	Met	Asp		
1040						1045					1050					
Lys	Asn	Ala	Thr	Ala	Leu	Arg	Leu	Asn	His	Met	Ser	Asn	Lys	Thr		
1055						1060					1065					
Thr	Ser	Ser	Lys	Asn	Met	Glu	Met	Val	Gln	Gln	Lys	Lys	Glu	Gly		
1070						1075					1080					
Pro	Ile	Pro	Pro	Asp	Ala	Gln	Asn	Pro	Asp	Met	Ser	Phe	Phe	Lys		
1085						1090					1095					
Met	Leu	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Ala	Arg	Trp	Ile	Gln	Arg	Thr	His		
1100						1105					1110					
Gly	Lys	Asn	Ser	Leu	Asn	Ser	Gly	Gln	Gly	Pro	Ser	Pro	Lys	Gln		
1115						1120					1125					
Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Pro	Glu	Lys	Ser	Val	Glu	Gly	Gln	Asn	Phe		
1130						1135					1140					
Leu	Ser	Glu	Lys	Asn	Lys	Val	Val	Val	Gly	Lys	Gly	Glu	Phe	Thr		
1145						1150					1155					
Lys	Asp	Val	Gly	Leu	Lys	Glu	Met	Val	Phe	Pro	Ser	Ser	Arg	Asn		
1160						1165					1170					

ES 2 753 124 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 2 753 124 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 2 753 124 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 2 753 124 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 2 753 124 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> 17

<211> 7053

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

ES 2 753 124 T3

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60
 accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120
 ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcoct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180
 acctcagctcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240
 gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat 300
 gatacagtggt tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagctc tcatgctggt 360
 ggtgtatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420
 gagaagaag atgataaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg 480
 aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540
 gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa 600
 gggagtctgg ccaaggaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttctgta 660
 tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat 720
 gctgcactctg ctggggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct 780
 ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgtgat tggaatgggc 840
 accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct 900
 cgccaggcgt ccttggaat ctgcgaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960
 gaccttgac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa 1020
 gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080
 gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat 1140
 gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact 1200
 tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc 1260
 ccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattgtagg 1320
 aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380
 attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaggttg agacacactg 1440
 ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500
 gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaagggtg taaaacattt gaaggatttt 1560
 ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620
 actaaatcag atcctcggtg cctgaccocg tattactcta gtttcgtaa tatggagaga 1680
 gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740
 agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800

ES 2 753 124 T3

aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg 1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt 1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980
attggagcac agactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040
atgggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaactgt cttcatgtcg 2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac 2220
agttatgaag atatttcagc atacttctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc 2280
ttctcccaga attcaagaca ccctagcact aggcaaaagc aatttaatgc caccacaatt 2340
ccagaaaatg acatagagaa gactgaccct tggtttgac acagaacacc tatgcctaaa 2400
atacaaaatg tctcctctag tgatttgtg atgctcttgc gacagagtcc tactccacat 2460
gggctatcct tatctgatct ccaagaagcc aaatatgaga ctttttctga tgatccatca 2520
cctggagcaa tagacagtaa taacagcctg tctgaaatga cacacttcag gccacagctc 2580
catcacagtg gggacatggt atttaccctt gagtcaggcc tccaattaag attaatgag 2640
aaactgggga caactgcagc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttctagtaca 2700
tcaaataatc tgatttcaac aattccatca gacaatttgg cagcaggtagc tgataataca 2760
agttccttag gacccccaaag tatgccagtt cattatgata gtcaattaga taccactcta 2820
tttggcaaaa agtcatctcc ccttactgag tctggtggac ctctgagctt gagtgaagaa 2880
aataatgatt caaagttggt agaatcaggt ttaatgaata gccaaagaaag ttcattgggga 2940
aaaaatgtat cgtcaacaga gagtggtagg ttattttaaag ggaaaagagc tcatggacct 3000
gctttgttga ctaaagataa tgccttattc aaagttagca tctctttggt aaagacaaac 3060
aaaacttcca ataattcagc aactaataga aagactcaca ttgatggccc atcattatta 3120
attgagaata gtccatcagt ctggcaaaa atattagaaa gtgacactga gtttaaaaaa 3180
gtgacacctt tgattcatga cagaatgctt atggacaaaa atgctacagc tttgaggcta 3240
aatcatatgt caaataaaac tacttcatca aaaaacatgg aaatggtcca acagaaaaaa 3300
gagggcccca ttccaccaga tgcacaaaat ccagatatgt cgttctttaa gatgctattc 3360
ttgccagaat cagcaaggtg gatcaaaaag actcatggaa agaactctct gaactctggg 3420
caaggcccca gtccaaagca attagtatcc ttaggaccag aaaaatctgt ggaaggtcag 3480
aatttcttgt ctgagaaaaa caaagtggta gtaggaaaggt gtgaatttac aaaggacgta 3540
ggactcaaaag agatggtttt tccaagcagc agaaacctat ttcttactaa cttggataat 3600
ttacatgaaa ataatacaca caatcaagaa aaaaaatc aggaagaaat agaaaagaag 3660
gaaacattaa tccaagagaa tgtagttttg cctcagatac atacagtgcac tggcactaag 3720

ES 2 753 124 T3

aatttcatga	agaacctttt	cttactgagc	actaggcaaa	atgtagaagg	ttcatatgac	3780
ggggcatatg	ctccagtact	tcaagatfff	aggtcattaa	atgattcaac	aaatagaaca	3840
aagaaacaca	cagctcattt	ctcaaaaaaa	ggggaggaag	aaaacttgga	aggcttgga	3900
aatcaaacca	agcaaattgt	agagaaatat	gcatgcacca	caaggatata	tcctaataca	3960
agccagcaga	atfffgtcac	gcaacgtagt	aagagagctt	tgaaacaatt	cagactccca	4020
ctagaagaaa	cagaacttga	aaaaaggata	attgtggatg	acacctcaac	ccagtggctc	4080
aaaaacatga	aacatttgac	cccgagcacc	ctcacacaga	tagactacaa	tgagaaggag	4140
aaaggggcca	ttactcagtc	toccttatca	gattgcctta	cgaggagtca	tagcatccct	4200
caagcaaata	gatctccatt	accatttgca	aaggtatcat	catttccatc	tattagacct	4260
atatatctga	ccagggctct	attccaagac	aactcttctc	atcttccagc	agcatcttat	4320
agaaagaaag	attctgggggt	ccaagaaagc	agtcatttct	tacaaggagc	caaaaaaat	4380
aacctttctt	tagccattct	aaccttggag	atgactgggt	atcaaagaga	ggttggctcc	4440
ctggggacaa	gtgccacaaa	ttcagtcaca	tacaagaaag	ttgagaacac	tgttctcccg	4500
aaaccagact	tgcccaaac	atctggcaaa	gttgaattgc	ttccaaaagt	tcacatttat	4560
cagaaggacc	tattccctac	ggaaactagc	aatgggtctc	ctggccatct	ggatctcgtg	4620
gaagggagcc	ttcttcaggg	aacagagggg	gcgattaagt	ggaatgaagc	aaacagacct	4680
ggaaaagttc	cctttctgag	agtagcaaca	gaaagctctg	caaagactcc	ctccaagcta	4740
ttggatcctc	ttgcttggga	taaccactat	ggtactcaga	taccaaaga	agagtggaaa	4800
tccaagaga	agtcaccaga	aaaaacagct	tttaagaaaa	aggataccat	tttgtccctg	4860
aacgcttggtg	aaagcaatca	tgcaatagca	gcaataaatg	agggacaaaa	taagcccgaa	4920
atagaagtca	cctgggcaaa	gcaaggtagg	actgaaaggc	tgtgctctca	aaaccacca	4980
gtcttgaaac	gccatcaacg	ggaaataact	cgtactactc	ttcagtcaga	tcaagaggaa	5040
attgactatg	atgataccat	atcagttgaa	atgaagaagg	aagattttga	catttatgat	5100
gaggatgaaa	atcagagccc	ccgcagcttt	caaaagaaaa	cacgacacta	ttttattgct	5160
gcagtggaga	ggctctggga	ttatgggatg	agtagctccc	cacatgttct	aagaaacagg	5220
gctcagagtg	gcagtgtccc	tcagttcaag	aaagttgttt	tccaggaatt	tactgatggc	5280
tcctttactc	agcccttata	ccgtggagaa	ctaaatgaac	atftgggact	cctggggcca	5340
tatataagag	cagaagttga	agataatata	atggtaactt	tcagaaatca	ggcctctcgt	5400
ccctattcct	tctattctag	ccttatttct	tatgaggaag	atcagaggca	aggagcagaa	5460
cctagaaaaa	actttgtcaa	gcctaataga	accaaaaactt	acttttggaa	agtgcaacat	5520
catatggcac	ccactaaaga	tgagtttgac	tgcaaaagcct	gggcttattt	ctctgatggt	5580

ES 2 753 124 T3

gacctgaaa aagatgtgca ctcaggcctg attggacccc ttctggtctg ccacactaac 5640
 aactgaacc ctgctcatgg gagacaagtg acagtacagg aatttgctct gtttttcacc 5700
 atctttgatg agaccaaaag ctggtacttc actgaaaata tggaaagaaa ctgcagggct 5760
 ccctgcaata tccagatgga agatcccact ttaaaagaga attatcgctt ccatgcaatc 5820
 aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctcaggatca aaggattcga 5880
 tggtatctgc tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat 5940
 gtgttcactg tacgaaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccagggt 6000
 gtttttgaga cagtggaaat gttaccatcc aaagctggaa tttggcgggt ggaatgcctt 6060
 attggcgagc atctacatgc tgggatgagc acactttttc tgggtgtacag caataagtgt 6120
 cagactcccc tgggaatggc ttctggacac attagagatt ttcagattac agcttcagga 6180
 caatatggac agtgggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc 6240
 tggagcacca aggagccctt ttcttggatc aaggtggatc tgttggcacc aatgattatt 6300
 cacggcatca agaccaggg tgcccgtcag aagttctcca gcctctacat ctctcagttt 6360
 atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt atcgaggaaa ttccactgga 6420
 accttaatgg tcttctttgg caatgtggat tcatctggga taaaacacaa tatttttaac 6480
 cctccaatta ttgctcgata catccgtttg cacccaactc attatagcat tcgcagcact 6540
 ctctcgatgg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaaatggag 6600
 agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcatect actttaccaa tatgtttgcc 6660
 acctggtctc cttcaaaaagc tcgacttcac ctccaagga ggagtaatgc ctggagacct 6720
 caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca 6780
 ggagtaacta ctcaggaggt aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttcctc 6840
 atctccagca gtcaagatgg ccatcagtgg actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag 6900
 gtttttcagg gaaatcaaga ctccttcaca cctgtggtga actctctaga cccaccgta 6960
 ctgactcgct accttcgaat tcacccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg 7020
 gagttctg gctgcgaggc acaggacctc tac 7053

<210> 18

<211> 1438

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> BDD FVIII

10

<400> 18

ES 2 753 124 T3

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

ES 2 753 124 T3

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

ES 2 753 124 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile
755 760 765

ES 2 753 124 T3

Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp
 770 775 780

Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys
 785 790 795 800

Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly
 805 810 815

Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser
 820 825 830

Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser
 835 840 845

Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu
 850 855 860

Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr
 865 870 875 880

Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile
 885 890 895

Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe
 900 905 910

Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His
 915 920 925

Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe
 930 935 940

Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro
 945 950 955 960

Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln
 965 970 975

Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr
 980 985 990

Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro
 995 1000 1005

Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg
 1010 1015 1020

ES 2 753 124 T3

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
 1145 1150 1155

Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro
 1160 1165 1170

Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His
 1175 1180 1185

Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr
 1190 1195 1200

Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp
 1205 1210 1215

Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe
 1220 1225 1230

Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro
 1235 1240 1245

Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser

ES 2 753 124 T3

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

<210> 19

<211> 4371

5

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> BDD FVIII

10

<400> 19

ES 2 753 124 T3

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60
 accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120
 ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttctt cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180
 acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240
 gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat 300
 gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctgtt 360
 ggtgtatcct actggaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420
 gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggctctg 480
 aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540
 gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag cctactagt atgtagagaa 600
 gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660
 tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaagaact ccttgatgca ggatagggat 720
 gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct 780
 ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgtgat tggaatgggc 840
 accactctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct 900
 cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960
 gaccttgac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacatga tggcatggaa 1020
 gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080
 gaagcggag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat 1140
 gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact 1200
 tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc 1260
 cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtag 1320
 aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380
 attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaaagttg agacacactg 1440
 ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500
 gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaagggtg taaaacattt gaaggatttt 1560
 ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620
 actaaatcag atcctoggtg cctgaccgct tattactcta gtttcgtaa tatggagaga 1680
 gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740
 agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800
 aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttcc tcccacatcc agctggagtg 1860
 cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt 1920
 tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980

ES 2 753 124 T3

atgggagcac agactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040
 atgggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100
 atggaaaacc caggtctatg gattctgagg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160
 atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac 2220
 agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc 2280
 ttctctcaaa acccaccagt ctgaaacgc catcaacggg aaataactcg tactactctt 2340
 cagtcagatc aagaggaaat tgactatgat gataccatat cagttgaaat gaagaaggaa 2400
 gattttgaca tttatgatga ggatgaaaat cagagcccc gcagctttca aaagaaaaca 2460
 cgacactatt ttattgctgc agtggagagg ctctgggatt atgggatgag tagctcccca 2520
 catgttctaa gaaacagggc tcagagtggc agtgtccctc agttcaagaa agttgttttc 2580
 caggaattta ctgatggctc ctttactcag cccttatacc gtggagaact aatgaacat 2640
 ttgggactcc tggggccata tataagagca gaagttgaag ataatatcat ggtaactttc 2700
 agaaatcagg cctctcgtcc ctattccttc tattctagcc ttatttctta tgaggaagat 2760
 cagaggcaag gagcagaacc tagaaaaaac ttgtcaagc ctaatgaaac caaaacttac 2820
 ttttgaaaag tgcaacatca tatggcacc ctaaaagatg agtttgactg caaagcctgg 2880
 gcttatttct ctgatgttga cctggaaaaa gatgtgcact caggcctgat tggaccctt 2940
 ctggtctgcc acactaacac actgaaccct gctcatggga gacaagtgac agtacaggaa 3000
 ttgctctgt tttcaccat ctttgatgag accaaaagct ggtacttcac tgaaaatag 3060
 gaaagaaact gcagggctcc ctgcaatac cagatggaag atcccactt taaagagaat 3120
 tatcgttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct 3180
 caggatcaaa ggattcgtg gtatctgctc agcatgggca gcaatgaaaa catccattct 3240
 attcatttca gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaaag aggagtataa aatggcactg 3300
 tacaatctct atccaggtgt ttttgagaca gtggaaatgt taccatcaa agctggaatt 3360
 tggcgggtgg aatgccttat tggcgagcat ctacatgctg ggatgagcac actttttctg 3420
 gtgtacagca ataagtgtca gactcccctg ggaatggctt ctggacacat tagagatttt 3480
 cagattacag cttcaggaca atatggacag tgggccccea agctggccag acttcattat 3540
 tccggatcaa tcaatgcctg gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg 3600
 ttggcaccaa tgattattca cggcatcaag acccagggtg cccgtcagaa gttctccagc 3660
 ctctacatct ctcagtttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtg gcagacttat 3720
 cgaggaaatt cactggaac cttaatggtc ttctttggca atgtggattc atctgggata 3780
 aaacacaata tttttaacc tccaattatt gctcgataca tccgtttgca cccaactcat 3840
 tatagcattc gcagcactct tcgcatggag ttgatggct gtgatttaa tagttgcagc 3900

ES 2 753 124 T3

atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcacacctac 3960
 tttaccaata tgtttgccac ctggctctct tcaaaagctc gacttcacct ccaagggagg 4020
 agtaatgcct ggagacctca ggtgaataat ccaaagagt ggctgcaagt ggacttccag 4080
 aagacaatga aagtcacagg agtaactact cagggagtaa aatctctgct taccagcatg 4140
 tatgtgaagg agttcctcat ctccagcagt caagatggcc atcagtggac tctctttttt 4200
 cagaatggca aagtaaaggt ttttcagga aatcaagact cttcacacc tgtggtgaac 4260
 tctctagacc caccgttact gactcgctac cttogaattc accccagag ttgggtgcac 4320
 cagattgcc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac aggacctcta c 4371

<210> 20

<211> 500

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> conector

10

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 50 55 60
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 85 90 95
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

ES 2 753 124 T3

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
180 185 190

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
260 265 270

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
275 280 285

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
305 310 315 320

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
325 330 335

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
355 360 365

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
370 375 380

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385 390 395 400

ES 2 753 124 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
405 410 415

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
420 425 430

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
465 470 475 480

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
485 490 495

Gly Gly Gly Ser
500

<210> 21

<211> 800

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> conector

10

<220>

<221> REPETIR

<222> (1)..(300)

<223> Repeticiones de Gly-Gly-Ser 1 a 100 veces

15

<220>

<221> REPETIR

<222> (301)..(800)

<223> Gly-Gly-Repeticiones de Gly-Gly-Ser 1 a 100 veces

20

<400> 21

ES 2 753 124 T3

Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Ser Gly Gly Ser
 35 40 45

Gly Gly Ser Gly
 50 55 60

Gly Ser Gly Gly
 65 70 75 80

Ser Gly Gly Ser
 85 90 95

Gly Gly Ser Gly
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Ser
 130 135 140

Gly Gly Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Ser Gly Gly
 165 170 175

Ser Gly Gly Ser
 180 185 190

Gly Gly Ser Gly
 195 200 205

Gly Ser Gly Gly
 210 215 220

Ser Gly Gly Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly
 245 250 255

Gly Ser Gly Gly
 260 265 270

Ser Gly Gly Ser
 275 280 285

Gly Gly Ser Gly
 290 295 300

ES 2 753 124 T3

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 325 330 335
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 340 345 350
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 355 360 365
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 370 375 380
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 385 390 395 400
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 405 410 415
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 420 425 430
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 435 440 445
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 450 455 460
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 465 470 475 480
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 485 490 495
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 500 505 510
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 515 520 525
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 530 535 540
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 545 550 555 560

ES 2 753 124 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
565 570 575

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
580 585 590

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
595 600 605

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
610 615 620

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
645 650 655

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
660 665 670

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
675 680 685

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
690 695 700

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
705 710 715 720

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
725 730 735

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
740 745 750

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
755 760 765

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
770 775 780

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
785 790 795 800

<210> 22

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 753 124 T3

<223> conector

<400> 22

5 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> conector

15 <400> 23

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

<210> 24

20 <211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> conector

<400> 24

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

30

<210> 25

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

35

ES 2 753 124 T3

<220>

<223> conector

<400> 25

5

Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 26

<211> 15

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> conector

15

<220>

<221> REPETIR

<222> (1)..(15)

<223> Repeticiones de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 1 a 3 veces

20

<400> 26

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

25

<210> 27

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> conector

<220>

<221> REPETIR

ES 2 753 124 T3

<222> (1)..(100)

<223> Repeticiones de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 1 a 20 veces

<400> 27

5

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Ser
100

<210> 28

<211> 15

10

<212>PRT

<213> Artificial

<220>

<223> conector

15

<220>

<221> REPETIR

<222> (1)..(15)

<223> Gly-Gly-Gly-Gly-Ser se repite 1 a 3 veces

20

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> conector escindible
 <220>
 10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (4)..(5)
 <223> Sitio de escisión de FXIa
 <400> 29
 15
 Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr
 1 5
 <210> 30
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> conector escindible
 25
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (4)..(5)
 <223> Sitio de escisión de FXIa
 30
 <400> 30
 Asp Phe Thr Arg Val Val Gly
 1 5
 35 <210> 31
 <211> 8

ES 2 753 124 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> conector escindible

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (4)..(5)

10 <223> Sitio de escisión de FXIIa

<400> 31

Thr Met Thr Arg Ile Val Gly Gly
1 5

15

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> conector escindible

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (4)..(5)

<223> Sitio de escisión de calicreína

<400> 32

Ser Pro Phe Arg Ser Thr Gly Gly
1 5

30

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

35 <213> Artificial

ES 2 753 124 T3

<220>

<223> conector escindible

<220>

5 <221> característica_misc

<222> (4)..(5)

<223> Sitio de escisión de FVIIa

<400> 33

10

Leu Gln Val Arg Ile Val Gly Gly
1 5

<210> 34

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> conector escindible

20

<220>

<221> característica_misc

<222> (4)..(5)

<223> Sitio de escisión de FIXa

25

<400> 34

Pro Leu Gly Arg Ile Val Gly Gly
1 5

30 <210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> conector escindible

ES 2 753 124 T3

<220>

<221> característica_misc

<222> (4)..(5)

<223> Sitio de escisión de FXa

5

<400> 35

Ile Glu Gly Arg Thr Val Gly Gly
1 5

10

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> conector escindible

<220>

<221> característica_misc

20

<222> (4)..(5)

<223> Sitio de escisión de FIIa (trombina)

<400> 36

Leu Thr Pro Arg Ser Leu Leu Val
1 5

25

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

30

<213> Artificial

<220>

<223> conector escindible

35

<220>

<221> característica_misc

ES 2 753 124 T3

<222> (4)..(5)

<223> Sitio de escisión de elastasa-2

<400> 37

5

Leu Gly Pro Val Ser Gly Val Pro
1 5

<210> 38

<211> 8

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> conector escindible

15

<220>

<221> característica_misc

<222> (4)..(5)

<223> Sitio de escisión de granzima-B

20

<400> 38

Val Ala Gly Asp Ser Leu Glu Glu
1 5

25

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> conector escindible

<220>

<221> característica_misc

35

<222> (4)..(5)

<223> Sitio de escisión de MMP-12

ES 2 753 124 T3

<400> 39

Gly Pro Ala Gly Leu Gly Gly Ala
1 5

5 <210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> conector escindible

<220>

<221> característica_misc

15 <222> (4)..(5)

<223> Sitio de escisión de MMP-13

<400> 40

Gly Pro Ala Gly Leu Arg Gly Ala
1 5

20

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> conector escindible

30 <220>

<221> característica_misc

<222> (4)..(5)

<223> Sitio de escisión de MMP-17

35 <400> 41

ES 2 753 124 T3

Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Arg
1 5

5 <210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> conector escindible

10 <220>
<221> característica_misc
<222> (4)..(5)
<223> Sitio de escisión de MMP-20

15 <400> 42

Pro Ala Leu Pro Leu Val Ala Gln
1 5

20 <210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> conector escindible

<220>
<221> característica_misc
30 <222> (6)..(7)
<223> Sitio de escisión de TEV

<400> 43

35 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

ES 2 753 124 T3

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> conector escindible

<220>

10

<221> característica_misc

<222> (4)..(5)

<223> Sitio de escisión de enterocinasa

<400> 44

15

Asp Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly
1 5

<210> 45

<211> 8

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> conector escindible

25

<220>

<221> característica_misc

<222> (6)..(7)

<223> Sitio de escisión de proteasa C (PRESCISSION)

30

<400> 45

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

35

<210> 46

<211> 8

ES 2 753 124 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> conector escindible

<220>

<221> característica_misc

<222> (4)..(5)

