(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 935 489**

(51) Int. CI.:

C07K 14/755 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2012 E 19165518 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2022 EP 3564260**

(54) Título: **Composiciones de factor VIII y métodos de preparación y uso de las mismas**

(30) Prioridad:

15.02.2012 US 201261599400 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2023

(73) Titular/es:

BIOVERATIV THERAPEUTICS INC. (100.0%)
225 Second Avenue
Waltham MA 02451, US

(72) Inventor/es:

SCHELLENBERGER, VOLKER;
CHANG, PEI-YUN;
VARFAJ, FATBARDHA;
DING, SHENG;
SILVERMAN, JOSHUA;
WANG, CHIA-WEI;
SPINK, BENJAMIN;
STEMMER, WILLEM, P.;
GEETHING, NATHAN;
KULMAN, JOHN;
LIU, TONGYAO;
TOBY, GARABET, G.;
JIANG, HAIYAN;
PETERS,ROBERT;
WANG, DEPING y
MEI, BAISONG

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de factor VIII y métodos de preparación y uso de las mismas

Antecedentes de la invención

El factor VIII es un componente importante de la vía intrínseca de la cascada de coagulación sanguínea. En la circulación, el factor VIII forma complejos principalmente con el factor de Von Willebrand. Tras la activación mediante trombina (factor IIa) se disocia del complejo para interactuar con el factor IXa en la cascada de coagulación intrínseca que, a su vez, activa el factor X. Una vez retirado del complejo con el factor de Von Willebrand, el factor VIII activado se inactiva proteolíticamente mediante proteína C activada (APC), factor Xa, y factor IXa, y se elimina rápidamente del torrente sanguíneo. Cuando está en complejo con proteína de factor de Von Willebrand normal, la semivida del factor VIII es de aproximadamente 12 horas, mientras que en ausencia de factor de Von Willebrand la semivida del factor VIII se reduce a 2 horas (Tuddenham EG, *et al*., Br J Haematol. (1982) 52(2):259-267).

En hemofilia, la coagulación de la sangre se altera por una ausencia de determinados factores plasmáticos de coagulación sanguínea. La hemofilia A es una deficiencia del factor VIII, y es un trastorno del cromosoma X ligado al sexo recesivo que representa un 80 % de los casos de hemofilia. El tratamiento de referencia para el tratamiento de la hemofilia A es el tratamiento de remplazo con concentrados de factor VIII recombinante. Los sujetos con hemofilia A grave tienen niveles en circulación de factor VIII procoagulante por debajo de un 1-2 % del normal, y en general están en tratamiento profiláctico con el objetivo de mantener el factor VIII por encima de un 1 % entre dosis, lo que puede conseguirse habitualmente administrando el factor VIII de dos a tres veces a la semana. Las personas con hemofilia moderadamente grave (niveles de factor VIII de un 2-5 % del normal) constituyen un 25-30 % de las incidencias de hemofilia y manifiestan hemorragia después de traumatismo mínimo. Las personas con hemofilia A leve (niveles de factor VIII de un 5-40 % del normal) comprenden un 15-20 % de todas las incidencias de hemofilia, y desarrollan hemorragia únicamente después de traumatismo importante o cirugía.

La actividad *in vivo* del factor VIII aportado de forma exógena está limitada tanto por una corta semivida de la proteína como por inhibidores que se unen al factor VIII y disminuyen o destruyen la función hemostática.

Hasta un 30 % de los pacientes con hemofilia A que reciben factor VIII aportado de forma exógena montan una respuesta inmunitaria de IgG contra el factor VIII (Towfighi, F., *et al*. Comparative measurement of anti-factor VIII antibody by Bethesda assay and ELISA reveals restricted isotype profile and epitope specificity. Acta Haematol (2005) 114:84-90), lo que puede provocar la inhibición completa de su actividad procoagulante y/o promover una eliminación más rápida del factor VIII (Briët E *et al*. High titer inhibitors in severe haemophilia A. A meta-analysis based on eight long-term follow-up studies concerning inhibitors associated with crude or intermediate purity factor VIII products. Throm. Haemost. (1994) 72: 162-164). Los anticuerpos IgG, llamados inhibidores de FVIII, están dirigidos principalmente a los dominios A2, A3 y C2 (Scandella D *et al*. Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization. Blood (1989) 74:1618-1626), pero pueden generarse contra los dominios A1, B y C1 también. Por tanto, las opciones de tratamiento para pacientes con inhibidores de FVIII son limitadas.