10 <223> sortasa A

<400> 46

Leu Pro Lys Thr Gly Ser Glu Ser
1 5

15

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> conector escindible

<400> 47

25

Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg
1 5

<210> 48

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sitio de escisión

35

<400> 48

ES 2 753 124 T3

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg
1 5 10

5 <210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> sitio de escisión

10 <400> 49

Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg
1 5 10

15 <210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> sitio de escisión

<400> 50

25 Thr Thr Lys Ile Lys Pro Arg
1 5

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> sitio de escisión

35 <400> 51

ES 2 753 124 T3

Ala Leu Arg Pro Arg Val Val Gly Gly Ala
1 5 10

5 <210> 52
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> sitio de escisión
10

<400> 52

Arg Arg Arg Arg
1

15 <210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> sitio de escisión

<400> 53

Arg Lys Arg Arg Lys Arg
1 5
25

<210> 54
<211> 5
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> sitio de escisión

35 <400> 54

ES 2 753 124 T3

Arg Arg Arg Arg Ser
1 5

5 <210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sitio de escisión

10

<400> 55

Leu Val Pro Arg Gly
1 5

15 <210> 56

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> sitio de escisión y conector

<400> 56

Thr Leu Asp Pro Arg Ser Phe Leu Leu Arg Asn Pro Asn Asp Lys Tyr
1 5 10 15

25 Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys
20 25

<210> 57

<211> 99

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> ESC48-Fwd-VWF-D'D3 con señal de VIII y sitio BsiW1 para pSYN VWF-001

ES 2 753 124 T3

<400> 57

tcgcgacgta cggccgccac catgcaaata gagctctcca cctgcttctt tctgtgcctt 60

ttgcgattct gctttagcct atcctgtcgg cccccatg 99

5 <210> 58

<211> 68

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> ESC50- Rev- VWF- D'D3 parcial (1-276 aminoácidos) con 6 His y sitio Not1 para pSYN VWF- 001

<400> 58

tgacctcgag cggccgctca gtggtgatgg tgatgatgca gaggcacttt tctggtgtca 60

15 gcacactg 68

<210> 59

<211> 99

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> ESC48- Fwd - VWF-D'D3 con señal de VIII y sitio BsiW1 para pSYN VWF- 002

25 <400> 59

tcgcgacgta cggccgccac catgcaaata gagctctcca cctgcttctt tctgtgcctt 60

ttgcgattct gctttagcct atcctgtcgg cccccatg 99

<210> 60

30 <211> 71

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 753 124 T3

<220>

<223> ESC48- Fwd - VWF-D'D3 con señal de VIII y sitio BsiW1 para pSYN VWF- 004

<400> 63

5 tcgcgacgta cggccgccac catgcaaata gagctctcca cctgcttctt tctgtgcctt 60
 ttgcgattct gctttagcct atcctgtcgg ccccccatg 99

<210> 64

<211> 65

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> ESC53-Rev- VWF-D'D3A1 (1-716 aminoácidos) con 6His y sitio Not1 para pSYN VWF- 004

15 <400> 64

 tgacctcgag cggccgctca gtggtgatgg tgatgatggc ccacagtgac ttgtgccatg 60
 tgggg 65

<210> 65

20 <211> 1313

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> vector clonado

<400> 65

ES 2 753 124 T3

ggatcctagt ggggaataag ggatgcagcc acccctcagt gaaatgcaag aaacgggtca 60
 ccatcctggt ggagggagga gagattgagc tgtttgacgg ggaggtgaat gtgaagaggc 120
 ccatgaagga tgagactcac tttgaggtgg tggagtctgg ccggtacatc attctgctgc 180
 tgggcaaagc cctctccgtg gtctgggacc gccacctgag catctccgtg gtctctgaagc 240
 agacatacca ggagaaagtg tgtggcctgt gtgggaattt tgatggcatc cagaacaatg 300
 acctcaccag cagcaacctc caagtggagg aagaccctgt ggactttggg aactcctgga 360
 aagtgagctc gcagtgtgct gacaccagaa aagtgcctct ggactcatcc cctgccacct 420
 gccataacaa catcatgaag cagacgatgg tggattcctc ctgtagaatc cttaccagtg 480
 acgtcttcca ggactgcaac aagctggtgg accccgagcc atatctggat gtctgcattt 540
 acgacacctg ctctgtgag tccattgggg actgocctg cttctgcgac accattgctg 600
 cctatgccca cgtgtgtgcc cagcatggca agtggtgac ctggaggacg gccacattgt 660
 gccccagag ctgcgaggag aggaatctcc gggagaacgg gtatgagtgt gagtggcgct 720
 ataacagctg tgcacctgcc tgtcaagtca cgtgtcagca ccctgagcca ctggcctgcc 780
 ctgtgcagtg tgtggagggc tgccatgccc actgcctctc agggaaaatc ctggatgagc 840
 ttttgacagc ctgctgtgac cctgaagact gtccagtggtg tgaggtggct ggccggcgtt 900
 ttgcctcagg aaagaaagtc accttgaatc ccagtgacct tgagcactgc cagatttgcc 960
 actgtgatgt tgtcaacctc acctgtgaag cctgccagga gccgggaggc ctggtggtgc 1020
 ctcccacaga tgccccgtg agccccacca ctctgtatgt ggatgagacg ctccaggatg 1080
 gctgtgatac tcacttctgc aaggtcaatg agagaggaga gtacttctgg gagaagaggg 1140
 tcacaggctg cccaccctt gatgaacaca agtgtcttgc tgagggaggt aaaattatga 1200
 aaattccagg cacctgctgt gacacatgtg aggagcctga gtgcaacgac atcactgcc 1260
 ggctgcagta tgtcaaggtg ggaagctgta agtctgaagt agaggtggat atc 1313

<210> 66

<211> 32

5

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ESC 89-fwd con sitio NheI

10

<400> 66

ctcactatag ggagaccaa gctggctagc cg 32

<210> 67

15

<211> 43

ES 2 753 124 T3

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> ESC 91-rev con Sal1

<400> 67

ctggatcccg ggagtcgact cgtcagtggt gatggtgatg atg 43

10 <210> 68

<211> 92

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> LW 22-FWD-VWF-D'D3 con la secuencia señal de FVIII y sitio BsiW1

<400> 68

gcgccggccg tacgatgcaa atagagctct ccacctgctt ctttctgtgc cttttgcat 60

20 tctgcttttag cctatcctgt cggcccccca tg 92

<210> 69

<211> 47

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> LW 23-Rev- Fc con codón de terminación y sitio Not1

30 <400> 69

tcatcaatgt atcttatcat gtctgaattc gcgccgctc atttacc 47

<210> 70

<211> 41

35 <212> ADN

<213> Artificial

ES 2 753 124 T3

<220>

<223> Oligonucleótido de clonación LW24- Fwd- VWF D1D2D'D3 con sitio BsiW1

<400> 70

5 gcgccggccg tacgatgatt cctgccagat ttgccggggt g 41

<210> 71

<211> 41

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido LW27-Rev-VWF D'D3 con EcoRV

15 <400> 71

ccaccgccag atatcggtc ctggcaggct tcacaggtga g 41

<210> 72

<211> 1240

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VWF-D1D2D'D3

25

<400> 72

ES 2 753 124 T3

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
 20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
 35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
 50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
 65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
 85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
 100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
 115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
 130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
 145 150 155 160

ES 2 753 124 T3

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

ES 2 753 124 T3

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
 420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
 435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
 450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
 465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
 485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
 500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
 515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
 530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
 545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
 565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
 580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
 595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
 610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
 625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
 645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
 660 665 670

ES 2 753 124 T3

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
850 855 860

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
885 890 895

Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu

ES 2 753 124 T3

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

ES 2 753 124 T3

His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys
1160 1165 1170

His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln
1175 1180 1185

Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly
1190 1195 1200

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp
1205 1210 1215

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro
1235 1240

<210> 73

<211> 477

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VWF-D'D3

10

<400> 73

ES 2 753 124 T3

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
 1 5 10 15

Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr
 20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro
 35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys
 50 55 60

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys
 65 70 75 80

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr
 85 90 95

Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr
 100 105 110

Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr

ES 2 753 124 T3

	115						120						125			
Val	Leu	Val	Gln	Asp	Tyr	Cys	Gly	Ser	Asn	Pro	Gly	Thr	Phe	Arg	Ile	
	130					135					140					
Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Gly	Cys	Ser	His	Pro	Ser	Val	Lys	Cys	Lys	Lys	
145					150					155					160	
Arg	Val	Thr	Ile	Leu	Val	Glu	Gly	Gly	Glu	Ile	Glu	Leu	Phe	Asp	Gly	
				165					170					175		
Glu	Val	Asn	Val	Lys	Arg	Pro	Met	Lys	Asp	Glu	Thr	His	Phe	Glu	Val	
			180					185					190			
Val	Glu	Ser	Gly	Arg	Tyr	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Leu	Ser	
		195					200					205				
Val	Val	Trp	Asp	Arg	His	Leu	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Leu	Lys	Gln	Thr	
	210					215					220					
Tyr	Gln	Glu	Lys	Val	Cys	Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asp	Gly	Ile	Gln	
225					230					235					240	
Asn	Asn	Asp	Leu	Thr	Ser	Ser	Asn	Leu	Gln	Val	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	
				245					250					255		
Asp	Phe	Gly	Asn	Ser	Trp	Lys	Val	Ser	Ser	Gln	Cys	Ala	Asp	Thr	Arg	
			260					265					270			
Lys	Val	Pro	Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Ala	Thr	Cys	His	Asn	Asn	Ile	Met	
		275					280					285				
Lys	Gln	Thr	Met	Val	Asp	Ser	Ser	Cys	Arg	Ile	Leu	Thr	Ser	Asp	Val	
	290					295					300					
Phe	Gln	Asp	Cys	Asn	Lys	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Tyr	Leu	Asp	Val	
305					310					315					320	
Cys	Ile	Tyr	Asp	Thr	Cys	Ser	Cys	Glu	Ser	Ile	Gly	Asp	Cys	Ala	Cys	
				325					330					335		
Phe	Cys	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Tyr	Ala	His	Val	Cys	Ala	Gln	His	Gly	
			340					345					350			
Lys	Val	Val	Thr	Trp	Arg	Thr	Ala	Thr	Leu	Cys	Pro	Gln	Ser	Cys	Glu	
		355					360					365				

ES 2 753 124 T3

Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn
 370 375 380

Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu
 385 390 395 400

Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro
 405 410 415

Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp
 420 425 430

Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys
 435 440 445

Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys
 450 455 460

Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro
 465 470 475

<210> 74

<211> 30

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VWF- dominio D'D3 (1-477 aa; mutación C336A/C379A)

10

<220>

<221> REPETIR

<222> (1)..(30)

<223> Repeticiones de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 6 veces

15

<400> 74

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

20 <210> 75

<211> 5

<212> PRT

ES 2 753 124 T3

<213> Artificial

<220>

<223> ESC41-Rev-VWF con EcoRV

5

<400> 78

cctccaccgc cagatatcag aggcactttt c 31

<210> 79

10 <211> 105

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> ESC78- Fwd con sitio EcoRV

<400> 79

aaagtgcctc tgatatctgg cgggtggaggt tccggtggcg ggggatccgg tggcggggga 60

tccggtggcg ggggatccgg tggcggggga tccttgggtcc cccgg 105

20

<210> 80

<211> 107

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> ESC79- Rev con sitio RsRII

<400> 80

30 gaagaggaag actgacggtc cgcccaggag ttctggagct gggcacggtg ggcattgtgtg 60

agttttgtcg cctccgctgc cccgggggac cagggatccc ccgccac 107

<210> 81

<211> 48

35 <212> PRT

ES 2 753 124 T3

<213> Artificial

<220>

<223> conector

5

<400> 81

```

Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1           5           10           15
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20           25           30
Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35           40           45
    
```

10

<210> 82

<211> 1781

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> pSYN-FVIII-049, que es construcción FVIII-Fc con un conector escindible entre dos dominios Fc; secuencia de Genscript número 103069

<400> 82

20

```

cgtcgacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg      60
ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa cggcgcggcc      120
ggagcgggtg cggcggatca ggtgggggtg gatcagggcg tggaggttcc ggtggcgggg      180
gatccggcgg tggaggttcc ggtgggggtg gatcaaggaa gaggaggaag agaagcctat      240
cctgtoggcc ccccatggtc aagctggtgt gtcccgtga caacctgcgg gctgaagggc      300
tcgagtgtac caaacgtgc cagaactatg acctggagtg catgagcatg ggctgtgtct      360
ctggctgcct ctgccccccg ggcatggtcc ggcatgagaa tcgatgtgtg gccctggaaa      420
ggtgtccctg cttccatcag ggcaaggagt atgccctgg agaaacagtg aagattggct      480
gcaacacttg tgtctgtcgg gaccggaagt ggaactgcac agacctatgt tgtgatgcca      540
cgtgctccac gatcggcatg gcccactacc tcaccttcga cgggctcaa tacctgttcc      600
ccggggagtg ccagtacgtt ctggtgcagg attactgagg cagtaaccct gggaccttcc      660
ggatcctagt ggggaataag ggatgcagcc acccctcagt gaaatgcaag aaacgggtca      720
    
```

ES 2 753 124 T3

ccatcctggt ggagggagga gagattgagc tgtttgacgg ggaggtgaat gtgaagaggc 780
ccatgaagga tgagactcac tttgaggtgg tggagtctgg ccggtacatc attctgctgc 840
tgggcaaagc cctctccgtg gtctgggacc gccacctgag catctccgtg gtccctgaagc 900
agacatacca ggagaaagtg tgtggcctgt gtgggaattt tgatggcatc cagaacaatg 960
acctcaccag cagcaacctc caagtggagg aagaccctgt ggactttggg aactcctgga 1020
aagtgagctc gcagtgtgct gacaccagaa aagtgcctct ggactcatcc cctgccacct 1080
gccataacaa catcatgaag cagacgatgg tggattcctc ctgtagaatc cttaccagtg 1140
acgtcttcca ggactgcaac aagctggtgg acccogagcc atatctggat gtctgcattt 1200
acgacacctg ctctgtgag tccattgggg actgcgccgc attctgcgac accattgctg 1260
cctatgccca cgtgtgtgcc cagcatggca aggtggtgac ctggaggacg gccacattgt 1320
gccccagag ctgcgaggag aggaatctcc gggagaacgg gtatgaggct gagtggcgct 1380
ataacagctg tgcacctgcc tgtcaagtca cgtgtcagca cctgagcca ctggcctgcc 1440
ctgtgcagtg tgtggagggc tgccatgccc actgcctcc agggaaaatc ctggatgagc 1500
ttttgcagac ctgcgctgac cctgaagact gtccagtgtg tgaggtggct ggccggcggt 1560
ttgcctcagg aaagaaagtc accttgaatc ccagtgacct tgagcactgc cagatttgcc 1620
actgtgatgt tgtcaacctc accttgaag cctgccagga gccgatcgat ggcggtggag 1680
gttccggtgg cgggggatcc ctggtcccc gggcagcgg aggcgacaaa actcacacat 1740
gcccacctg cccagctcca gaactcctgg gcggaccgtc a 1781

<210> 83

<211> 220

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Se subclonó un fragmento de la construcción de Genscript en pSYN-FVIII-0159 digerido con EcoRV/RsRII; Nº de secuencia de Genscript 132601

<400> 83

aaagtgcctc tgatatctgg cggaggaggt tccggtggcg ggggatccgg cggaggaggt 60
tccggcgggtg gaggttccgg tggcggggga tccggtggcg ggggatccct ggtccccgg 120
ggcagcggcg gtggaggttc cgggtggcgg ggatccgaca aaactcacac atgcccaccg 180
tgcccagctc cagaactcct gggcggaccg tcagtcttcc 220

15

<210> 84

<211> 73

ES 2 753 124 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> pSYN-VIII-178 tiene un conector de 73 aminoácidos entre el fragmento de VWF y la región Fc; síntesis de fragmento de ADN que codifica el conector de 73 aminoácidos

<400> 84

Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
35 40 45

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65 70

10

<210> 85

<211> 299

<212> ADN

15

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de Genscript N° 144849

20

<400> 85

gcctgccagg agccgatata tggcgggtgga ggttccggtg gcgggggata cggcgggtgga	60
ggttccggcg gtggagggtc cggcggcggg ggatccggcg gtggagggtc cggcggcggg	120
ggatccggcg gtggagggtc cggcgggtgga ggttccggtg gcgggggata cggcggcggg	180
ggatccctgg tccccgggg cagcggcggt ggaggttccg gtggcggggg atccgacaaa	240
actcacacat gccccgtgc ccagctccag aactcctggg cggaccgtca gtcttcctc	299

<210> 86

ES 2 753 124 T3

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> conector

<400> 86

Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

10

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
35 40 45

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Ser

<210> 87

<211> 380

15

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de Genscript N° -144849

20

<400> 87

ES 2 753 124 T3

```

gcctgccagg agccgatatc tggcgggtgga ggttccgggtg gcggggggatc cggcgggtgga      60
ggttccggcg gtggagggttc cggtgggcggg ggatccggcg gtggagggttc cggtgggcggg      120
ggatccggcg gtggagggttc cggcgggtgga ggttccgggtg gcggggggatc cggcgggtgga      180
ggttccgggtg gcggggggatc cggcgggtgga ggttccggcg gtggagggttc cggtgggcggg      240
ggatccgggtg gcggggggatc cctggtcccc cggggcagcg gcggtggagg ttccgggtggc      300
gggggatccg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag ctccagaact cctgggcgga      360
ccgtcagtct tctcttccc                                     380

```

<210> 88

<211> 2449

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heterodímero FVIII-VWF-Fc

10

<400> 88

```

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

```

```

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

```

ES 2 753 124 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 753 124 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 753 124 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu

ES 2 753 124 T3

Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
 1040 1045 1050
 Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
 1055 1060 1065
 Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
 1070 1075 1080
 Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met
 1085 1090 1095
 Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met
 1100 1105 1110
 Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly
 1115 1120 1125
 Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser
 1130 1135 1140
 Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg
 1145 1150 1155
 Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
 1160 1165 1170
 Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser
 1175 1180 1185
 Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro
 1190 1195 1200
 Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe
 1205 1210 1215
 Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp
 1220 1225 1230
 Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu
 1235 1240 1245
 Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn
 1250 1255 1260
 Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
 1265 1270 1275

ES 2 753 124 T3

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

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

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

Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln
 1325 1330 1335

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1460 1465 1470

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 1475 1480 1485

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 1490 1495 1500

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 1505 1510 1515

ES 2 753 124 T3

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
1520 1525 1530

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
1535 1540 1545

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
1550 1555 1560

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
1565 1570 1575

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1580 1585 1590

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
1595 1600 1605

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
1610 1615 1620

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
1625 1630 1635

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
1640 1645 1650

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
1655 1660 1665

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1670 1675 1680

Lys Arg Arg Arg Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1685 1690 1695

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1700 1705 1710

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Lys Arg Arg Lys Arg Ser Leu Ser
1715 1720 1725

Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu
1730 1735 1740

Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp

ES 2 753 124 T3

Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys
 1985 1990 1995

Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met
 2000 2005 2010

Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp
 2015 2020 2025

Val Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu
 2030 2035 2040

Asp Val Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp
 2045 2050 2055

Cys Ala Ala Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys
 2060 2065 2070

Ala Gln His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys
 2075 2080 2085

Pro Gln Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu
 2090 2095 2100

Ala Glu Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr
 2105 2110 2115

Cys Gln His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu
 2120 2125 2130

Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu
 2135 2140 2145

Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val
 2150 2155 2160

Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro
 2165 2170 2175

Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn
 2180 2185 2190

Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Ile Asp Gly Gly Gly Gly
 2195 2200 2205

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Asp
 2210 2215 2220

ES 2 753 124 T3

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 2225 2230 2235

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 2240 2245 2250

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 2255 2260 2265

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 2270 2275 2280

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 2285 2290 2295

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 2300 2305 2310

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 2315 2320 2325

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 2330 2335 2340

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 2345 2350 2355

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 2360 2365 2370

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 2375 2380 2385

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 2390 2395 2400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 2405 2410 2415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 2420 2425 2430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 2435 2440 2445

Lys

<210> 89

<211> 48

5 <212> PRT

<213> Artificial

ES 2 753 124 T3

<220>

<223> un conector de 48 aminoácidos

<400> 89

5

Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
35 40 45

<210> 90

<211> 1665

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína madura pSYN-FVIII-155

15

<400> 90

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

ES 2 753 124 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 2 753 124 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Ala 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

ES 2 753 124 T3

Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile
 885 890 895
 Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe
 900 905 910
 Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His
 915 920 925
 Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe
 930 935 940
 Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro
 945 950 955 960
 Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln
 965 970 975
 Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr
 980 985 990
 Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala 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

ES 2 753 124 T3

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

ES 2 753 124 T3

Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile
 1355 1360 1365

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

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

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

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

Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr Asp Lys Thr His Thr
 1430 1435 1440

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 1445 1450 1455

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 1460 1465 1470

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 1475 1480 1485

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 1490 1495 1500

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 1505 1510 1515

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 1520 1525 1530

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 1535 1540 1545

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 1550 1555 1560

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 1565 1570 1575

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 1580 1585 1590

ES 2 753 124 T3

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
1595 1600 1605

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
1610 1615 1620

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
1625 1630 1635

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
1640 1645 1650

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
1655 1660 1665

<210> 91

<211> 5052

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> pSYN-FVIII-155

10

<400> 91

ES 2 753 124 T3

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttctt cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180
acctcagctg tgtacaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat	300
gatacagtg tcatcact taagaacatg gcttccatc ctgtcagtct tcatgctggt	360
ggtgtatcct actggaaagc ttctgagga gctgaatag atgatcagac cagtcaaagg	420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggctctg	480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat	540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa	600
gggagtctgg ccaaggaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttctgta	660
ttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct	780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgatg tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca ctttcttgt gaggaacct	900
cgccaggcgt ccttgaaaat ctgcgaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gaccttgac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacatga tggcatggaa	1020

ES 2 753 124 T3

gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat 1140
gatgacaact ctcttcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact 1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtoctcgcc 1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg 1320
aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaaattgg agacacactg 1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500
gatgtccgtc ctttgattc aaggagatta ccaaagggtg taaaacattt gaaggatttt 1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620
actaaatcag atcctcgggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgtaa tatggagaga 1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740
agaggaaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tcccacatcc agctggagtg 1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt 1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980
attggagcac agactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt ctcatgtcg 2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgcacaact cagactttcg gaacagaggc 2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagtgtg gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac 2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaa atgccattga accaagaagc 2280
ttctctcaaa acccaccagt cttgaaagcc catcaggcgg aaataactcg tactactctt 2340
cagtcagatc aagaggaaat tgactatgat gataccatat cagttgaaat gaagaaggaa 2400
gattttgaca tttatgatga ggatgaaaat cagagcccc gcagctttca aaagaaaaca 2460
cgacactatt ttattgctgc agtggagagg ctctgggatt atgggatgag tagctcccca 2520
catgttctaa gaaacagggc tcagagtggc agtgtccctc agttcaagaa agttgttttc 2580
caggaattta ctgatggctc ctttactcag cccttatacc gtggagaact aaatgaacat 2640
ttgggactcc tggggccata tataagagca gaagtgaag ataatatcat ggtaactttc 2700
agaaatcagg cctctcgtcc ctattccttc tattctagcc ttatttotta tgaggaagat 2760
cagaggcaag gagcagaacc tagaaaaaac tttgtcaagc ctaatgaaac caaaacttac 2820
ttttggaag tgcaacatca tatggcacc ctaaaagatg agtttgactg caaagcctgg 2880

ES 2 753 124 T3

gottatttct ctgatgtga cctggaaaa gatgtgact caggcctgat tggaccctt 2940
 ctggtctgcc acactaacac actgaacct gctcatggga gacaagtgac agtacaggaa 3000
 tttgctctgt ttttcaccat ctttgatgag accaaaagct ggtacttcac tgaaaatatg 3060
 gaaagaaact gcagggtcc ctgcaatata cagatggaag atcccacttt taaagagaat 3120
 tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct 3180
 caggatcaaa ggattcgatg gtatctgctc agcatgggca gcaatgaaaa catccattct 3240
 attcatttca gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaaag aggagtataa aatggcactg 3300
 tacaatctct atccagggtg ttttgagaca gtggaaatgt taccatcaa agctggaatt 3360
 tggcgggtgg aatgccttat tggcggcat ctacatgctg ggatgagcac actttttctg 3420
 gtgtacagca ataagtgtca gactcccctg ggaatggctt ctggacacat tagagatttt 3480
 cagattacag cttcaggaca atatggacag tggcccccac agctggccag acttcattat 3540
 tccggatcaa tcaatgcctg gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg 3600
 ttggcaccaa tgattattca cggcatcaag acccagggtg cccgtcagaa gttctccagc 3660
 ctctacatct ctcagtttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtg gcagacttat 3720
 cgaggaaatt ccaactggaac cttaatggtc ttctttggca atgtggattc atctgggata 3780
 aaacacaata tttttaacc tccaattatt gctcgataca tccgtttgca cccaactcat 3840
 tatagcattc gcagcactct tcgcatggag ttgatgggct gtgatttaaa tagttgcagc 3900
 atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgac agattactgc ttcacctac 3960
 tttaccaata tgtttgccac ctggtctcct tcaaaagctc gacttcacct ccaagggagg 4020
 agtaatgcct ggagacctca ggtgaataat ccaaaagagt ggctgcaagt ggacttccag 4080
 aagacaatga aagtcacagg agtaactact caggggagtaa aatctctgct taccagcatg 4140
 tatgtgaagg agttcctcat ctccagcagt caagatggcc atcagtggac tctctttttt 4200
 cagaatggca aagtaaagg ttttcaggga aatcaagact ccttcacacc tgtggtgaac 4260
 tctctagacc caccgttact gactcgctac cttegaatte acccccagag ttgggtgcac 4320
 cagattgccc tgaggatgga gtttctggc tgcgaggcac aggacctta cgacaaaact 4380
 cacacatgcc caccgtgcc agctccagaa ctctgggag gaccgtcagt cttcctctc 4440
 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgata tcccggacc ctgaggtcac atgcgtggtg 4500
 gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 4560
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gacagctaca acagcacgta ccgtgtggtc 4620
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 4680
 tccaacaaag cctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 4740
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 4800
 agcctgacct gcttggctca aggetttat cccagcgaca tcgcccgtgga gtgggagagc 4860
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgttgactc cgacggctcc 4920
 ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 4980
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 5040
 tctccgggta aa 5052

ES 2 753 124 T3

<210> 92

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> GFVIII-159

<400> 92

10

Ile Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser Gly

<210> 93

<211> 34

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> GFVIII-160

20

<400> 93

Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly
20 25 30

Ser Gly

25

<210> 94

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

ES 2 753 124 T3

<223> FVIII-064

<400> 94

5 Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

 Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

<210> 95

<211> 48

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VWF031

15

<400> 95

Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

20 <210> 96

<211> 73

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> VWF035

<400> 96

ES 2 753 124 T3

Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
35 40 45

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65 70

<210> 97

5 <211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> VWF036

<400> 97

Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
35 40 45

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Ser

15

<210> 98

ES 2 753 124 T3

<211> 54

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Conector de pSYN-VWF-051

<400> 98

Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Ileu Pro Glu Thr Gly Ala Leu Arg Pro Arg Val Val Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Ser
50

10

<210> 99

<211> 232

<212> ADN

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de Genewiz Nº 10-210746313

20

<400> 99

aggagccgat atctggcggg ggaggttccg gtggcggggg atccggcggg ggaggttccg 60
gcggtggagg ttccgggtggc gggggatccg gtggcggggg atccttacct gaaactggag 120
ccctgcgggc cggggtcgtc ggcgggtggag gttccgggtg cgggggatcc gacaaaactc 180
acacatgccc accgtgccca gctccagaac tcctggggcg accgtcagtc tt 232

<210> 100

25

<211> 4566

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 753 124 T3

<220>

<223> pSYN-VWF051

<400> 100

5

```

atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg cctcatttt gccagggacc      60
ctttgtgcag aaggaactcg cggcagggtca tccacggccc gatgcagcct ttccggaagt    120
gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg cagttacctc    180
ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca gaatggcaag    240
agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttggt tgtcaatggt    300
accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg gctgtatcta    360
gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt ggcaggatc    420
gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa gacctgcggg    480
ctgtgtggca actttaacat ctttctgtaa gatgacttta tgaccaaga agggaccttg    540
acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga acagtgggtg    600
gaaacgggcat ctctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat gcagaagggc    660
ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcgggtg ttgcccctg ccacctctg    720
gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg tgctggggg    780
ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgccgga cctgtgccca ggagggaatg    840
gtgctgtacg gctggaccga ccacagcggg tgcagcccag tgtgccctgc tggtatggag    900
tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat caatgaaatg    960
tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgcctgagg gacagctcct ggatgaaggc   1020
ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta ccctccggc   1080

```

ES 2 753 124 T3

acctccctct	ctcgagactg	caacacctgc	atttgccgaa	acagccagtg	gatctgcagc	1140
aatgaagaat	gtccagggga	gtgccttgtc	actggtcaat	cccacttcaa	gagctttgac	1200
aacagatact	tcaccttcag	tgggatctgc	cagtacctgc	tggccccgga	ttgccaggac	1260
cactccttct	ccattgtcat	tgagactgtc	cagtgtgctg	atgaccgoga	cgctgtgtgc	1320
acccgctccg	tcaccgtccg	gctgcctggc	ctgcacaaca	gccttgtgaa	actgaagcat	1380
ggggcaggag	ttgccatgga	tggccaggac	atccagctcc	ccctcctgaa	aggtgacctc	1440
cgcatccagc	atacagtjac	ggcctccgtg	cgctcagct	acggggagga	cctgcagatg	1500
gactgggatg	gccgcgggag	gctgctggtg	aagctgtccc	ccgtctatgc	cggaagacc	1560
tggggcctgt	gtgggaatta	caatggcaac	cagggcgacg	acttccttac	cccctctggg	1620
ctggcgggagc	cccgggtgga	ggacttcggg	aacgcctgga	agctgcacgg	ggactgccag	1680
gacctgcaga	agcagcacag	cgatccctgc	gccctcaacc	cgcgcatjac	caggttctcc	1740
gaggaggcgt	gcgcggtcct	gacgtcccc	acattcgagg	cctgccatcg	tgccgtcagc	1800
ccgctgccct	acctgcggaa	ctgccgctac	gacgtgtgct	cctgctcgga	cgcccgag	1860
tgctgtgctg	gcgccctggc	cagctatgcc	gcggcctgct	cggggagagg	cgctgcgctc	1920
gcgtggcgcg	agccaggccg	ctgtgagctg	aactgcccga	aaggccaggt	gtacctgcag	1980
tgcgggaccc	cctgcaacct	gacctgccc	tctctctctt	acccgatga	ggaatgcaat	2040
gaggcctgcc	tggagggtctg	cttctgcccc	ccagggtct	acatgatga	gaggggggac	2100
tgctgtccca	aggcccagtg	cccctgttac	tatgacggtg	agatctcca	gccagaagac	2160
atcttctcag	accatcacac	catgtgctac	tgtgaggatg	gcttcatgca	ctgtaccatg	2220
agtggagtcc	ccggaagctt	gctgcctjac	gctgtcctca	gcagtccct	gtctcatcgc	2280
agcaaaagga	gcctatcctg	tggcccccc	atggtcaagc	tgggtgtgtcc	cgctgacaac	2340
ctgcgggctg	aagggtcga	gtgtaccaa	acgtgccaga	actatgacct	ggagtgcattg	2400
agcatgggct	gtgtctctgg	ctgcctctgc	ccccgggca	tggccggca	tgagaacaga	2460
tgtgtggccc	tggaaaggtg	tccctgcttc	catcagggca	aggagtatgc	ccctggagaa	2520
acagtgaaga	ttggctgcaa	cacttgtgtc	tgtcgggacc	ggaagtggaa	ctgcacagac	2580
catgtgtgtg	atgccacgtg	ctccacgac	ggcatggccc	actacctcac	cttcgacggg	2640
ctcaaatacc	tgctccccgg	ggagtgccag	tacgttctgg	tgcaggatta	ctgcccagct	2700
aaccctggga	cctttoggat	cctagtgggg	aataagggat	gcagccacc	ctcagtgaaa	2760
tgcaagaaac	gggtcacctat	cctggtggag	ggaggagaga	ttgagctgtt	tgacggggag	2820
gtgaatgtga	agagcccat	gaaggatgag	actcactttg	aggtggtgga	gtctggccgg	2880
tacatcattc	tgtgtctggg	caaagccctc	tccgtggtct	gggaccgcca	cctgagcattc	2940

ES 2 753 124 T3

tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg gaattttgat 3000
 ggcatocaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga ccctgtggac 3060
 tttgggaact cctggaaagt gagctcgcag tgtgctgaca ccagaaaagt gcctctggac 3120
 tcatcccctg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatggtgga ttctctctgt 3180
 agaatoctta ccagtgacgt cttccaggac tgcaacaagc tgggtggacc cgagccatat 3240
 ctggatgtct gcatttacga cacctgctcc tgtgagtcca ttggggactg cgccgcattc 3300
 tgcgacacca ttgctgccta tgcccacgtg tgtgcccagc atggcaaggt ggtgacctgg 3360
 aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga gaacgggtat 3420
 gaggtgagt ggcgctataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtccactg tcagaccct 3480
 gagccactgg cctgccctgt gcagtgtgtg gagggctgcc atgccactg ccctccaggg 3540
 aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgacctg aagactgtcc agtgtgtgag 3600
 gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaaag aaagtccact tgaatcccag tgaccctgag 3660
 cactgccaga tttgccactg tgatgtgtc aacctcact gtgaagcctg ccaggagccg 3720
 atatctggcg gtggaggttc cgggtgcccgg ggatccggcg gtggaggttc cggcggtgga 3780
 ggttccgggtg gcgggggatc cgggtgcccgg ggatccttac ctgaaactgg agccctgcgg 3840
 ccccggtcg tcggcgggtg aggttccggt ggcgggggat ccgacaaaac tcacacatgc 3900
 ccaccgtgcc cagctccaga actcctgggc ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa 3960
 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 4020
 agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 4080
 gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc 4140
 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 4200
 gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 4260
 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc 4320
 tgctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtg agtgggagag caatgggcag 4380
 ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgttgact ccgacggctc cttctctctc 4440
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 4500
 gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 4560
 aatga 4566

<210> 101

<211> 1521

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VWF051

ES 2 753 124 T3

<400> 101

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
 20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
 35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
 50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
 65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
 85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
 100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
 115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
 130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
 145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
 165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
 180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
 195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
 210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
 225 230 235 240

ES 2 753 124 T3

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
485 490 495

ES 2 753 124 T3

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
 500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
 515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
 530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
 545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
 565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
 580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
 595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
 610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
 625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
 645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
 660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
 675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
 690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
 705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
 725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val

ES 2 753 124 T3

Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr
 995 1000 1005

Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn
 1010 1015 1020

Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro
 1025 1030 1035

Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln
 1040 1045 1050

Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe
 1055 1060 1065

Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
 1070 1075 1080

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala
 1085 1090 1095

Ala Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln
 1100 1105 1110

His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln
 1115 1120 1125

Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Ala Glu
 1130 1135 1140

Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln
 1145 1150 1155

His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys
 1160 1165 1170

His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln
 1175 1180 1185

Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly
 1190 1195 1200

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp
 1205 1210 1215

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
 1220 1225 1230

ES 2 753 124 T3

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

ES 2 753 124 T3

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 1475 1480 1485

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 1490 1495 1500

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 1505 1510 1515

Pro Gly Lys
 1520

<210> 102

<211> 4389

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FVIII 265

10

<400> 102

```

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgga      60
ggaggaggag gagccaccag aagatactac ctgggtgcag tggaaactgtc atgggactat      120
atgcaaagtg atctcgggtga gctgcctgtg gacgcaagat ttctctctag agtgccaaaa      180
tcttttccat tcaacacctc agtcgtgtac aaaaagactc tgttttaga attcacggat      240
caccttttca acatcgctaa gccaaaggcca cctgggatgg gtctgctagg tcctaccatc      300
caggctgagg tttatgatac agtggtcatt acacttaaga acatggcttc ccatcctgtc      360
agtcttcatg ctgttggtgt atcctactgg aaagcttctg agggagctga atatgatgat      420
cagaccagtc aaagggagaa agaagatgat aaagtcttcc ctgggtggaag ccatacatat      480
gtctggcagg tcctgaaaga gaatggtcca atggcctctg acccactgtg ccttacctac      540
tcatatcttt ctcatgtgga cctggtaaaa gacttgaatt caggcctcat tggagcccta      600
ctagtatgta gagaaggag tctggccaag gaaaagacac agaccttgca caaatattata      660
ctactttttg ctgtatttga tgaagggaaa agttggcact cagaaacaaa gaactccttg      720
atgcaggata gggatgctgc atctgctcgg gcctggccta aaatgcacac agtcaatggt      780
tatgtaaaca ggtctctgcc aggtctgatt ggatgccaca ggaaatcagt ctattggcat      840
gtgattggaa tgggcaccac tcctgaagtg cactcaatat tcctcgaagg tcacacattt      900
cttgtgagga accatcgcca ggcgtccttg gaaatctcgc caataacttt cttactgct      960
caaacactct tgatggacct tggacagttt ctactgtttt gtcatatctc ttcccaccaa     1020
catgatggca tggaaagctta tgtcaaagta gacagctgtc cagaggaacc ccaactacga     1080
    
```

ES 2 753 124 T3

atgaaaaata atgaagaagc ggaagactat gatgatgatc ttactgattc tgaaatggat 1140
gtggtcaggt ttgatgatga caactctcct tcctttatcc aaattcgctc agttgccaaag 1200
aagcatccta aaacttgggt acattacatt gctgctgaag aggaggactg ggactatgct 1260
cccttagtcc tcgccccga tgacagaagt tataaaagtc aatatttgaa caatggccct 1320
cagcggattg gtaggaagta caaaaaagtc cgatttatgg catacacaga tgaaaccttt 1380
aagactcgtg aagctattca gcatgaatca ggaatccttg gacctttact ttatggggaa 1440
gttgagaca cactgttgat tatatttaag aatcaagcaa gcagaccata taacatctac 1500
cctcacggaa tcaactgatg ccgtcctttg tattcaagga gattaccaa aggtgtaaaa 1560
catttgaagg attttccaat tctgccagga gaaatattca aatataaatg gacagtgact 1620
gtagaagatg ggccaactaa atcagatcct cggcgcctga cccgctatta ctctagtttc 1680
gttaatatgg agagagatct agcttcagga ctcatggcc ctctcctcat ctgtacaaa 1740
gaatctgtag atcaaagagg aaaccagata atgtcagaca agaggaatgt catcctgttt 1800
tctgtatttg atgagaaccg aagctggtac ctcacagaga atatacaacg ctttctccc 1860
aatccagctg gagtgcagct tgaggatcca gatttccaag cctccaacat catgcacagc 1920
atcaatggct atgtttttga tagtttgagc ttgtcagttt gtttgcagta ggtggcatac 1980
tggtacattc taagcattgg agcacagact gacttccttt ctgtcttctt ctctggatat 2040
accttcaaac acaaaatggt ctatgaagac acactcacc ctttccatt ctccaggagaa 2100
actgtcttca tgtcagatga aaaccaggt ctatggattc tggggtgcc caactcagac 2160
tttccgaaca gaggcagcag ccgcttactg aaggtttcta gttgtgacaa gaactcaggt 2220
gattattacg aggacagtta tgaagatatt tcagcatact tgctgagtaa aaacaatgcc 2280
attgaacc aaagcttctc tcaaaacca ccagcttga aggccatca ggccgaaata 2340
actcgtacta ctcttcagtc agatcaagag gaaattgact atgatgatac catatcagtt 2400
gaaatgaaga aggaagattt tgacatttat gatgaggatg aaaatcagag cccccgagc 2460
tttcaaaaga aaacacgaca ctattttatt gctgcagtg agaggctctg ggattatggg 2520
atgagtagct ccccatatgt tctaagaaac agggctcaga gtggcagtg ccctcagttc 2580
aagaaagtg ttttccagga atttactgat ggctcctta ctccagcctt ataccgtgga 2640
gaactaaatg aacatttggg cctcctcggc ccatatataa gagcagaagt tgaagataat 2700
atcatggtaa ctttcagaaa tcaggcctct cgtccctatt ccttctattc tagccttatt 2760
tcttatgagg aagatcagag gcaaggagca gaacctagaa aaaactttgt caagcctaat 2820
gaaacaaaaa ctacttttg gaaagtgcaa catcatatgg caccactaa agatgagttt 2880
gactgcaaa cctgggctta tttctctgat gttgacctgg aaaaagatgt gcaactcagc 2940
ctgattggac cccttctggt ctgccacact aacacactga accctgctca tgggagacaa 3000

ES 2 753 124 T3

gtgacagtac aggaatttgc tctgtttttc accatctttg atgagaccaa aagctggtac 3060
 ttcactgaaa atatggaaag aaactgcagg gctccctgca atatccagat ggaagatccc 3120
 acttttaaag agaattatcg cttccatgca atcaatggct acataatgga taccactacct 3180
 ggcttagtaa tggctcagga tcaaaggatt cgatggatc tgctcagcat gggcagcaat 3240
 gaaaacatcc attctattca tttcagtgga catgtgttca ctgtacgaaa aaaagaggag 3300
 tataaaatgg cactgtacaa tctctatcca ggtgtttttg agacagtgga aatgttacca 3360
 tccaaagctg gaatttggcg ggtggaatgc cttattggcg agcatctaca tgctgggatg 3420
 agcacacttt ttctggtgta cagcaataag tgcagactc ccctgggaat ggcttctgga 3480
 cacattagag attttcagat tacagcttca ggacaatatg gacagtgggc cccaagctg 3540
 gccagacttc attattccgg atcaatcaat gcctggagca ccaaggagcc cttttcttgg 3600
 atcaagggtg atctgttggc accaatgatt attcacggca tcaagaccca gggtgcccgt 3660
 cagaagttct ccagcctcta catctctcag tttatcatca tgtatagtct tgatgggaag 3720
 aagtggcaga cttatcgagg aaattccact ggaaccttaa tggctctctt tggcaatgtg 3780
 gattcatctg ggataaaaca caatattttt aaccctcaa ttattgctcg atacatccgt 3840
 ttgcacccaa ctcattatag cattcgcagc actcttcgca tggagttagat gggctgtgat 3900
 ttaaatagtt gcagcatgcc attgggaatg gagagtaaag caatatcaga tgcacagatt 3960
 actgcttcat cctactttac caatatgttt gccacctggt ctccttcaa agctcgactt 4020
 cacctccaag ggaggagtaa tgcctggaga cctcaggtga ataatccaaa agagtggctg 4080
 caagtggact tccagaagac aatgaaagtc acaggagtaa ctactcaggg agtaaaatct 4140
 ctgcttacca gcatgtatgt gaaggagttc ctcacttcca gcagtcaaga tggccatcag 4200
 tggactctct tttttcagaa tggcaaagta aaggtttttc agggaaatca agactccttc 4260
 acacctgtgg tgaactctct agaccaccg ttactgactc gctaccttcg aattcacccc 4320
 cagagttggg tgcaccagat tgcctgagg atggaggttc tgggctgcga ggcacaggac 4380
 ctctactga 4389

<210> 103

<211> 1462

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FVIII 265

10

<400> 103

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

ES 2 753 124 T3

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

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

Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe
 50 55 60

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

His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu
 85 90 95

Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu
 100 105 110

Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser
 115 120 125

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

Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr
 145 150 155 160

Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu
 165 170 175

Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu
 180 185 190

Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu
 195 200 205

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

Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu
 225 230 235 240

Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His
 245 250 255

Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys
 260 265 270

ES 2 753 124 T3

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

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

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

Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile
 325 330 335

Ser Ser His Gln His Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser
 340 345 350

Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu
 355 360 365

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

Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys
 385 390 395 400

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

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

Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys
 435 440 445

Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu
 450 455 460

Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu
 465 470 475 480

Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro
 485 490 495

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

Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu

ES 2 753 124 T3

	515						520						525			
Pro	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Tyr	Lys	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	
	530					535						540				
Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	
	545				550					555					560	
Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	
				565					570					575		
Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	
			580					585					590			
Asp	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	
		595					600					605				
Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	
	610					615						620				
Val	Gln	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	
	625				630					635					640	
Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	
				645					650					655		
Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	
			660					665					670			
Leu	Ser	Val	Phe	Phe	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	
		675					680					685				
Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	
	690					695					700					
Ser	Met	Glu	Asn	Pro	Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	
	705				710					715					720	
Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	
				725					730					735		
Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	
			740					745					750			
Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	
		755					760						765			

ES 2 753 124 T3

Asn Pro Pro Val Leu Lys Ala His Gln Ala Glu Ile Thr Arg Thr Thr
 770 775 780
 Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val
 785 790 795
 Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln
 805 810 815
 Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala
 820 825 830
 Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu
 835 840 845
 Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val
 850 855 860
 Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly
 865 870 875 880
 Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu
 885 890 895
 Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro
 900 905 910
 Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln
 915 920 925
 Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr
 930 935 940
 Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe
 945 950 955 960 965
 Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp
 965 970 975
 Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr
 980 985 990
 Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu
 995 1000 1005
 Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
 1010 1015 1020

ES 2 753 124 T3

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

ES 2 753 124 T3

Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr
 1265 1270 1275

Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
 1280 1285 1290

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

Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser
 1310 1315 1320

Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala
 1325 1330 1335

Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val
 1340 1345 1350

Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met
 1355 1360 1365

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

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

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

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

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

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

Gln Asp Leu Tyr
 1460

<210> 104

<211> 5691

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FVIII198

ES 2 753 124 T3

<400> 104μ

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttctt cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180
acctcagtcg tgtacaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccagge tgaggtttat	300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctggt	360
ggtgtatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg	420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggtctctg	480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccoc ctgtgcctta cctactcata tctttctcat	540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctccattggag cctactagt atgtagagaa	600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttctgta	660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct	780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgtgat tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct	900
cgccaggcgt ccttggaat ctgcgaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gaccttgac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacatga tggcatggaa	1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat	1140
gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgtcagttg ccaagaagca tcctaaaact	1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320
aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct	1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggagttgg agacacactg	1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaagggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
actaaatcag atoctcggtg cctgaccocg tattactcta gtttcgtaa tatggagaga	1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa	1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag	1800