Proteínas grandes tales como el factor VIII normalmente se administran por vía intravenosa de modo que el medicamente esté disponible directamente en el torrente sanguíneo. Se ha demostrado previamente que un factor VIII no modificado inyectado por vía intramuscular producía un nivel en circulación máximo de únicamente un 1,4 % del nivel plasmático normal (Pool *et al*, Ineffectiveness of Intramuscularly Injected Factor VIII Concentrate in Two Hemophilic Patients. New England J. Medicine (1966) 275(10):547-548). Formulaciones que pudieran administrarse de manera distinta a vía intravenosa simplificarían enormemente su uso, aumentarían la seguridad y provocarían ahorros económicos sustanciales.

Modificaciones químicas en una proteína terapéutica pueden modificar su tasa de eliminación *in vivo* y la posterior semivida en suero. Un ejemplo de una modificación común es la adición de un resto de polietilenglicol (PEG), típicamente acoplado a la proteína mediante un grupo aldehído o N-hidroxisuccinimida (NHS) en el PEG que reacciona con un grupo amina (por ejemplo, cadena lateral de lisina o el extremo N). Sin embargo, la etapa de conjugación puede provocar la formación de mezclas de productos heterogéneos que requieren extracción, purificación y/u otros procesos adicionales, que afectan todos ellos inevitablemente al rendimiento de producto y el control de calidad. Además, la función farmacológica de los factores de coagulación puede verse impedida si las cadenas laterales de los aminoácidos en las cercanías de su sitio de unión llegan a modificarse por el proceso de PEGilación. Otras estrategias incluyen la fusión genética de un dominio Fc a la proteína terapéutica, lo que aumenta el tamaño de la proteína terapéutica, reduciendo por tanto la tasa de eliminación a través del riñón. En algunos casos, el dominio Fc confiere la capacidad de unirse a y reciclarse desde lisosomas mediante el receptor FcRn, que provoca una semivida farmacocinética aumentada. Desafortunadamente, el dominio Fc no se pliega de forma eficaz durante la expresión recombinante y tiende a formar precipitados insolubles conocidos como cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión deben solubilizarse y la proteína funcional debe renaturalizarse a partir de su agregado mal plegado, lo que es un proceso muy lento, ineficaz y caro.

La publicación internacional WO 2008/077616 se refiere a factores de coagulación modificados con semivida *in vivo* prolongada. La publicación internacional WO 2009/156137 divulga secuencias de ácidos nucleicos modificadas que codifican el factor de coagulación VIII (FVIII) y el factor de Willebrand (VWF), así como complejos de las mismas, indicándose que poseen actividades biológicas junto con semivida prolongada *in vivo* y/o recuperación mejorada *in vivo* en comparación con la proteína de tipo silvestre no modificada. La publicación internacional WO 2011/069164 divulga la administración de polipéptidos quiméricos con semivida aumentada que comprenden una porción de FVIII y una segunda porción tal como una porción FC. La publicación internacional WO 2012/006623 divulga un procedimiento para disminuir la cantidad de FVIII no procesado en un medio de cultivo utilizando una proproteína convertasa. El documento US 2014/147436 se refiere a una región Fc variante con funciones efectoras alteradas como consecuencia de una o más modificaciones de aminoácidos.

Compendio de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y se basa en las enseñanzas generales que incluyen los diversos aspectos que se describen a continuación.