ES 2 753 124 T3

aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg	1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt	1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgttg catgagggtg catactggta cattctaagc	1980
attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa	2040
atggctctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt ctcatgtcg	2100
atggaaaacc caggctctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc	2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagtgtg gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac	2220
agttatgaag atatctcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc	2280
ttctctcaga attcaagaca ccctagcact aggcaaaagc aatttaatgc caccacaatt	2340
ccagaaaatg acatagagaa gactgaccct tggtttgcac acagaacacc tatgcctaaa	2400
atacaaaatg tctcctctag tgatttggtg atgctcttgc gacagagtcc tactccacat	2460
gggctatcct tatctgatct ccaagaagcc aaatatgaga ctttttctga tgatccatca	2520
cctggagcaa tagacagtaa taacagcctg tctgaaatga cacactcag gccacagctc	2580
catcacagtg gggacatggt atttaccctt ggtcaggcc tccaattaag attaaatgag	2640
aaactgggga caactgcagc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttctagtaca	2700
tcaaaataatc tgatttcaac aattccatca gacaatttgg cagcaggtac tgataataca	2760
agttccttag gacccccaaag tatgccagtt cattatgata gtcaattaga taccactcta	2820
tttggcaaaa agtcatctcc cttactgag tctggtggac ctctgagctt gagtgaagaa	2880
aataatgatt caaagttggt agaactcaggt ttaatgaata gccaaagaaag ttcatgggga	2940
aaaaatgtat cgtcagaaat aactcgtact actcttcagt cagatcaaga ggaaattgac	3000
tatgatgata ccatatcagt tgaaatgaag aaggaagatt ttgacattta tgatgaggat	3060
gaaaatcaga gccccgcag ctttcaaaag aaaacacgac actattttat tgctgcagtg	3120
gagaggctct gggattatgg gatgagtagc tccccacatg ttctaagaaa cagggtcag	3180
agtggcagtg tccctcagtt caagaaagtt gttttccagc aatttactga tggctccttt	3240
actcagccct tataccgtgg agaactaaat gaacatttgg gactcctggg gccatatata	3300
agagcagaag ttgaagataa tatcatggta actttcagaa atcaggcctc tcgtccctat	3360
tccttctatt ctagccttat ttcttatgag gaagatcaga ggcaaggagc agaacctaga	3420
aaaaactttg tcaagcctaa tgaaaccaa acttactttt ggaaagtgca acatcatatg	3480
gcacccacta aagatgagtt tgactgcaaa gcctgggctt atttctctga tgttgacctg	3540
gaaaaagatg tgcaactcagg cctgattgga cccttctg tctgccacac taacacactg	3600
aaccctgctc atgggagaca agtgacagta caggaatttg ctctgtttt caccatcttt	3660

ES 2 753 124 T3

gatgagacca aaagctggta cttcactgaa aatatggaaa gaaactgcag ggctccctgc 3720
aatatccaga tggagatcc cactttttaa gagaattatc gcttccatgc aatcaatggc 3780
tacataatgg atacactacc tggcttagta atggctcagg atcaaaggat tcgatgggat 3840
ctgctcagca tgggcagcaa tgaaaacatc cattctatc atttcagtgg acatgtgttc 3900
actgtacgaa aaaaagagga gtataaaatg gcaactgtaca atctctatcc aggtgttttt 3960
gagacagtgg aatgttacc atccaaagct ggaatttggc ggggtggaatg ccttattggc 4020
gagcatctac atgctgggat gagcacactt tttctgggtg acagcaataa gtgtcagact 4080
cccctgggaa tggcttctgg acacattaga gattttcaga ttacagcttc aggacaatat 4140
ggacagtggg ccccaaagct ggccagactt cattattccg gatcaatcaa tgccctggagc 4200
accaagagac ccttttcttg gatcaaggtg gatctgttgg caccaatgat tattcacggc 4260
atcaagacc aggggtgccc tcagaagttc tccagcctct acatctctca gtttatcatc 4320
atgtatagtc ttgatgggaa gaagtggcag acttatcgag gaaattccac tggaacctta 4380
atggtcttct ttggcaatgt ggattcatct gggataaaac acaatatttt taaccctcca 4440
attattgctc gatacatccg tttgcacca actcattata gcattcgag cactcttcgc 4500
atggagtga tgggctgtga tttaaatagt tgcagcatgc cattgggaat ggagagtaaa 4560
gcaatatcag atgcacagat tactgcttca tcctacttta ccaatatgtt tgccacctgg 4620
tctccttcaa aagctcgact tcacctcaa gggaggagta atgcctggag acctcaggtg 4680
aataatccaa aagagtggct gcaagtggac ttccagaaga caatgaaagt cacaggagta 4740
actactcagg gagtaaaatc tctgcttacc agcatgtatg tgaaggagt cctcatctcc 4800
agcagtcaag atggccatca gtggactctc ttttttcaga atggcaaagt aaaggttttt 4860
cagggaaatc aagactcctt cacacctgtg gtgaactctc tagaccacc gttactgact 4920
cgctaccttc gaattcacc ccagagtgg gtgcaccaga ttgccctgag gatggagggt 4980
ctgggctgag aggcacagga cctctacgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagct 5040
ccagaactcc tgggcgacc gtcagtctc ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc 5100
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 5160
gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 5220
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag 5280
gactggtga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc 5340
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacacctg 5400
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 5460
ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 5520
aagaccagc ctcccgtgtt ggactccgac ggctcctct tctctacag caagctcacc 5580
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 5640
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaata a 5691

<210> 105

5 <211> 1896

<212> PRT

ES 2 753 124 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FVIII 198

5

<400> 105

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 753 124 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 753 124 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro

ES 2 753 124 T3

690						695										700
Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	
705					710					715					720	
Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	
				725					730					735		
Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	
			740					745					750			
Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro	
		755					760					765				
Ser	Thr	Arg	Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Glu	Asn	Asp	
	770					775					780					
Ile	Glu	Lys	Thr	Asp	Pro	Trp	Phe	Ala	His	Arg	Thr	Pro	Met	Pro	Lys	
785					790					795					800	
Ile	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Gln	Ser	
				805					810						815	
Pro	Thr	Pro	His	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Tyr	
			820					825					830			
Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Ile	Asp	Ser	Asn	Asn	
		835					840					845				
Ser	Leu	Ser	Glu	Met	Thr	His	Phe	Arg	Pro	Gln	Leu	His	His	Ser	Gly	
	850					855					860					
Asp	Met	Val	Phe	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Leu	Gln	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu	
865					870					875					880	
Lys	Leu	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	
				885					890					895		
Val	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Asn	Leu	Ile	Ser	Thr	Ile	Pro	Ser	Asp	Asn	
			900					905					910			
Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Asn	Thr	Ser	Ser	Leu	Gly	Pro	Pro	Ser	Met	
		915					920					925				
Pro	Val	His	Tyr	Asp	Ser	Gln	Leu	Asp	Thr	Thr	Leu	Phe	Gly	Lys	Lys	
	930					935					940					

ES 2 753 124 T3

Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu
945 950 955 960

Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu
965 970 975

Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
980 985 990

Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu
995 1000 1005

Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln
1010 1015 1020

Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala
1025 1030 1035

Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His
1040 1045 1050

Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys
1055 1060 1065

Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro
1070 1075 1080

Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro
1085 1090 1095

Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg
1100 1105 1110

Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser
1115 1120 1125

Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe
1130 1135 1140

Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His
1145 1150 1155

His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala
1160 1165 1170

Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu
1175 1180 1185

ES 2 753 124 T3

Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala
 1190 1195 1200

His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr
 1205 1210 1215

Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu
 1220 1225 1230

Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr
 1235 1240 1245

Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met
 1250 1255 1260

Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg
 1265 1270 1275

Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile
 1280 1285 1290

His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr
 1295 1300 1305

Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val
 1310 1315 1320

Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu
 1325 1330 1335

Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val
 1340 1345 1350

Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His
 1355 1360 1365

Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp
 1370 1375 1380

Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala
 1385 1390 1395

Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu
 1400 1405 1410

Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln
 1415 1420 1425

ES 2 753 124 T3

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

ES 2 753 124 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo de reconocimiento de sortasa

5

<220>

<221> característica_misc

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que existe de forma natural

10

<400> 106

Leu Pro Xaa Thr Gly
1 5

15

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> péptido que contiene cisteína

<400> 107

25

Gly Gly Gly Ser Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 108

<211> 4548

<212> ADN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VWF 031

35

<400> 108

ES 2 753 124 T3

atgattcctg ccagatttgc oggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt gccagggacc 60
ctttgtgcag aaggaactcg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct tttcgggaagt 120
gacttogtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg cagttacctc 180
ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca gaatggcaag 240
agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tocatttgtt tgtcaatggt 300
accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg gctgtatcta 360
gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt ggccaggatc 420
gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa gacctgcggg 480
ctgtgtggca actttaacat ctttctgtaa gatgacttta tgaccaaga agggaccttg 540

ES 2 753 124 T3

acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga acagtgggtg 600
 gaacgggcat ctctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat gcagaagggc 660
 ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcgggtg ttgcccgtg ccaccctctg 720
 gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg tgctgggggg 780
 ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccgga cctgtgccca ggagggaatg 840
 gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc tggatggag 900
 tataggcagt gtgtgtccc ttgcccagg acctgccaga gcctgcacat caatgaaatg 960
 tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgccctgagg gacagctcct ggatgaaggc 1020
 ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta ccctcccggc 1080
 acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg gatctgcagc 1140
 aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc actgggtcaat cccacttcaa gagctttgac 1200
 aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga ttgccaggac 1260
 cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgca cgctgtgtgc 1320
 acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtgaa actgaagcat 1380
 ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac atccagctcc ccctcctgaa aggtgacctc 1440
 cgcacccagc atacagtga ggcctccgtg cgcctcagct acggggagga cctgcagatg 1500
 gactgggatg gccggggag gctgtggtg aagctgtccc ccgtctatgc cgggaagacc 1560
 tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg acttccttac cccctctggg 1620
 ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg ggactgccag 1680
 gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcatgac caggttctcc 1740
 gaggagcgt gcgcggtcct gacgtcccc acattegagg cctgccatcg tgccgtcagc 1800
 ccgctgccct acctgcgga ctgccgtac gacgtgtgct cctgctcgga cggcccgag 1860
 tgcctgtgcg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg cgtgcgcgtc 1920
 gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccagggt gtacctgcag 1980
 tgcgggaccc cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccgatga ggaatgcaat 2040
 gaggcctgcc tggagggctg cttctgcccc ccagggctct acatggatga gaggggggac 2100
 tgcgtgccca aggccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca gccagaagac 2160
 atcttctcag accatcacac catgtgtac tgtgaggatg gcttcatgca ctgtaccatg 2220
 agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtcccct gtctcatcgc 2280
 agcaaaagga gcctatcctg tcggccccc atgggtcaagc tgggtgtgctc cgctgacaac 2340
 ctgcgggctg aagggtcga gtgtaccaa acgtgccaga actatgacct ggagtgcag 2400

ES 2 753 124 T3

agcatgggct gtgtctctgg ctgcctctgc cccccgggca tggccgggca tgagaacaga 2460
 tgtgtggccc tggaaagggtg tccctgcttc catcagggca aggagtatgc ccctggagaa 2520
 acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgtcgggacc ggaagtggaa ctgcacagac 2580
 catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgata ggcattggccc actacctcac ctccgacggg 2640
 ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta ctgcggcagt 2700
 aaccctggga cctttcggat cctagtgggg aataagggat gcagccacc ctcagtgaaa 2760
 tgcaagaaac gggtcacccat cctgggtggag ggaggagaga ttgagctgtt tgacggggag 2820
 gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtgggtga gtctggccgg 2880
 tacatcattc tgtgtctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca cctgagcacc 2940
 tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg gaattttgat 3000
 ggcattccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga ccctgtggac 3060
 tttgggaact cctggaaagt gagctcgcag tgtgctgaca ccagaaaagt gcctctggac 3120
 tcatcccctg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatgggtga ttctctctgt 3180
 agaatcctta ccagtgacct ctccaggac tgcaacaagc tgggtggacc cgagccatat 3240
 ctggatgtct gcatttacga cacctgctcc tgtgagtcca ttggggactg cgccgattc 3300
 tgcgacacca ttgctgcta tgcccacgtg tgtgcccagc atggcaaggt ggtgacctgg 3360
 aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga gaacgggtat 3420
 gaggctgagt ggcgctataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtacgtg tcagcaccct 3480
 gagccactgg cctgcctgtg gcagtgtgtg gagggtgcc atgcccactg ccctccaggg 3540
 aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgacctg aagactgtcc agtgtgtgag 3600
 gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaag aaagtacct tgaatcccag tgacctgag 3660
 cactgccaga ttgccaactg tgatgttgc aacctacct gtgaagcctg ccaggagccg 3720
 atatctggcg gtggagggtc cgggtggcgg ggatccggcg gtggagggtc cggcgggtga 3780
 ggttccgggtg gcgggggata cgggtggcgg ggatccctgg tccccgggg cagcggcgg 3840
 ggaggttccg gtggcggggg atccgacaaa actcacacat gccaccgtg ccagctcca 3900
 gaactcctgg gcggaccgtc agtcttctc tcccccaa aaccaagga cacctcatg 3960
 atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agacctgag 4020
 gtcaagttca actggtacct ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcg 4080
 gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg tlcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 4140
 tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 4200
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta cacctgcc 4260
 ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggctc 4320
 tatcccagcg acatgcctgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 4380
 accacgcctc ccgtgttga ctccgacggc tcttcttcc tctacagaa gctcaccgtg 4440
 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 4500
 cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga 4548

ES 2 753 124 T3

<211> 1515

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> VWF 031

<400> 109

```

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
 1           5           10           15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
           20           25           30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
           35           40           45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
 50           55           60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65           70           75           80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
           85           90           95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
           100           105           110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
           115           120           125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130           135           140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145           150           155           160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
           165           170           175

```

10

ES 2 753 124 T3

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
 180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
 195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
 210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
 225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
 245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
 260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
 275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
 290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
 305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
 325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
 340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
 355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
 370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
 385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
 405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
 420 425 430

ES 2 753 124 T3

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
 435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
 450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
 465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
 485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
 500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
 515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
 530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
 545 550 555

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
 565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
 580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
 595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
 610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
 625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
 645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
 660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe

ES 2 753 124 T3

675					680					685					
Cys	Pro	Pro	Gly	Leu	Tyr	Met	Asp	Glu	Arg	Gly	Asp	Cys	Val	Pro	Lys
	690					695					700				
Ala	Gln	Cys	Pro	Cys	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Glu	Ile	Phe	Gln	Pro	Glu	Asp
705					710					715					720
Ile	Phe	Ser	Asp	His	His	Thr	Met	Cys	Tyr	Cys	Glu	Asp	Gly	Phe	Met
				725					730					735	
His	Cys	Thr	Met	Ser	Gly	Val	Pro	Gly	Ser	Leu	Leu	Pro	Asp	Ala	Val
			740					745					750		
Leu	Ser	Ser	Pro	Leu	Ser	His	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg
		755					760						765		
Pro	Pro	Met	Val	Lys	Leu	Val	Cys	Pro	Ala	Asp	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu
	770					775					780				
Gly	Leu	Glu	Cys	Thr	Lys	Thr	Cys	Gln	Asn	Tyr	Asp	Leu	Glu	Cys	Met
785					790					795					800
Ser	Met	Gly	Cys	Val	Ser	Gly	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	Met	Val	Arg
				805					810					815	
His	Glu	Asn	Arg	Cys	Val	Ala	Leu	Glu	Arg	Cys	Pro	Cys	Phe	His	Gln
			820					825					830		
Gly	Lys	Glu	Tyr	Ala	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Cys	Asn	Thr
		835					840					845			
Cys	Val	Cys	Arg	Asp	Arg	Lys	Trp	Asn	Cys	Thr	Asp	His	Val	Cys	Asp
	850					855					860				
Ala	Thr	Cys	Ser	Thr	Ile	Gly	Met	Ala	His	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asp	Gly
865					870					875					880
Leu	Lys	Tyr	Leu	Phe	Pro	Gly	Glu	Cys	Gln	Tyr	Val	Leu	Val	Gln	Asp
				885					890					895	
Tyr	Cys	Gly	Ser	Asn	Pro	Gly	Thr	Phe	Arg	Ile	Leu	Val	Gly	Asn	Lys
			900					905					910		
Gly	Cys	Ser	His	Pro	Ser	Val	Lys	Cys	Lys	Lys	Arg	Val	Thr	Ile	Leu
		915					920					925			

ES 2 753 124 T3

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
 930 935 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
 945 950 955 960

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
 965 970 975

His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val
 980 985 990

Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr
 995 1000 1005

Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn
 1010 1015 1020

Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro
 1025 1030 1035

Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln
 1040 1045 1050

Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe
 1055 1060 1065

Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
 1070 1075 1080

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala
 1085 1090 1095

Ala Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln
 1100 1105 1110

His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln
 1115 1120 1125

Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Ala Glu
 1130 1135 1140

Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln
 1145 1150 1155

His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys
 1160 1165 1170

ES 2 753 124 T3

His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln
1175 1180 1185

Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly
1190 1195 1200

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp
1205 1210 1215

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1235 1240 1245

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1250 1255 1260

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser
1265 1270 1275

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr
1280 1285 1290

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
1295 1300 1305

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
1310 1315 1320

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
1325 1330 1335

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
1340 1345 1350

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
1355 1360 1365

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
1370 1375 1380

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
1385 1390 1395

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
1400 1405 1410

ES 2 753 124 T3

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 1415 1420 1425

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 1430 1435 1440

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 1445 1450 1455

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 1460 1465 1470

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 1475 1480 1485

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 1490 1495 1500

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 1505 1510 1515

<210> 110

<211> 40

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector

10

<220>

<221> REPETIR

<222> (1)..(5)

<223> Repetición de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser

15

<400> 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40

ES 2 753 124 T3

<210> 111
<211> 62
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> ESC54-VWF directo con sitio BsiW1

<400> 111

10

cgcttcgcga cgtacggcgc ccaccatgat tcttgccaga tttgccgggg tgctgcttgc 60
tc 62

<210> 112
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Oligonucleótido de clonación de ESC 124 - D1D2 con sitio Not1-inverso

20

<400> 112
ctagactcga gcggccgctc acctttgct gcgatgagac aggggactgc tgaggacagc 60

<210> 113
<211> 2289
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> VWF 053 (VWF D1D2-propéptido)

30

<400> 113

ES 2 753 124 T3

atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt gccagggacc	60
ctttgtgcag aaggaactcg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct tttcggaagt	120
gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg cagttacctc	180
ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca gaatggcaag	240
agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttggt tgtcaatggt	300
accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg gctgtatcta	360
gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt gcccaggatc	420
gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa gacctgcggg	480
ctgtgtggca actttaacat ctttgctgaa gatgacttta tgaccaaga agggaccttg	540
acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga acagtgggtg	600
gaaacgggcat ctctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat gcagaagggc	660
ctgtgggagc agtgccagct tetgaagagc acctcgggtg ttgcccgtg ccaccctctg	720
gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg tgctgggggg	780
ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccgga cctgtgcca ggagggaaatg	840
gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc tggatatggag	900
tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat caatgaaatg	960
tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgccctgagg gacagctcct ggatgaaggc	1020

ES 2 753 124 T3

ctctgCGTgG agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta ccctcccggc 1080
 acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtG gatctgcagc 1140
 aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc actgggtcaat cccacttcaa gagctttgac 1200
 aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga ttgccaggac 1260
 cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgoga cgctgtgtgc 1320
 acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtgaa actgaagcat 1380
 ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac atccagctcc ccctcctgaa aggtgacctc 1440
 cgcattccagc atacagtGac ggccctccgtg cgcctcagct acggggagga cctgcagatg 1500
 gactgggatg gccgcgggag gctgctgggtg aagctgtccc ccgtctatgc cggaagacc 1560
 tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg acttccttac ccctctggg 1620
 ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg ggactgccag 1680
 gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gcctcaacc cgcgcatgac caggttctcc 1740
 gaggagggcgt gcgcggtcct gacgtcccc acattcgagg cctgccatcg tgccgtcagc 1800
 ccgtgccct acctgcggaa ctgccgtac gacgtgtgct cctgctcgga cggccgag 1860
 tgctgtgctg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgctg cggggagagg cgtgcgctc 1920
 gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt gtacctgcag 1980
 tgcgggacc cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccgatga ggaatgcaat 2040
 gaggcctgcc tggagggtg cttctgcccc ccagggtctt acatggatga gaggggggac 2100
 tgcgtgcccaggccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca gccagaagac 2160
 atcttctcag accatcacac catgtgtac tgtgaggatg gcttcatgca ctgtaccatg 2220
 agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtcccct gtctcatcgc 2280
 agcaaaaagg 2289

<210> 114

<211> 763

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VWF 053 (VWF D1D2-Propéptido)

10

<400> 114

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
 20 25 30

ES 2 753 124 T3

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
275 280 285

ES 2 753 124 T3

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
 290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
 305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
 325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
 340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
 355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
 370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
 385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
 405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
 420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
 435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
 450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
 465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
 485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
 500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
 515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
 530 535 540

ES 2 753 124 T3

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg
755 760

REIVINDICACIONES

1. Una proteína quimérica que comprende una proteína factor VIII ("FVIII") y un fragmento de factor de von Willebrand (VWF),
 5 en donde la proteína FVIII comprende un dominio A1, un dominio A2, un dominio A3, un dominio C1 y un dominio C2;
 en donde el fragmento de VWF comprende un dominio D' y un dominio D3 de VWF; y
 en donde el fragmento de VWF y la proteína FVIII se unen por un enlace covalente, que previene la disociación del fragmento de VWF de la proteína FVIII en presencia de VWF endógeno,
 10 en donde el fragmento de VWF inhibe o previene que VWF endógeno se una a la proteína FVIII por protección o bloqueo de un sitio de unión de VWF sobre la proteína FVIII.
2. La proteína quimérica de la reivindicación 1, en donde el enlace covalente comprende:
 (i) un enlace peptídico o
 (ii) un enlace disulfuro o
 (iii) un conector entre la proteína FVIII y el fragmento de VWF.
- 15 3. La proteína quimérica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el fragmento de VWF se asocia con la proteína FVIII por un enlace no covalente, además del enlace covalente.
4. La proteína quimérica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el fragmento de VWF comprende al menos un resto heterólogo (H1).
- 20 5. La proteína quimérica de la reivindicación 3, en donde el fragmento de VWF comprende además un conector, en donde el conector está entre el fragmento de VWF y el resto heterólogo (H1).
6. La proteína quimérica de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde la proteína FVIII comprende al menos un resto heterólogo adicional (H2).
7. La proteína quimérica de la reivindicación 6, en donde el resto heterólogo (H1) comprende:
 25 a. al menos una de una región constante de inmunoglobulina, albúmina, un resto de unión a albúmina, una secuencia Pro-Ala-Ser (PAS), una secuencia de homopolímero de aminoácidos (HAP), transferrina, polietilenglicol (PEG), ácido polisiálico, hidroxietilalmidón (HES), y cualquier combinación de los mismos; o
 b. una primera región Fc; y/o
 el resto heterólogo (H2) comprende:
 30 c. al menos una de una región constante de inmunoglobulina, albúmina, un resto de unión a albúmina, una secuencia de PAS, una secuencia de HAP, transferrina, polietilenglicol (PEG), ácido polisiálico, hidroxietilalmidón (HES), y cualquier combinación de los mismos; o
 d. una segunda región Fc.
8. La proteína quimérica de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde el resto heterólogo (H1) comprende una primera región Fc, y el resto heterólogo (H2) comprende una segunda región Fc, en donde el enlace covalente es entre la primera región Fc y la segunda región Fc.
 35
9. La proteína quimérica de la reivindicación 1, en donde la proteína quimérica comprende una fórmula seleccionada de:
 (a) V-L1-H1-L3-H2-L2-C, o
 (b) C-L2-H2-L3-H1-L1-V,
 40 en donde en las fórmulas (a) y (b)
 V es el fragmento de VWF;
 L1 es un conector opcional;
 L2 es un conector opcional;

L3 es un conector opcional;

cada uno de H1 y H2 comprende un resto heterólogo opcional;

C comprende la proteína FVIII; y

(-) es un enlace peptídico o uno o más aminoácidos;

5 o en donde la proteína quimérica comprende la fórmula:

(c) V-L1-H1: H2-L2-C,

en donde en la fórmula (c)

V es el fragmento de VWF;

L1 es un conector opcional;

10 L2 es un conector opcional;

H1 es un primer resto heterólogo;

H2 es un segundo resto heterólogo;

C es la proteína FVIII;

(-) es un enlace peptídico o uno o más aminoácidos; y

15 (:) es un enlace covalente entre H1 y H2.

10. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además un conector entre la proteína FVIII y el fragmento de VWF.

20 11. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la secuencia de aminoácidos del dominio D' del fragmento de VWF es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a los aminoácidos 764 a 866 de SEQ ID NO: 2, y en donde la secuencia de aminoácidos del dominio D3 del fragmento de VWF es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a los aminoácidos 867 a 1240 de SEQ ID NO: 2.

12. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el fragmento de VWF comprende además el dominio D1, el dominio D2, o los dominios D1 y D2 de VWF.

25 13. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la proteína FVIII comprende el dominio B o una porción del mismo.

14. Un polinucleótido o un conjunto de polinucleótidos que codifica la proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el conjunto de polinucleótidos comprende un primer polinucleótido que codifica el fragmento de VWF y un segundo polinucleótido que codifica la proteína FVIII.

30 15. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido o el conjunto de polinucleótidos de la reivindicación 14.

16. Una composición farmacéutica que comprende la proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, el polinucleótido o el conjunto de polinucleótidos de la reivindicación 14, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 17. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, el polinucleótido o el conjunto de polinucleótidos de la reivindicación 14, o la composición farmacéutica de la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección hemorrágica en un sujeto en necesidad del mismo, en donde la enfermedad hemorrágica o trastorno se selecciona del grupo que consiste en un trastorno hemorrágico de la coagulación, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia dentro de los músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo craneal, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de huesos, sangrado del sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, sangrado en la vaina del iliopsoas, y cualquier combinación de los mismos.

40 18. Un método de preparación de la proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende transfectar uno o más células hospedadoras con el polinucleótido o el conjunto de polinucleótidos de la reivindicación 14, y expresar la proteína quimérica en la célula hospedadora.

45

Figura 1: Construcciones de VWF diferentes

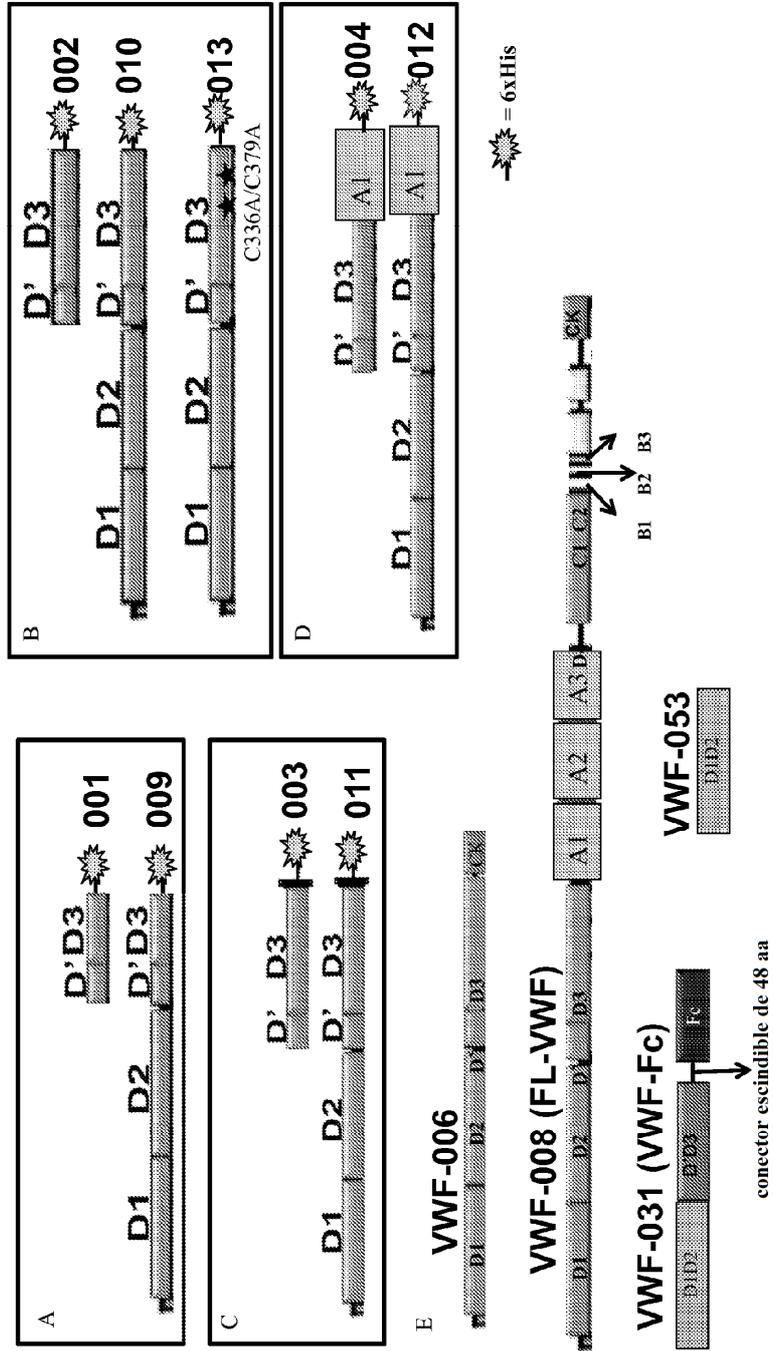
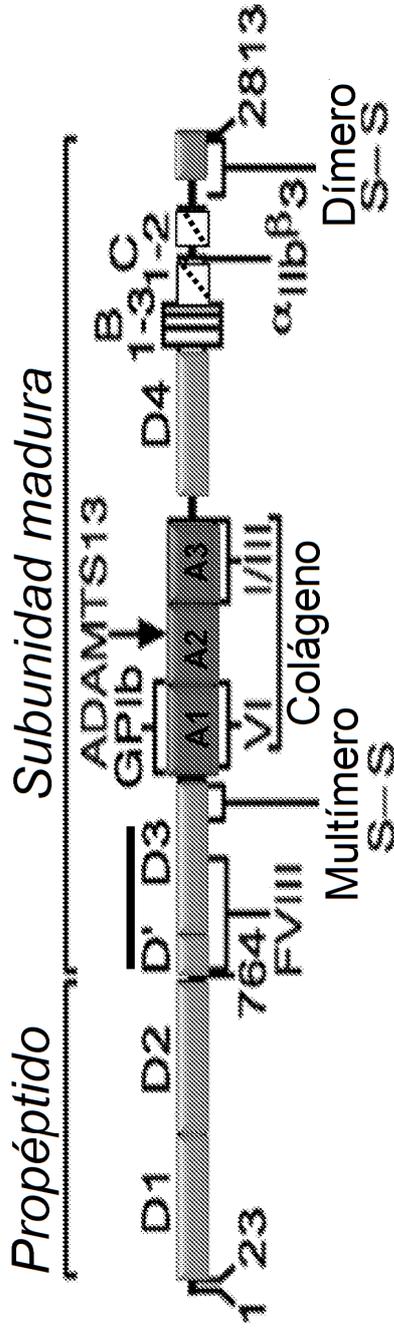


Figura 1F: Factor de von Willebrand

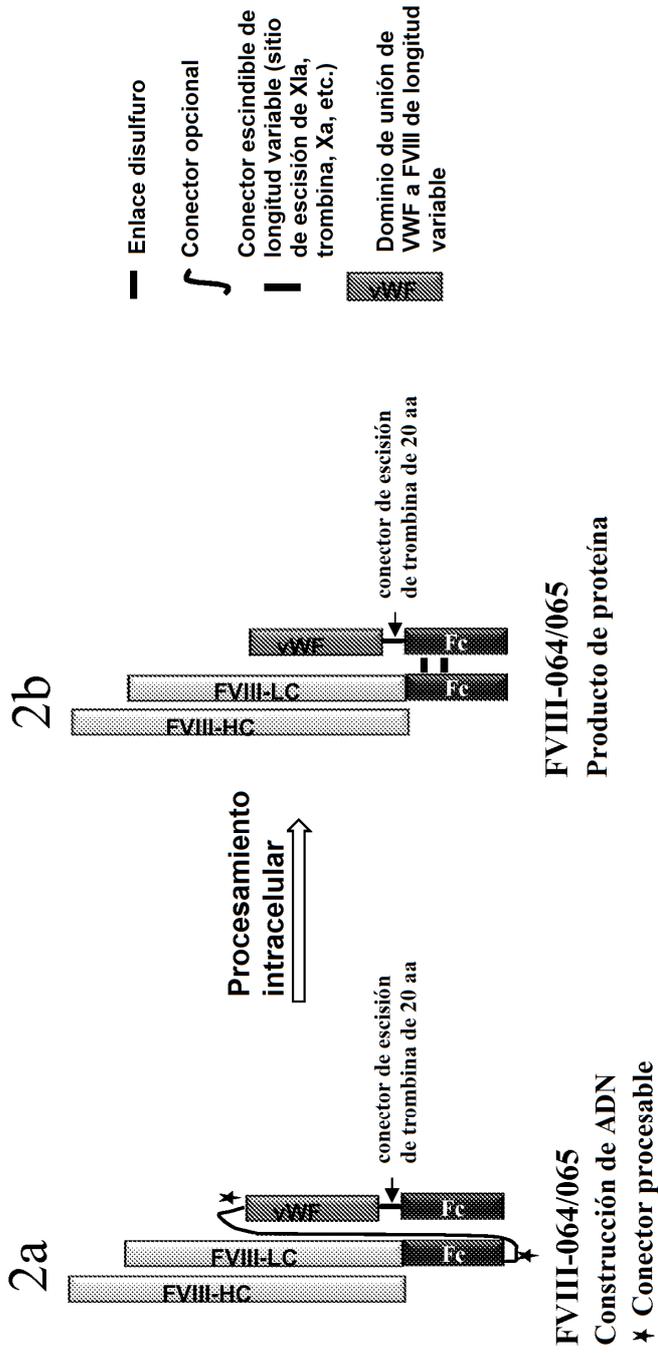


- Proteína de ~ 250 kDa, forma multímeros (> 20 MDa) por enlaces disulfuro
- Se asocia con FVIII (95-98 %) en complejo no covalente
 - Protege VIII de la escisión / activación de proteasa
 - Estabiliza la cadena pesada y ligera
 - Previene la eliminación de FVIII por receptores depuradores
- Eliminación del complejo FVIII-vWF mediante receptores de vWF
- ¿Previene la pinocitosis y recirculación de rFVIIIc?

Prolonga la semivida

Limita la semivida

Figura 2: Construcciones de FVIII (heterodímero FVIII/VWF)



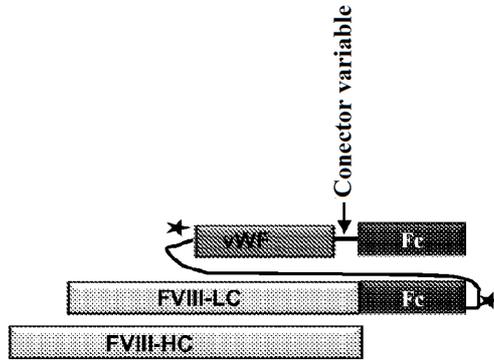
FVIII-064: Contiene VWF D'D3 1-477 aa con C336A/C379A

FVIII-065: Contiene VWF D'D3 1-276 aa

FVIII-136: FVIII-064 en esqueleto de pCDNA

FVIII-148: Se ha cambiado la molécula de FVIII de cadena doble en FVIII-136 a un FVIII de cadena sencilla introduciendo la mutación R1645A/R1648A en el gen FVIII

Figura 3: Construcciones de FVIII (conector variable)



FVIII-064, 159, 160, 178, 179

★ Conector procesable in vivo

Construcción de ADN	Conector entre VWF y F _c
FVIII-064	20 aa= ID {2X(GGGGS)}LVPRGSGG
FVIII-159	35 aa= IS{5X(GGGGS)}LVPRGSGG
FVIII-160 y sus derivados	FVIII-160: 48 aa= IS{6X(GGGGS)}LVPRGSGGGSGGGGS
	FVIII-180: FVIII-160 con mutación K2092A en dominio C1 de FVIII
	FVIII-181: FVIII-160 con mutación K2093A en dominio C1 de FVIII
FVIII-178	FVIII-182: FVIII-160 con mutaciones K2092A/F2093A en dominio C1 de FVIII
FVIII-179	73 aa= IS{11X(GGGGS)}LVPRGSGGGSGGGGS
VWF= D'D3 (1-477 aa con C336A/C379A)	98 aa= IS{16X(GGGGS)}LVPRGSGGGSGGGGS

Figura 4: Construcciones de FVIII

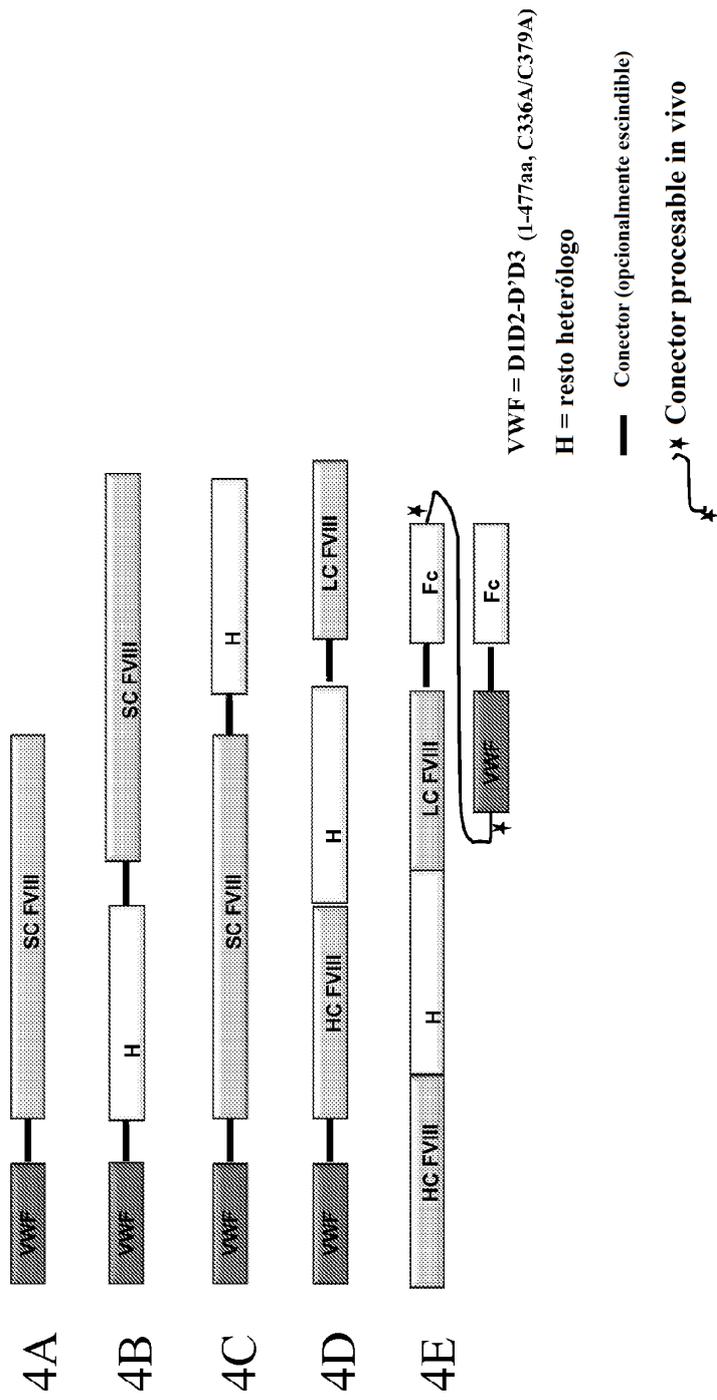


Figura 4: Construcciones de FVIII (continuación)

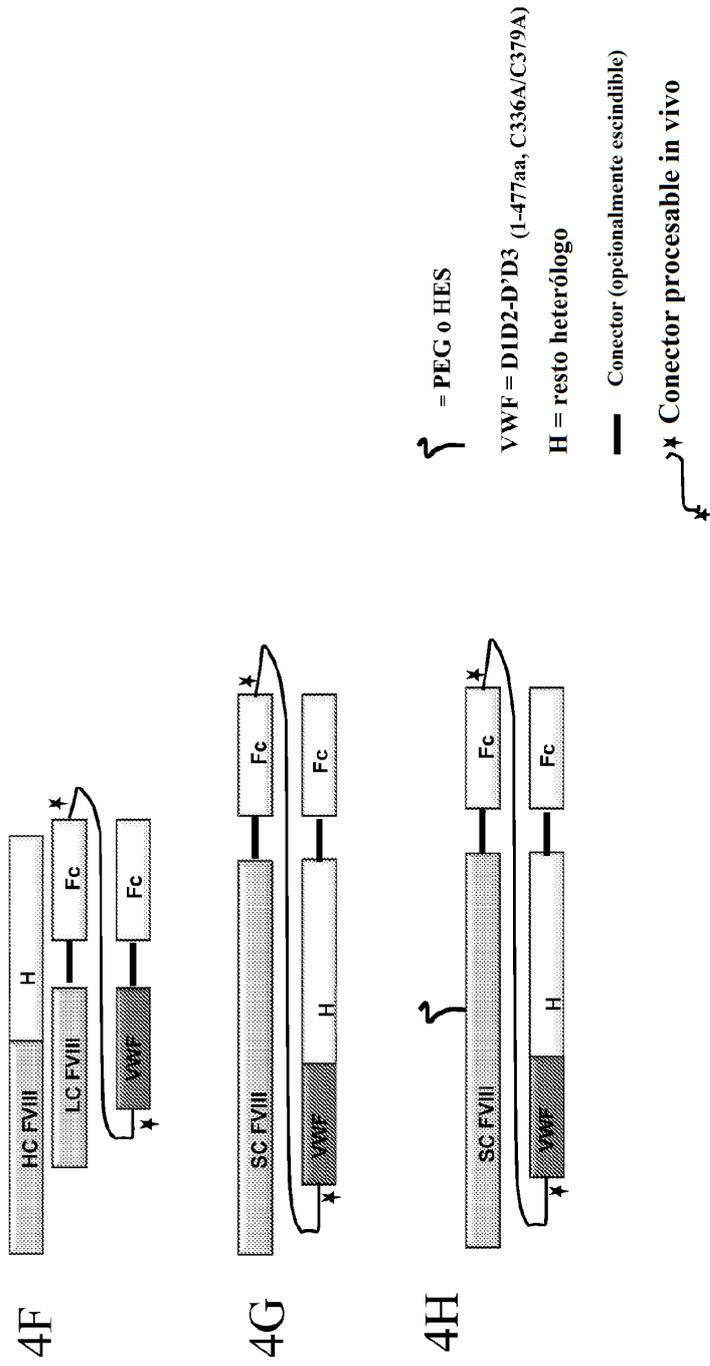


Figura 5: Construcciones de FVIII (sistema de co-transfección)