Antecedentes técnicos

La presente enseñanza se refiere a composiciones de proteína de fusión del factor VIII de coagulación novedosas y los usos de las mismas. Específicamente, las composiciones proporcionadas en la presente memoria se usan particularmente para el tratamiento o la mejora de una afección asociada con hemofilia A, deficiencias de factor VIII, trastornos hemorrágicos y coagulopatías. En un aspecto, la presente enseñanza proporciona composiciones de proteínas de fusión aisladas que comprenden un factor VIII (FVIII) y uno o más polipéptidos recombinantes prolongados (XTEN) en las que la proteína de fusión muestra actividad procoagulante. Un XTEN en cuestión para construir dichas proteínas de fusión es típicamente un polipéptido con una secuencia no repetitiva y conformación no estructurada. En un aspecto, se une uno o más XTEN a un factor de coagulación FVIII ("CF") seleccionado de factor VIII humano nativo, secuencias de factor VIII con el dominio B eliminado ("FVIII BDD") y variantes de secuencia de los mismos (todos los anteriores colectivamente "FVIII" o "CF"), lo que produce una proteína de fusión de factor VIII recombinante-XTEN ("CFXTEN"). El componente polipeptídico de factor VIII de la CFXTEN comprende un dominio A1, un dominio A2, un dominio C1, un dominio C2 y opcionalmente un dominio B o una parte del mismo. En algunos aspectos el FVIII se caracteriza además por la delimitación de los dominios mencionados anteriormente para que comprendan un espaciador ácido a1, a2 y a3. En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión y los usos de las mismas en métodos y pautas para tratar afecciones relacionadas con el factor VIII. Las composiciones de CFXTEN tienen propiedades farmacocinéticas y farmacológicas potenciadas con FVIII no unido a XTEN, lo que puede permitir una dosificación más conveniente y una eficacia mejorada.

La enseñanza se refiere a proteínas de fusión de factor VIII recombinante que comprenden un polipéptido de factor VIII y uno o más polipéptidos recombinantes prolongados (XTEN) unidos al factor VIII. En algunos aspectos, la enseñanza proporciona proteínas de fusión de fator VIII recombinante que comprenden un polipéptido de factor VIII y al menos un polipéptido recombinante prolongado (XTEN), en las que dicho polipéptido de factor VIII comprende un dominio A1 que incluye una región espaciadora ácida a1, un dominio A2 que incluye una región espaciadora ácida a2, una domino A3 que incluye una región espaciadora ácida a3, dominio C1, dominio C2 y opcionalmente la totalidad o una parte de dominio B, y en las que dicho al menos un XTEN está unido a dicho polipéptido de factor VIII en (i) el extremo C de dicho polipéptido de factor VIII; (ii) dentro del dominio B de dicho polipéptido de factor VIII si la totalidad o una parte del dominio B está presente; (iii) dentro del dominio A1 de dicho polipéptido de factor VIII; (iv) dentro del dominio A2 de dicho polipéptido de factor VIII; (v) dentro del dominio A3 de dicho polipéptido de factor VIII; (vi) dentro del dominio C1 de dicho polipéptido de factor VIII; (vii) dentro del dominio C2 de dicho polipéptido de factor VIII; (viii) en el extremo N de dicho polipéptido de factor VIII o (ix) entre dos dominios de dicho polipéptido de factor VIII, en las que la proteína de fusión retiene al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 100 %, un 200 %, un 300 %, un 400 % o un 500 % de la actividad procoagulante, cuando se mide por un ensayo de coagulación *in vitro,* en comparación con un factor VIII correspondiente no unido a XTEN. En un aspecto, en la proteína de fusión de factor VIII recombinante anterior el al menos un XTEN está unido a dicho polipéptido de factor VIII en un sitio en o dentro de 1 a 6 aminoácidos de un sitio seleccionado de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9. En otros aspectos, la enseñanza proporciona proteínas de fusión de factor VIII recombinante que comprenden un polipéptido de factor VIII y al menos un primer polipéptido recombinante prolongado (XTEN), en las que dicho polipéptido de factor VIII comprende un dominio A1 que incluye una región espaciadora ácida a1, un dominio A2 que incluye una región espaciadora ácida a2, un domino A3 que incluye una región espaciadora ácida a3, un dominio C1, un dominio C2 y opcionalmente la totalidad o una parte de un dominio B, y en las que dicho XTEN está unido a dicho polipéptido de factor VIII en (i) el extremo C de dicho polipéptido de fator VIII; (ii) dentro del dominio B de dicho polipéptido de factor VIII si la totalidad o una parte del dominio B está presente; (iii) dentro del dominio A1 de dicho polipéptido de factor VIII; (iv) dentro del dominio A2 de dicho polipéptido de factor VIII; (v) dentro del dominio A3 de dicho polipéptido de factor VIII; (vi) dentro del dominio C1 de dicho polipéptido de factor VIII; o (vii) dentro del dominio C2 de dicho polipéptido de factor VIII; y en comparación con una proteína de factor VIII