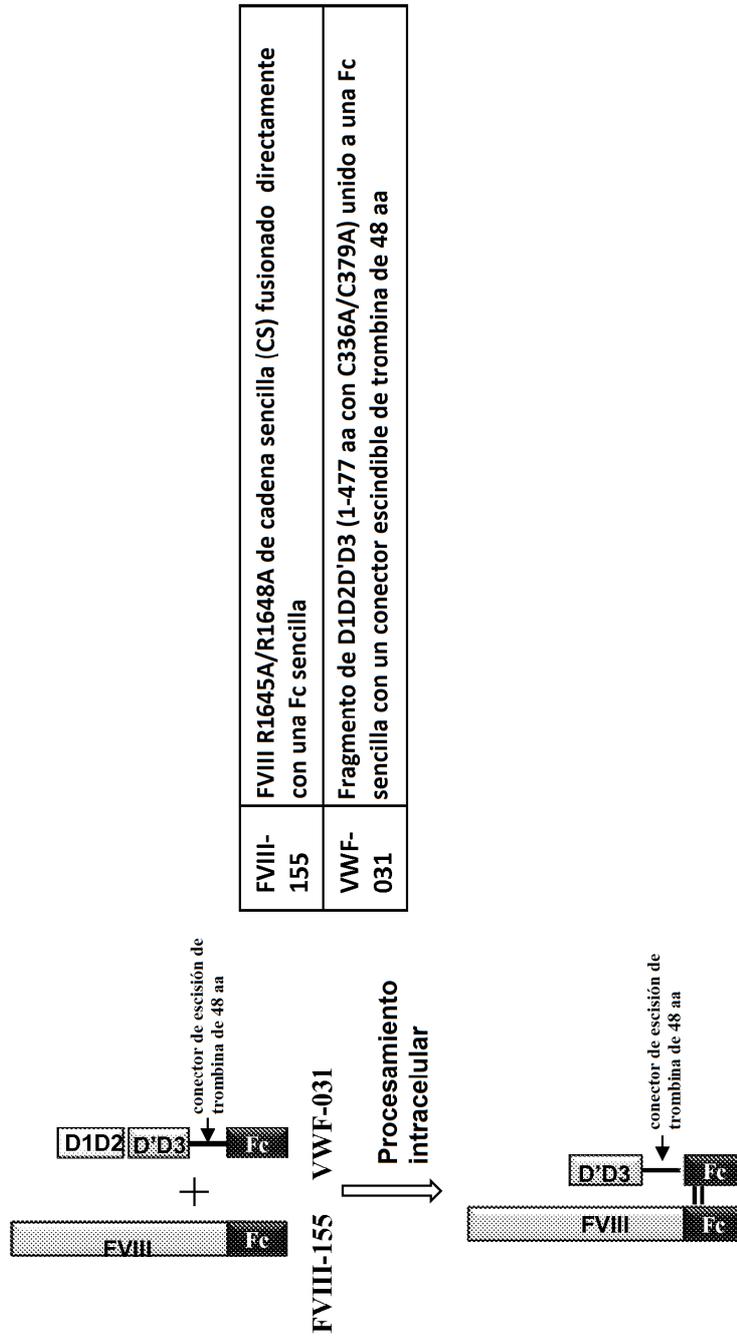
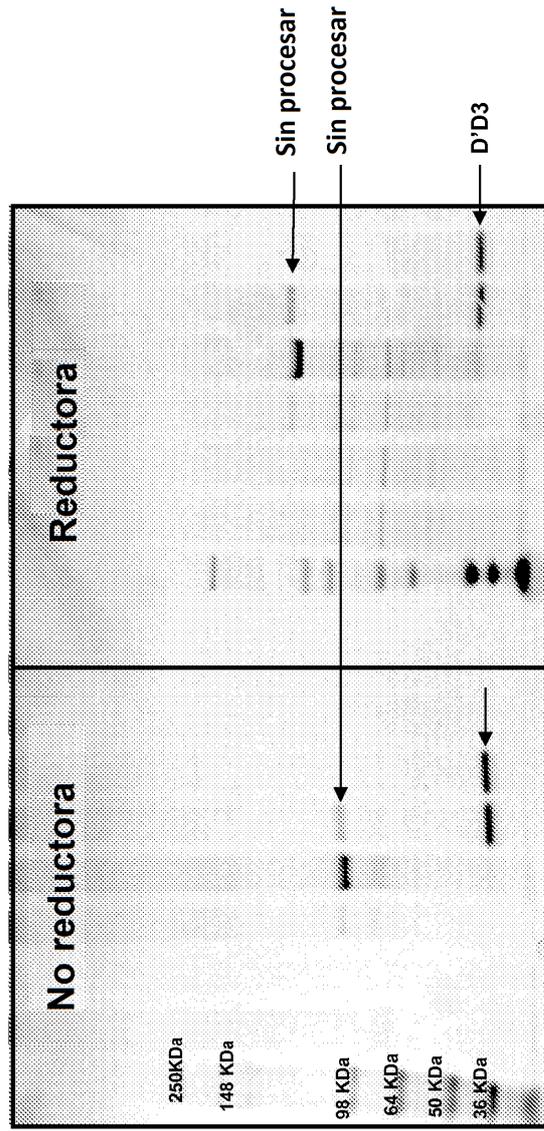
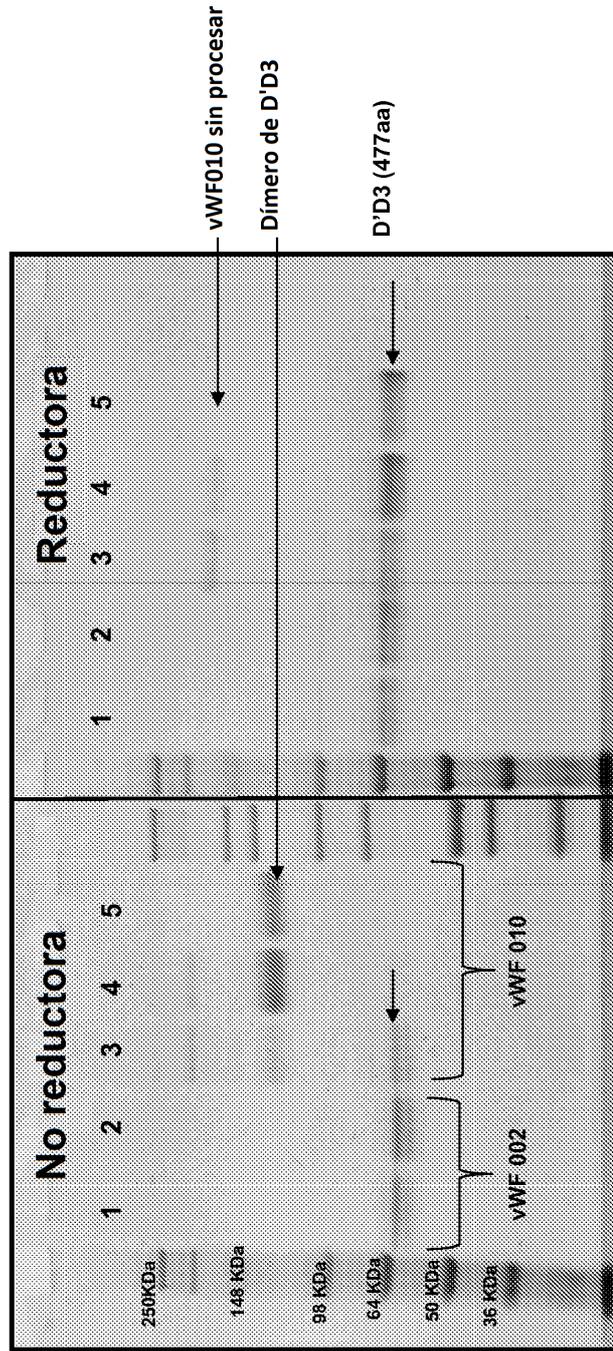


Figura 6: Purificación de VWF 009 (D1D2D'D3_{1-276 aa} x 6 his)



VWF-009 purificado existe como un monómero

Figura 7: vWF purificado 002 y 010 (D'D3₁₋₄₇₇ aa X 6 his)



Doblete de aproximadamente 60 kDa muestra estado de glucosilación diferente

- 1- Fracción de vWF -002 IMAC 1A3
- 2- Fracción de vWF -002 IMAC 1B1
- 3- Fracción de vWF -010 IMAC 1B3
- 4- Fracción de vWF -010 IMAC 2A1
- 5- Fracción de vWF -010 IMAC 2A2

Figura 8: Digestión con trombina de heterodímero FVIII-VWF

Digestión con trombina de proteína FVIII-Fc-VWF

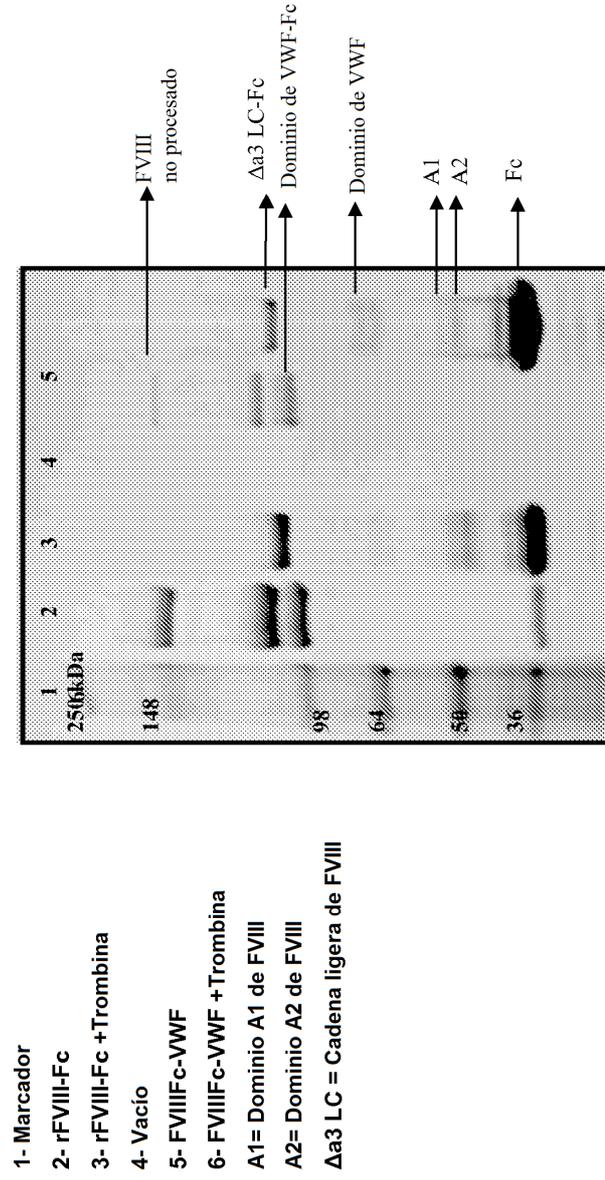


Figura 9: La interacción FVIII-VWF es un factor limitante para la prolongación de la semivida de FVIII

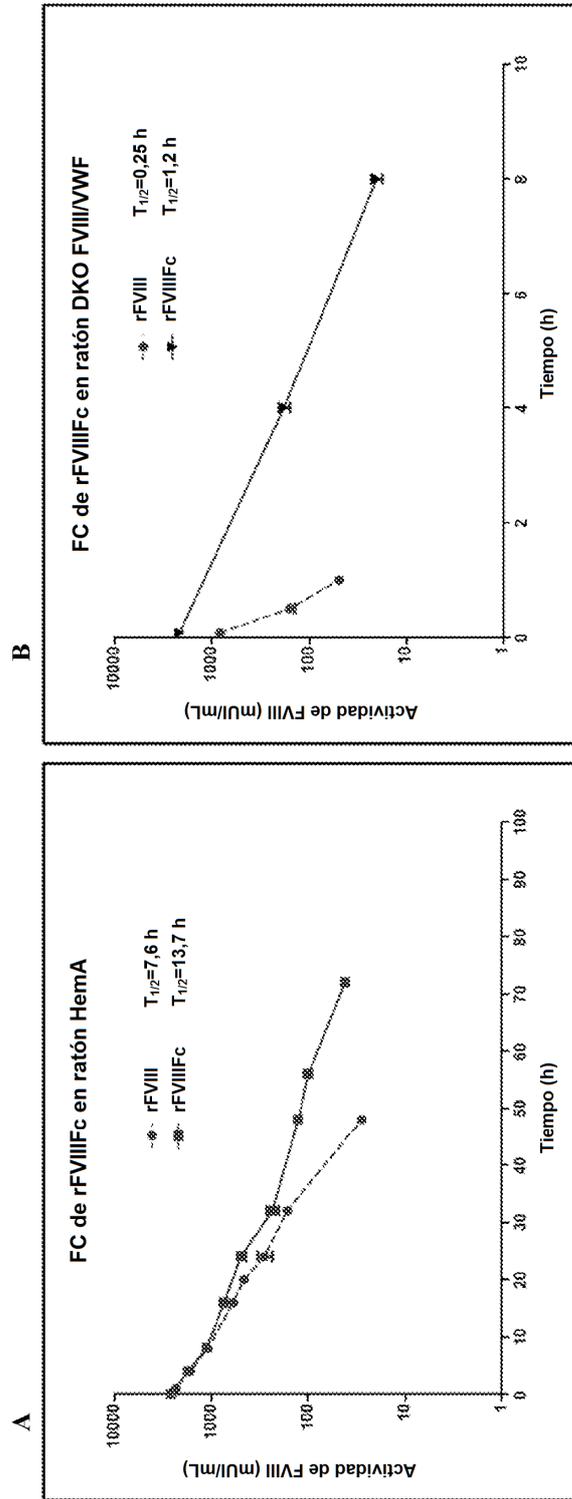


Figura 10A: El dímero D'D3 de longitud completa proporciona la misma protección de FVIII que la molécula de VWF de longitud completa

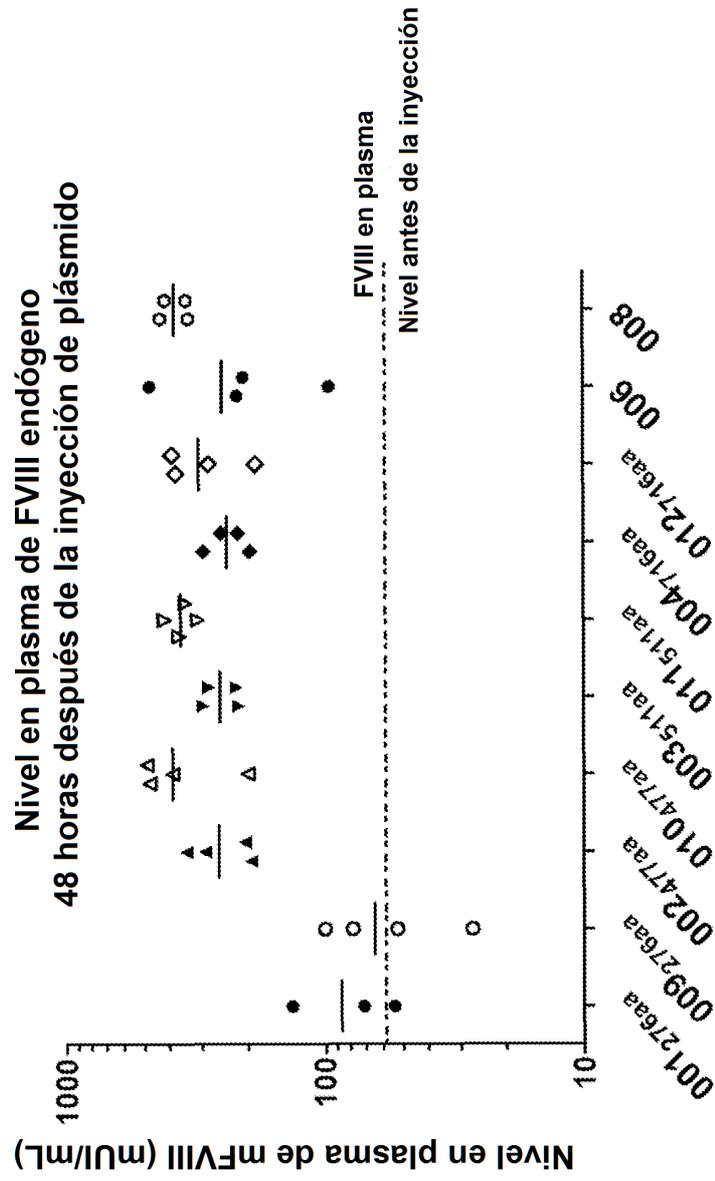


Figura 10B: El dímero D'D3 de longitud completa proporciona la misma protección de FVIII que la molécula de VWF de longitud completa

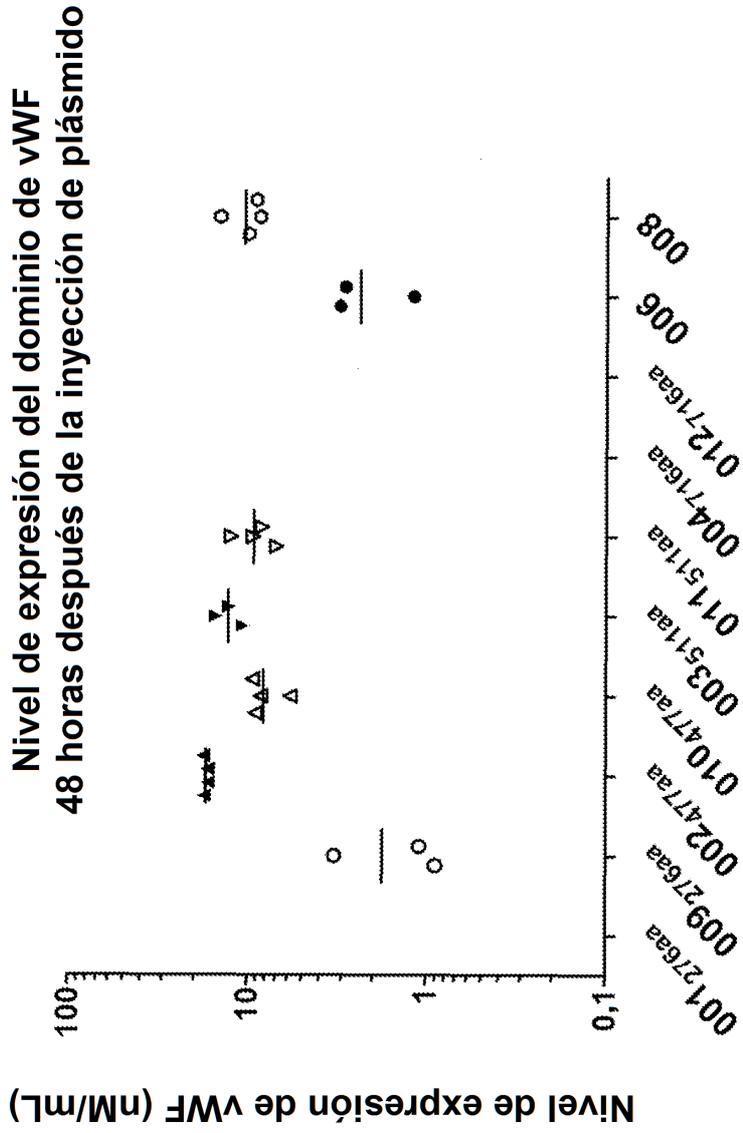


Figura 11: FC de BDD-FVIII en ratones DKO FVIII-VWF con co-inyección de VWF-010 o VWF-002

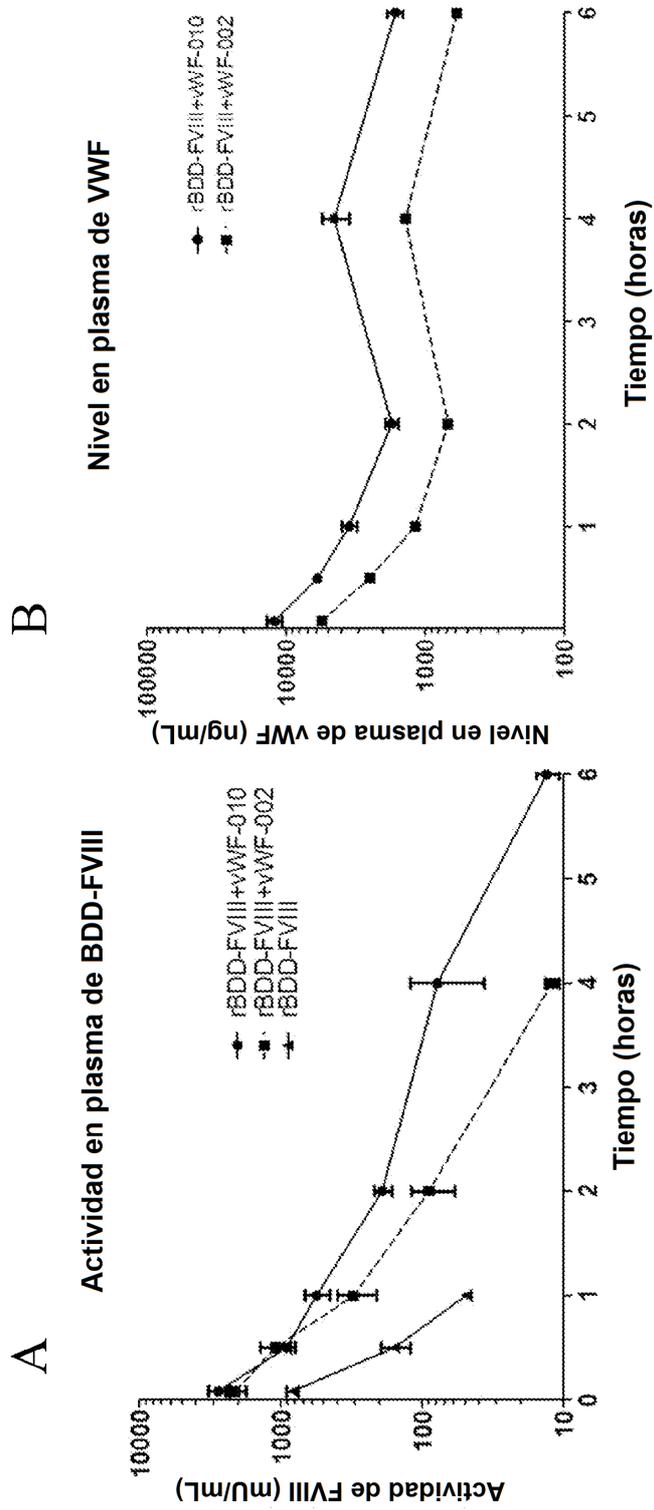
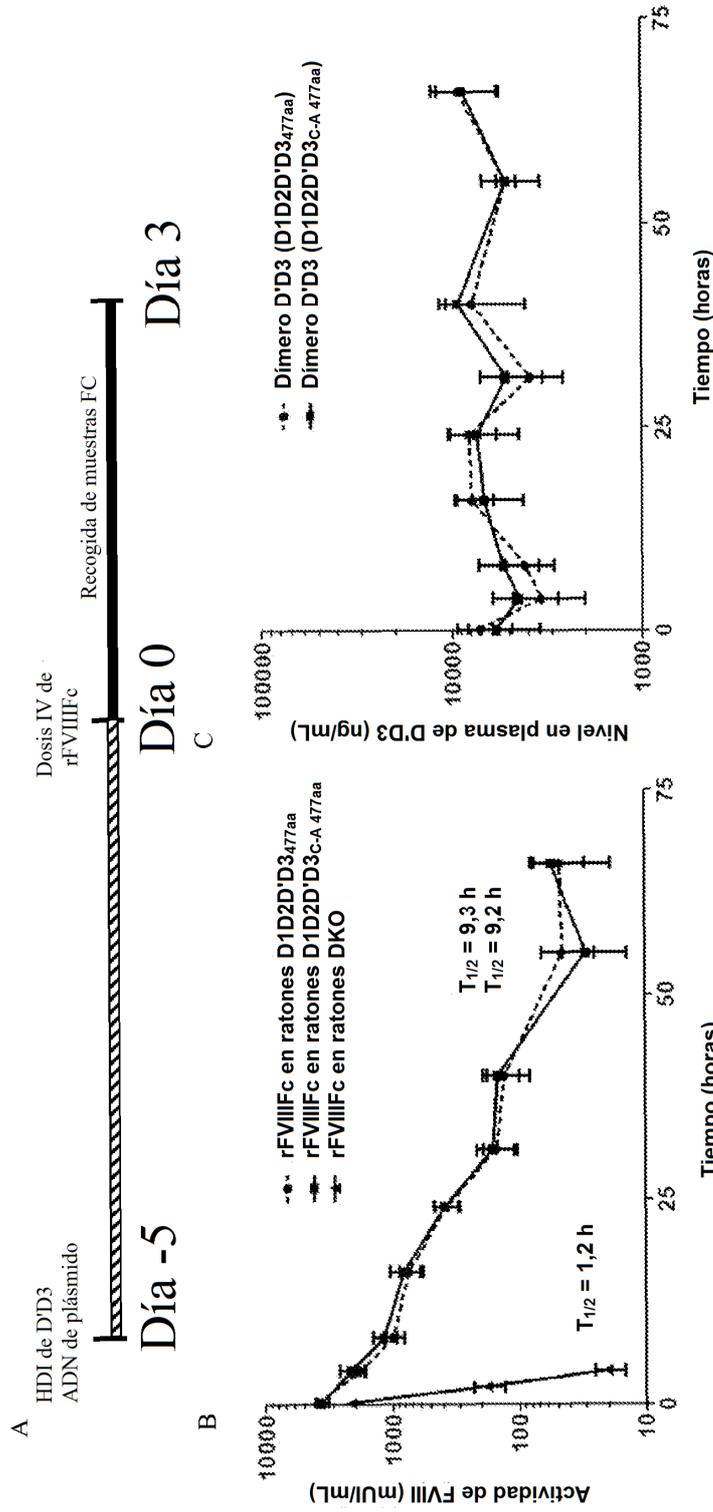


Figura 12: FC de rFVIIIc en ratones que expresan D'D3 de VWF



- El dímero D'D3 y su monómero sintetizados con dominio D1D2 proporcionan la misma protección de FVIII
- Fragmentos de D'D3 de VWF en circulación confieren una prolongación adicional de 8 veces de la semivida de FVIII
- La recuperación de rFVIIIc aumentó desde 40 % hasta 70 %

Figura 13: Selección de D'D3-Conector de Fc por HDI en ratones DKO FVIII/VWF

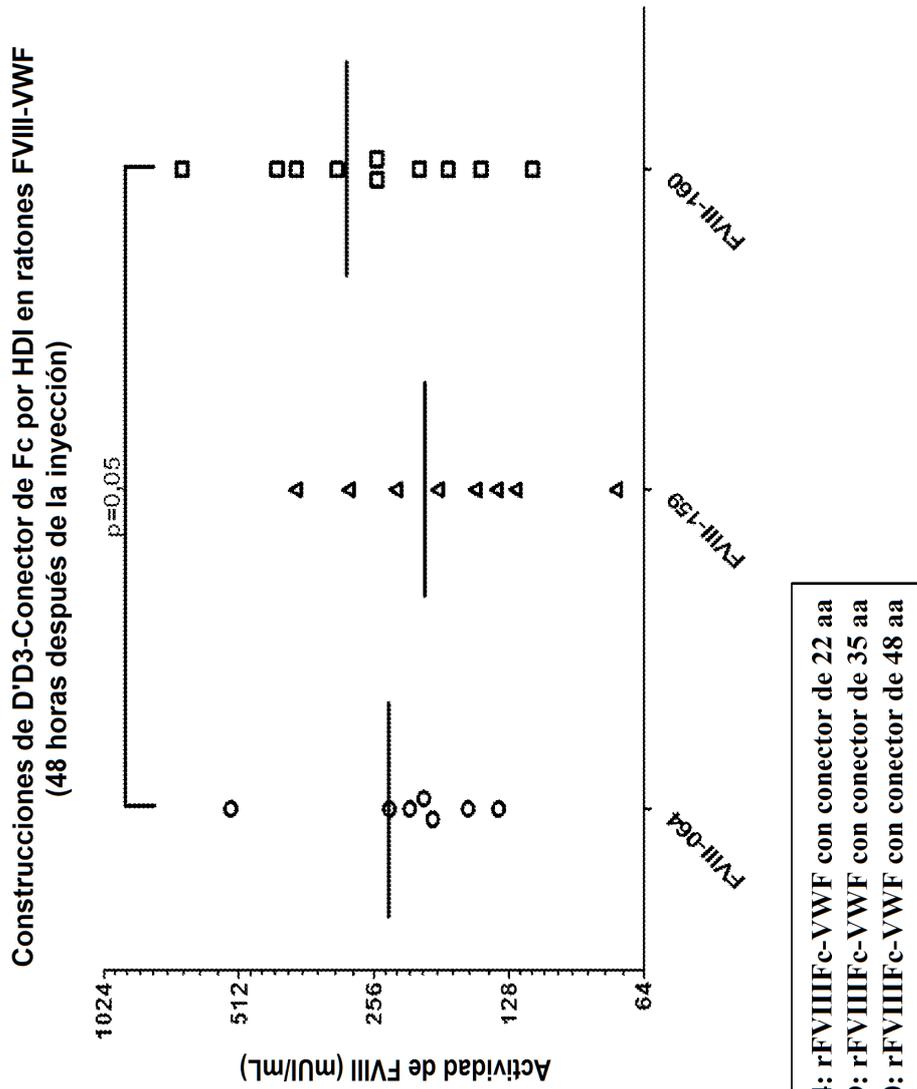


Figura 14: HDI de heterodímero FVIIIIFc/D'D3 de cadena sencilla frente a cadena doble en ratones DKO FVIII/VWF

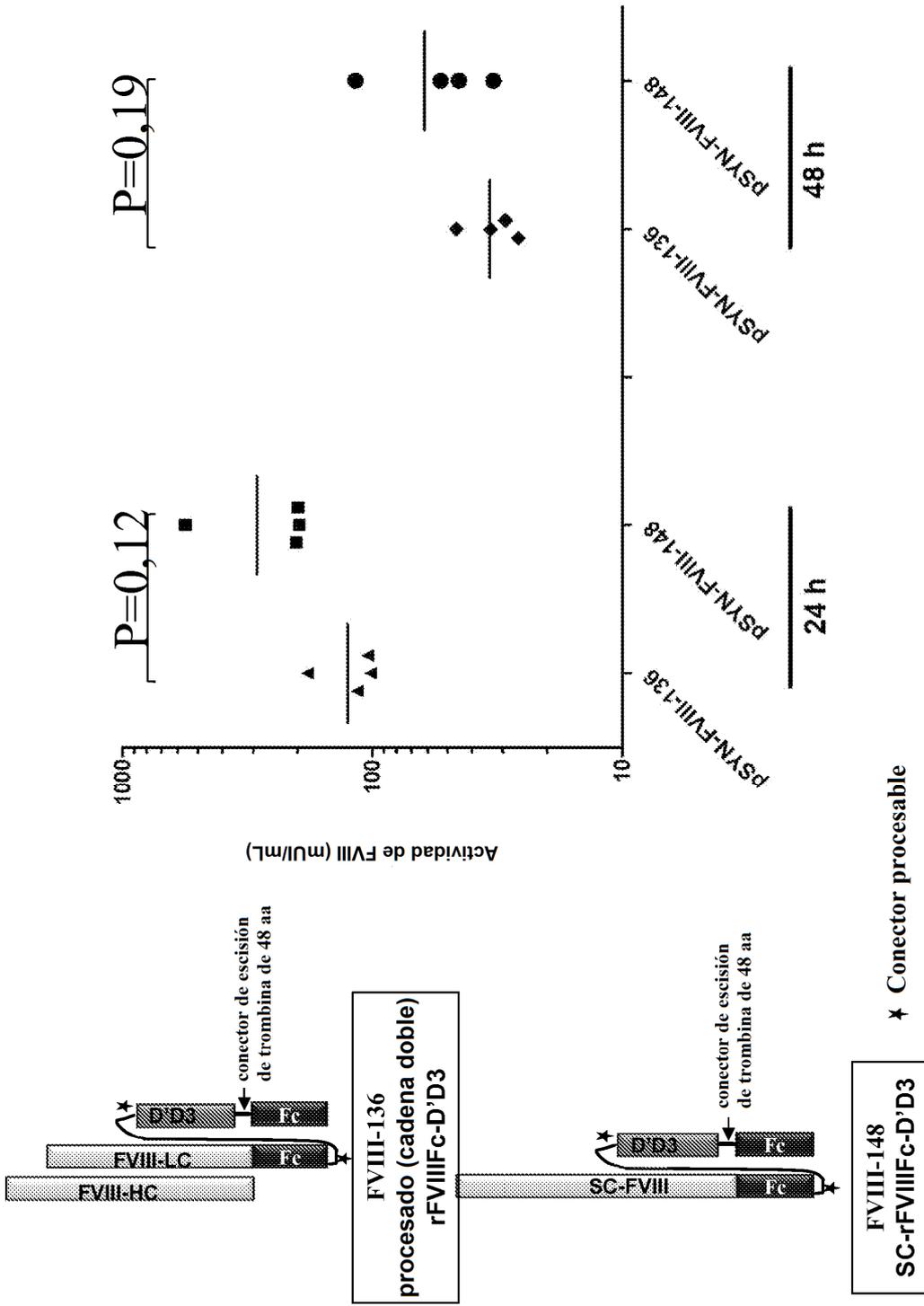


Figura 15: FVIII-155/VWF-031 que se une a VWF inmovilizado por el ensayo Octet

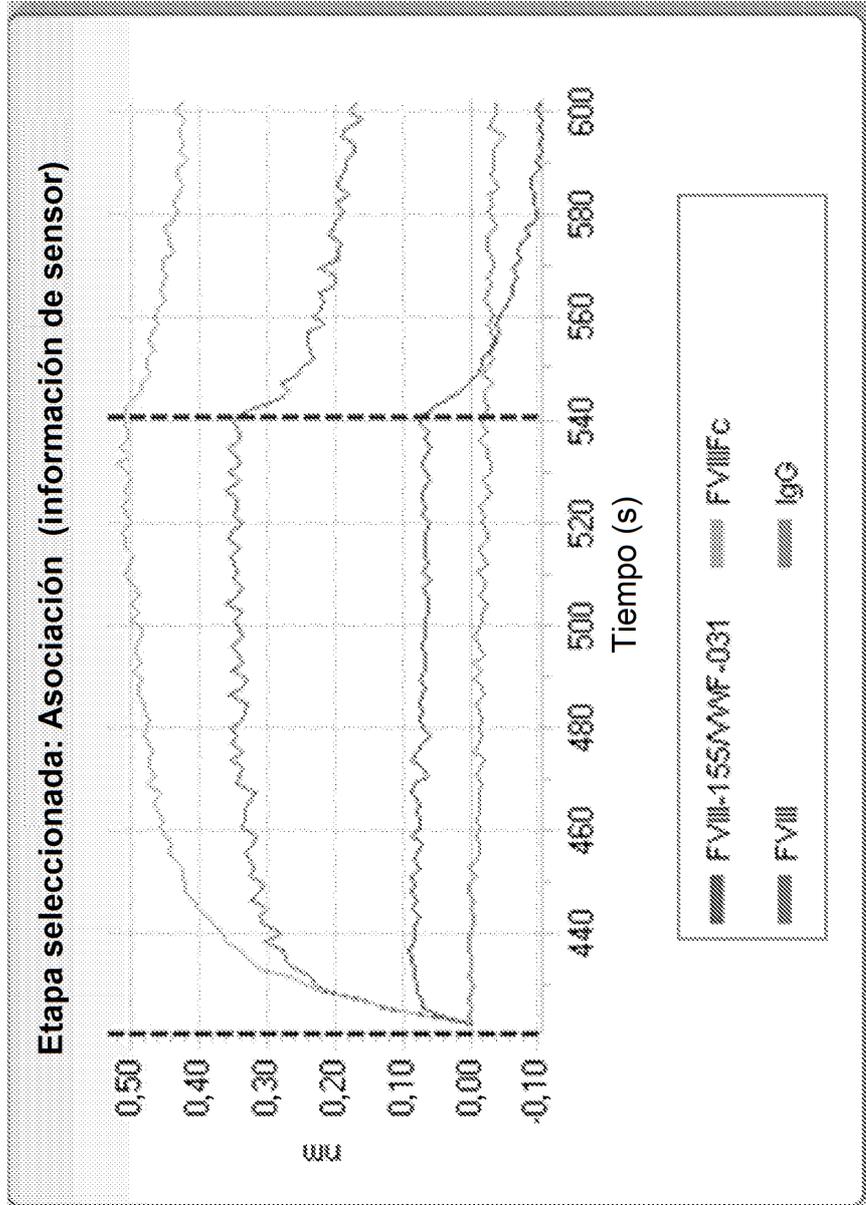


Figura 16: FC de FVIII-155/VWF-031 y FVIIIc en ratones DKO FVIII/VWF

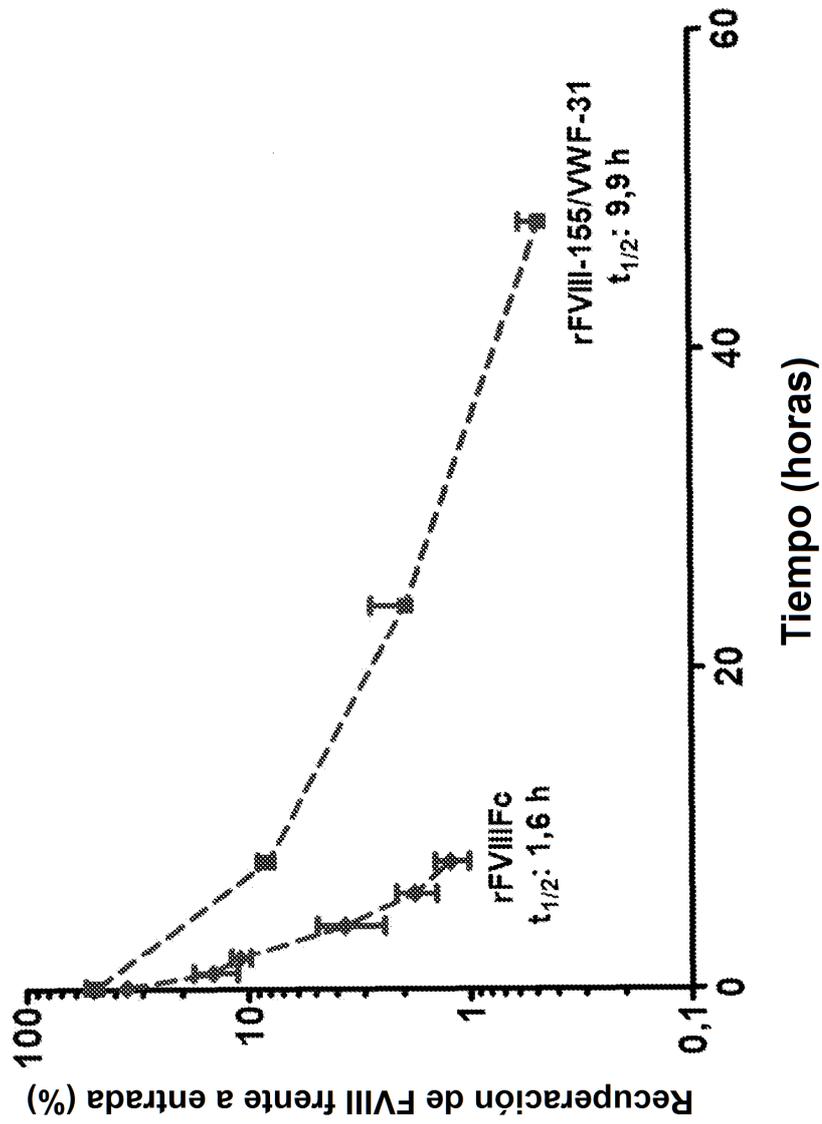
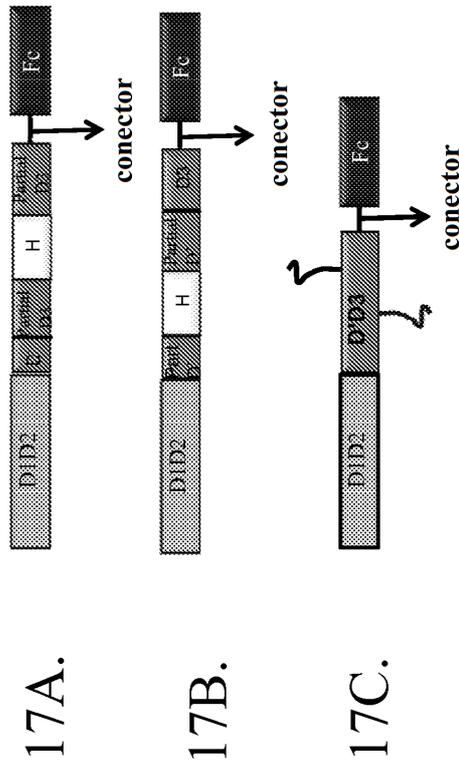


Figura 17: Construcciones de VWF



— Conector de longitud variable
(opcionalmente escindible por
Xla, trombina, Xa, etc.)

H = resto heterólogo

∩ = PEG o HES

Figura 18A: Pérdida de actividad de FVIIIc en tanto plasma de Hema como de DKO por ensayo cromogénico

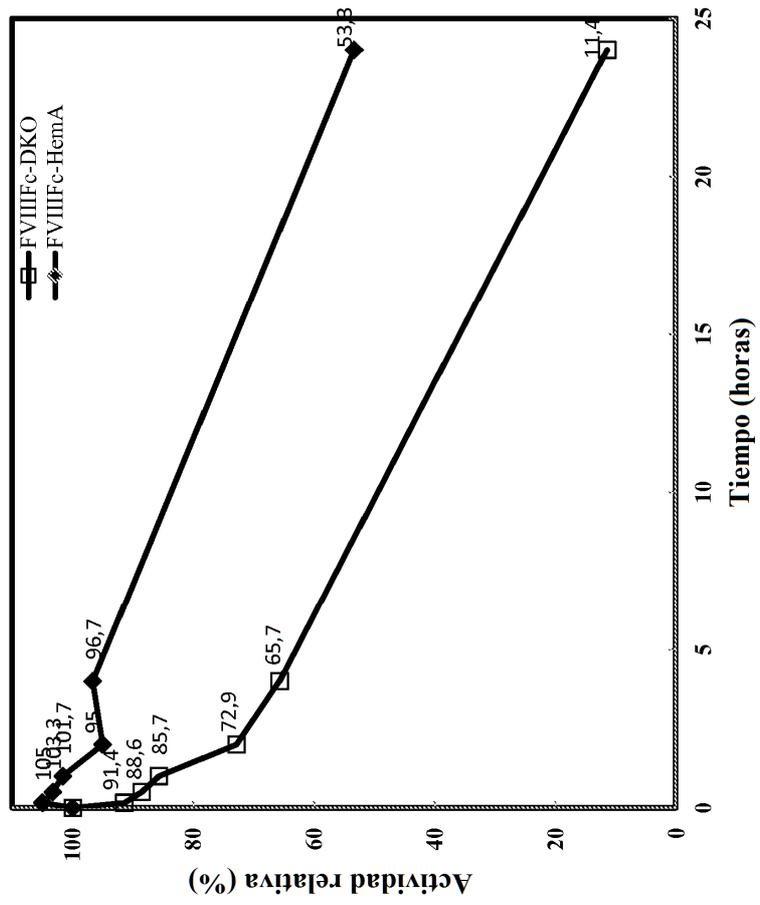
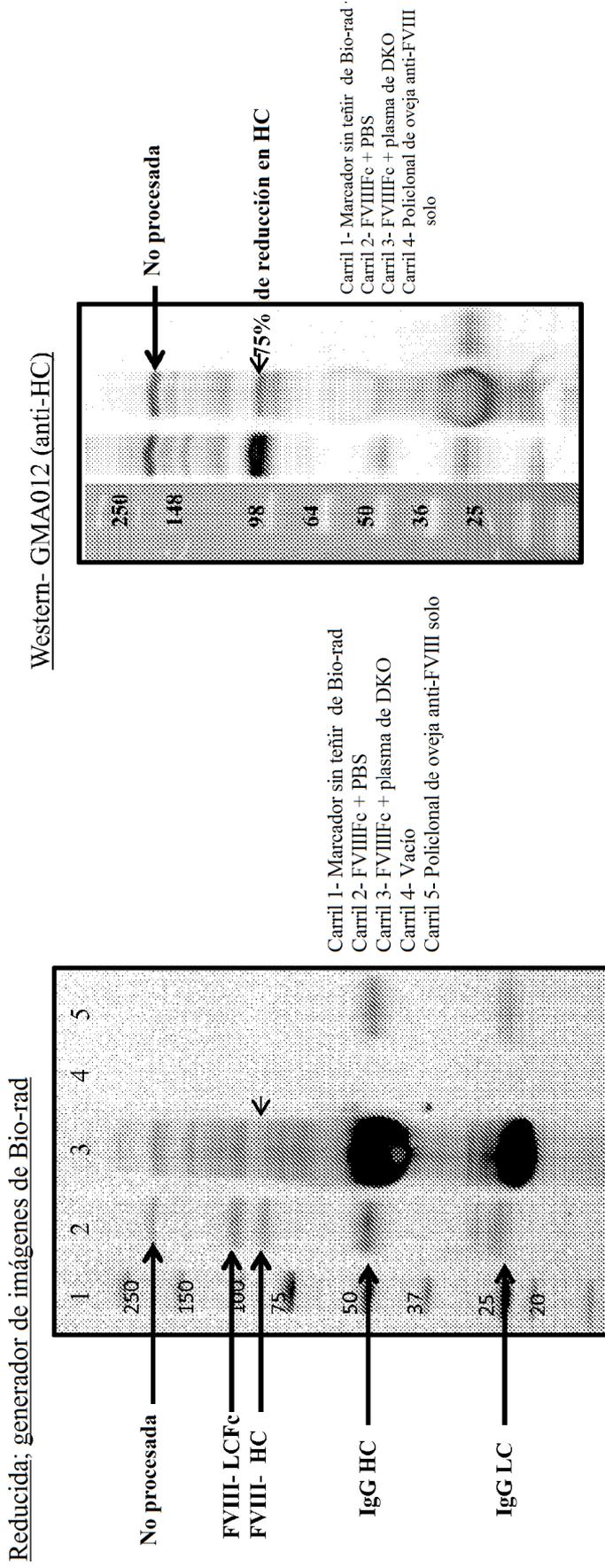


Figura 18B: La pérdida en la actividad de FVIII es debida a la disociación / degradación de la cadena pesada (HC)



Reacción – Se incubaron 5 ug de FVIIIc con o 250 ul de PBS o plasma de DKO de ratón durante 24 h a 37 °C. Se inmunoprecipitó FVIIIc añadiendo 5 ug de policlonal de oveja anti-FVIII (ab61370) durante 1 h a TA y 100 ul de perlas de proteína A. Después de 4x lavados de 1 mL PBS las perlas se resuspendieron en 50 uL 1x tampón reductor de SDS-PAGE. Después de hervir, se cargaron 20 uL sobre 4 – 15 % de gel (es decir, 1 ug de FVIIIc).

Figura 19: Actividad de FVIII Fc por ensayo cromogénico

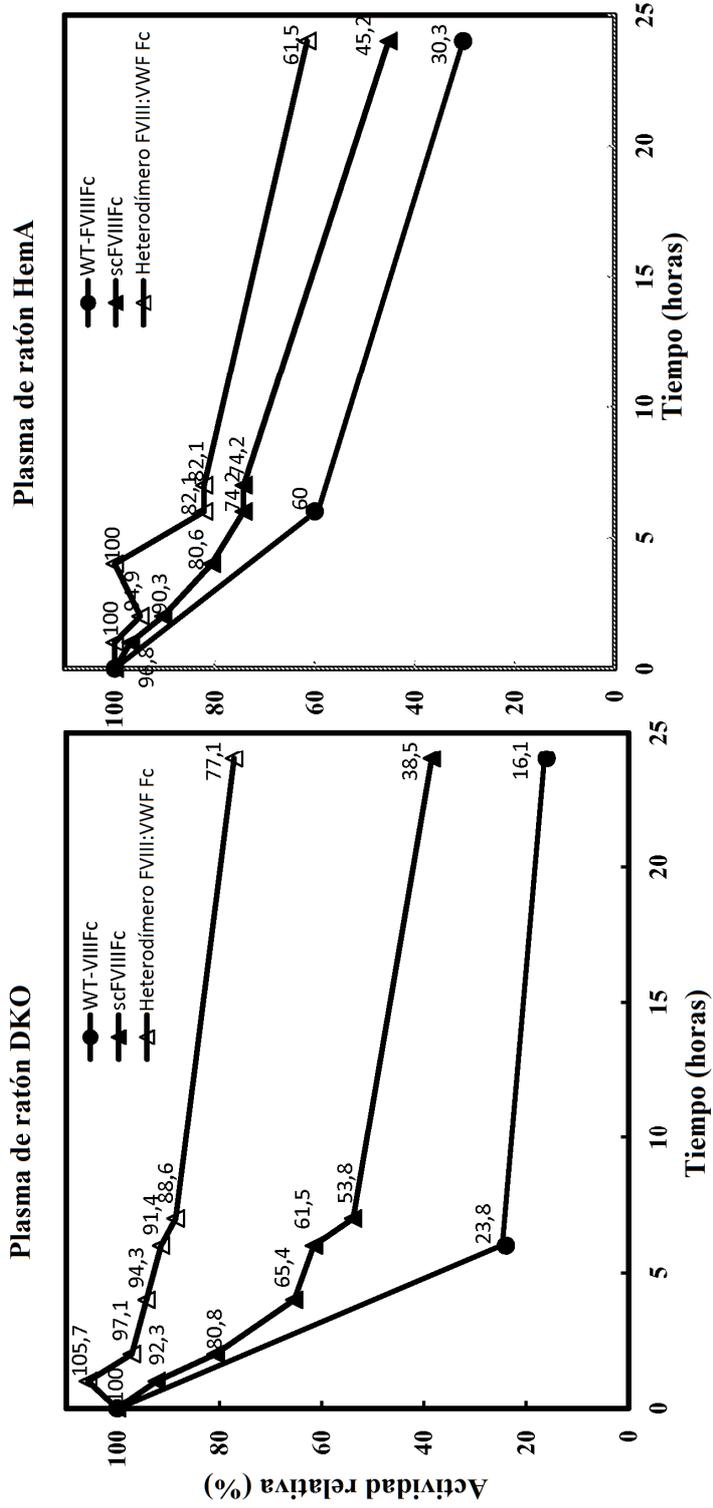


Figura 20: Procesamiento de PC5 frente a PACE de VWF-031(D1D2D'D3Fc)

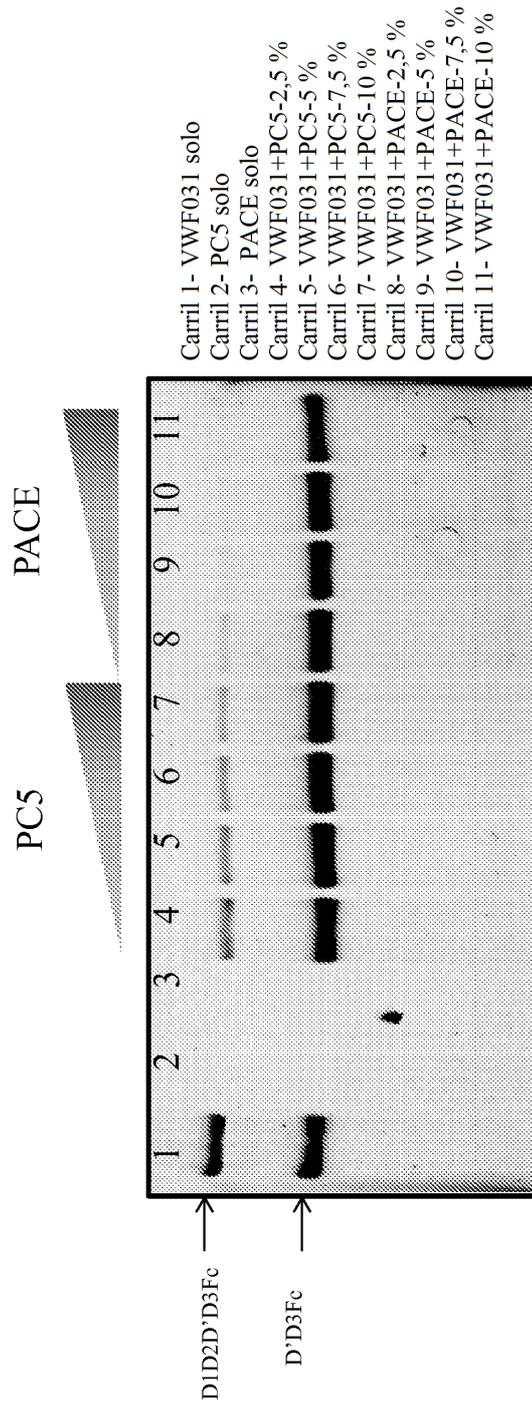


Figura 21A: Sin unión de FVIII-155/VWF-031 a VWF

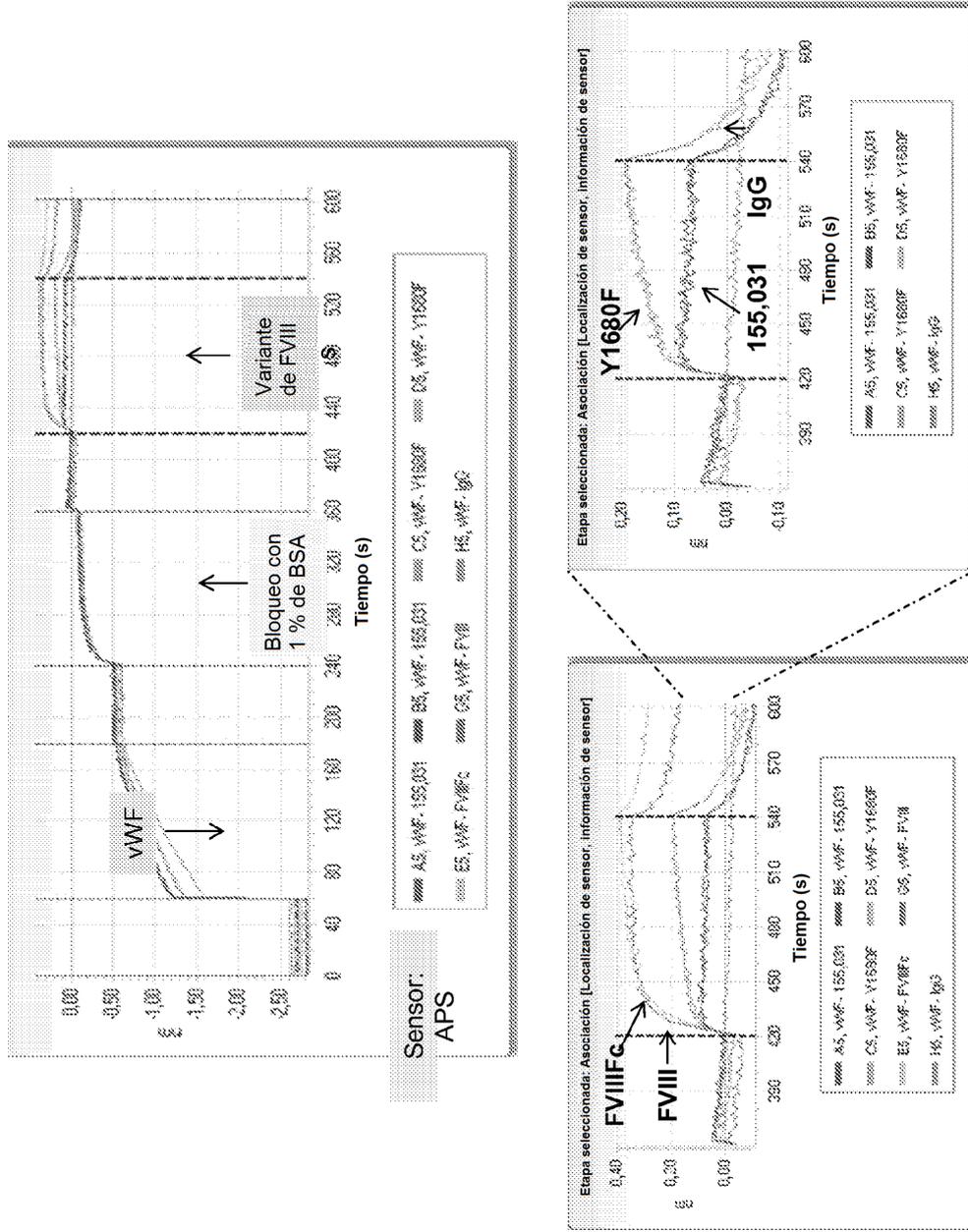
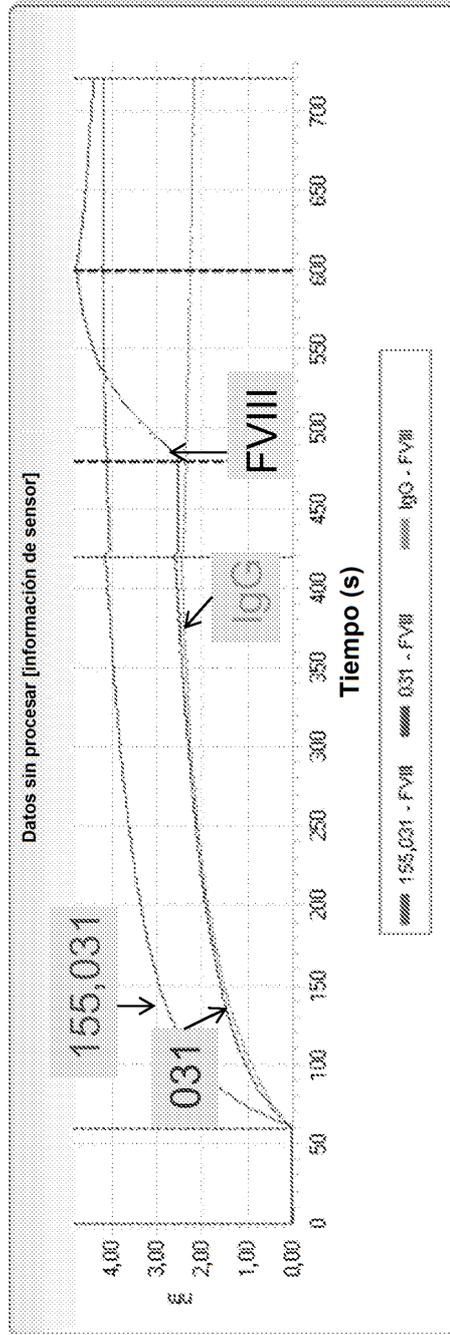


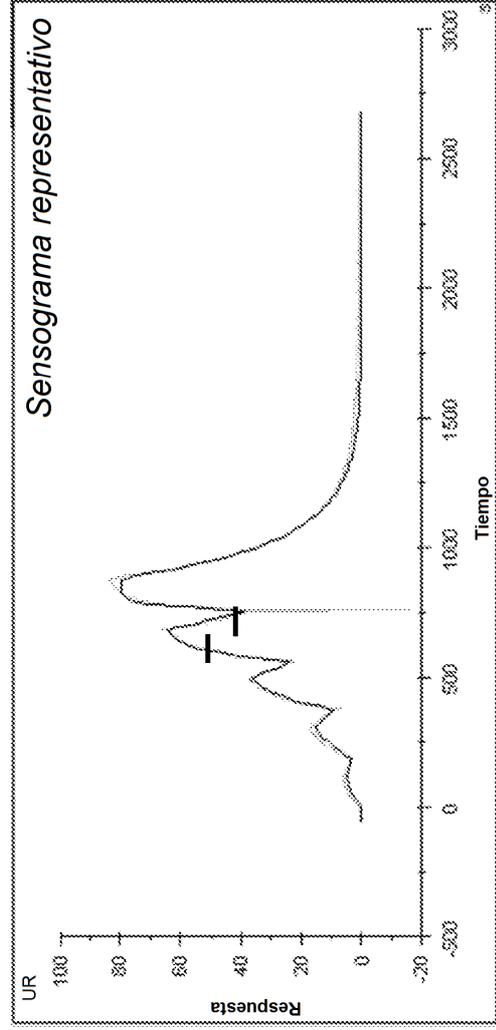
Figura 21 B: FVIII-155/VWF-031 no se une a FVIII



Sensor: Proteína G

Figura 22: Interacción de FVIII con VWF-031

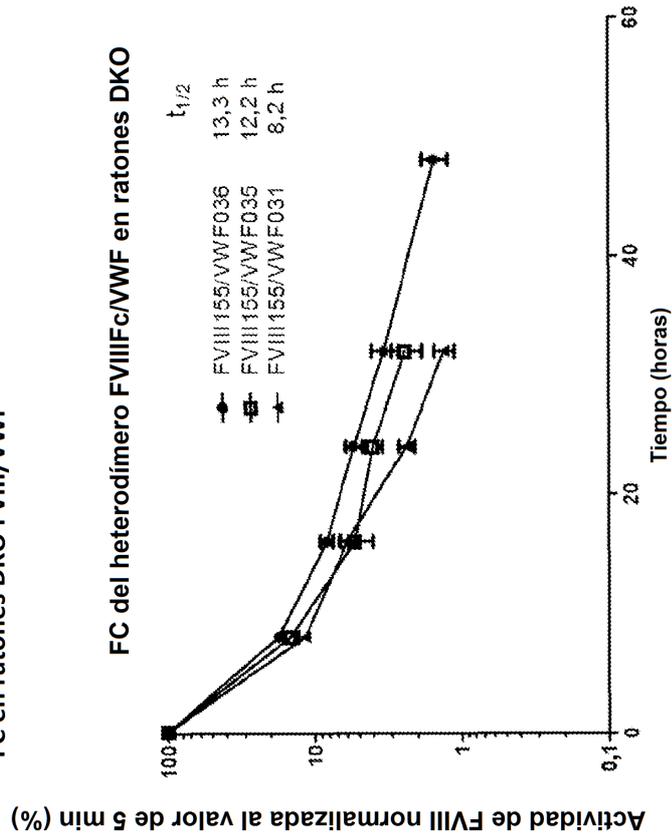
- 1000 UR de IgG de cabra anti-humana inmovilizada
- 100 UR de VWF-031
- FVIII (dominio B delecionado) aplicado en modo de cinética de ciclo único
- Ajuste 1:1; n=4



$$K_D = 10 \pm 1 \text{ nM}$$

(25 veces más débil que FL-VWF como ligando)

Figura 23: Efecto de la diferente longitud de conector del heterodímero FVIIIc/VWF sobre la FC en ratones DKO FVIII/VWF



FVIII-155	Cadena sencilla (SC) - FVIII R1645A/R1648A directamente fusionado con una Fc sencilla
VWF-031	Fragmento D1D2D'D3 (1-477 aa con C336A/C379A) unido a una Fc sencilla con un conector escindible de trombina de 48 aa
VWF-035	Fragmento D1D2D'D3 (1-477 aa con C336A/C379A) unido a una Fc sencilla con un conector escindible de trombina de 73 aa
VWF-036	Fragmento D1D2D'D3 (1-477 aa con C336A/C379A) unido a una Fc sencilla con un conector escindible de trombina de 98 aa

Figura 24: Ejemplo de unión de sortasa

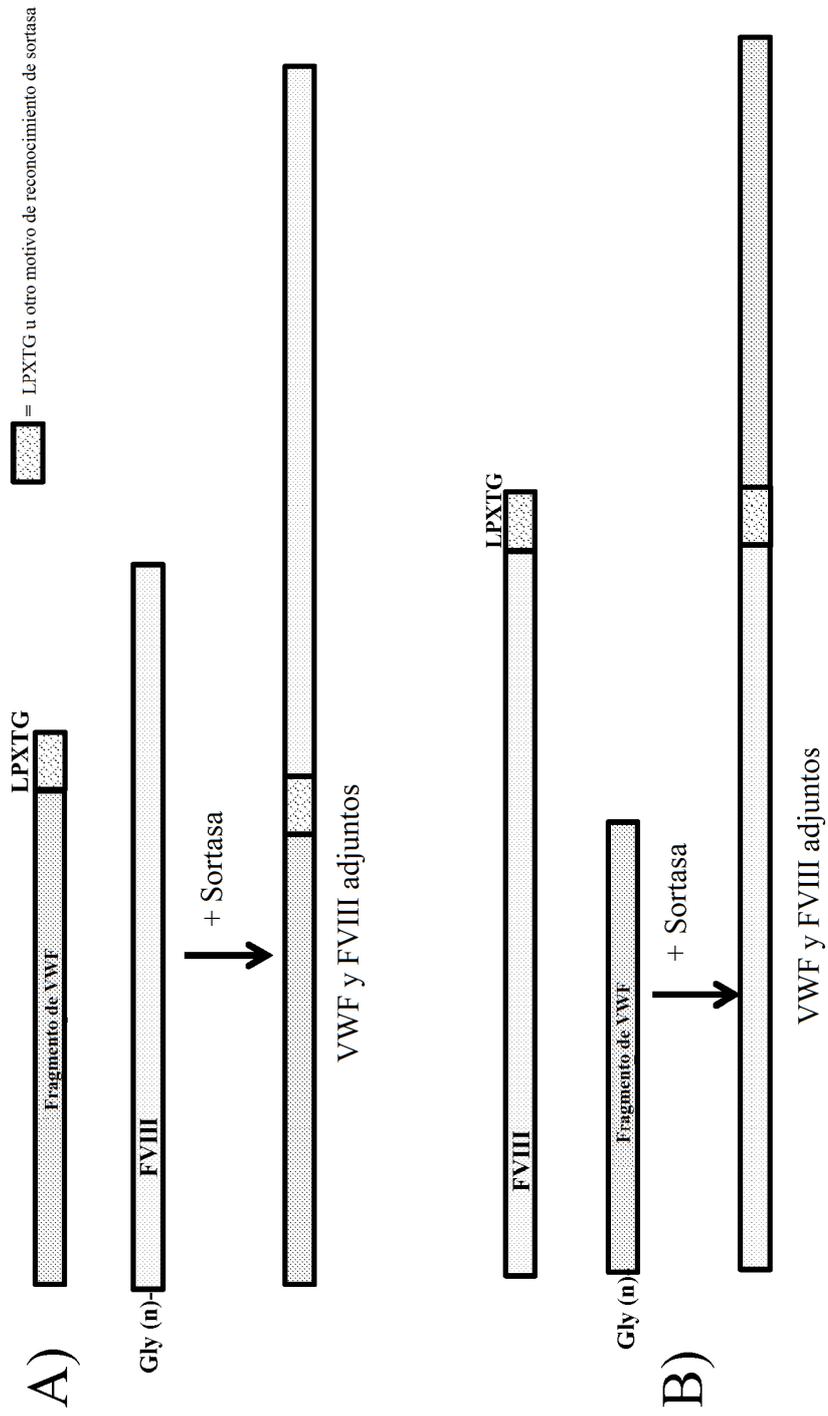


Figura 24: Ejemplo de unión de sortasa

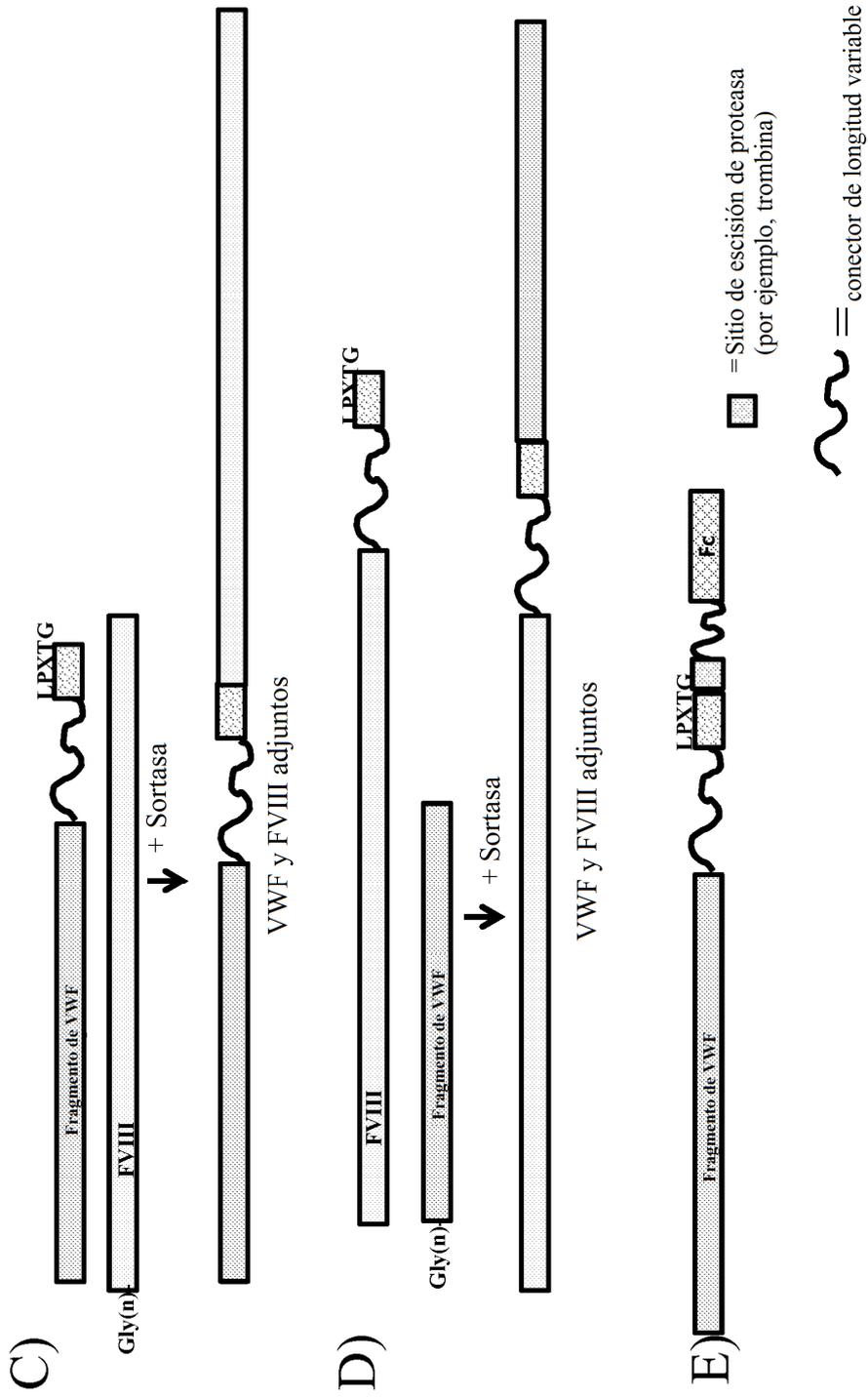
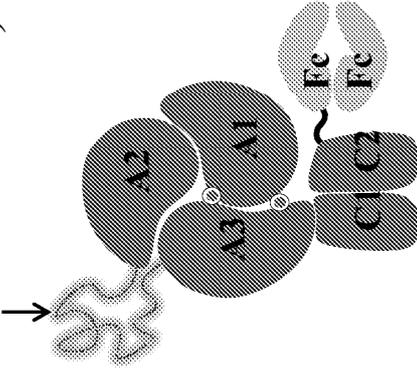


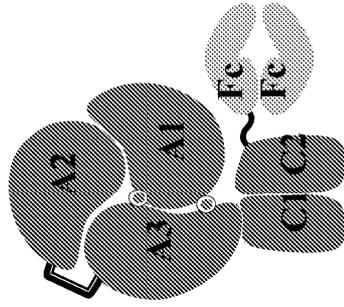
Figura 25: Comparación esquemática de FVIII Fc (FVIII155) de cadena sencilla y FVIII Fc (FVIII198) de cadena sencilla que contiene dominio B parcial

(dominio B-226N6)



FVIII 198:Fc

(FVIII Fc de cadena sencilla con 226N6)



FVIII 155:Fc

(FVIII Fc de cadena sencilla)

Figura 26: El dominio B parcial aumenta la semivida de FVIII198 1,5 veces en comparación con FVIII155