correspondiente no unida a XTEN, la proteína de fusión (a) retine al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 100 %, un 200 %, un 300 %, un 400 % o un 500 % de la actividad procoagulante en un ensayo de coagulación *in vitro*, descrito en la presente memoria u otro de dichos ensayos conocidos en la técnica, y/o (b) muestra unión reducida a un anticuerpo antifactor VIII en un ensayo de unión *in vitro* descrito en la presente memoria u otro de dichos ensayos conocidos en la técnica. En un aspecto, en la proteína de fusión de factor VIII recombinante anterior el al menos un XTEN está unido a dicho polipéptido de factor VIII en un sitio en o dentro de 1 a 6 aminoácidos de un sitio seleccionado de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9. En otros aspectos, la enseñanza proporciona proteínas de fusión de factor VIII recombinante que comprenden un polipéptido de factor VIII y al menos un primer polipéptido recombinante prolongado (XTEN), en las que dicho polipéptido de factor VIII comprende un dominio A1 que incluye una región espaciadora ácida a1, un dominio A2 que incluye una región espaciadora ácida a2, un domino A3 que incluye una región espaciadora ácida a3, un dominio C1, un dominio C2 y opcionalmente la totalidad o una parte de un dominio B, y en las que dicho primer XTEN está unido a dicho polipéptido de factor VIII en un sitio de inserción seleccionado de la tabla 6 y tabla 7 y en las que la proteína de fusión retiene al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 100 %, un 200 %, un 300 %, un 400 % o un 500 % de la actividad procoagulante, cuando se mide por un ensayo de coagulación *in vitro* descrito en la presente memoria u otro de dichos ensayos conocidos en la técnica, en comparación con una proteína de factor VIII correspondiente no unida a XTEN. Ejemplos no limitantes de la proteína de factor VIII no unida a XTEN incluyen FVIII nativo, BDD FVIII, pBC100 y secuencias de la tabla 1. En otro aspecto de la proteína de fusión de factor VIII recombinante, el polipéptido de factor VIII tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 % o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 % a aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de la tabla 1, la secuencia representada en la FIG. 3 y la secuencia representada en la FIG. 4, cuando se alinean de forma óptima. En otro aspecto más, la proteína de fusión comprende al menos otro XTEN unido a dicho polipéptido de factor VIII en el extremo C de dicho polipéptido de factor VIII o dentro de u opcionalmente remplazando el dominio B de dicho polipéptido de factor VIII. En un aspecto específico, la proteína de fusión comprende al menos una secuencia de XTEN ubicada dentro de u opcionalmente remplazando el dominio B de dicho polipéptido de factor VIII. En otro aspecto específico, la proteína de fusión comprende al menos una secuencia de XTEN unida a dicho polipéptido de factor VIII en el extremo C de dicho polipéptido de factor VIII. En un aspecto, la proteína de fusión de factor VIII recombinante comprende una variante con el dominio B eliminado de factor VIII humano, en la que la eliminación del dominio B empieza desde una primera posición en aproximadamente el residuo aminoacídico n.º 741 a aproximadamente 750 y finalizando en una segunda posición en el residuo aminoacídico n.º 1635 a aproximadamente 1648 con referencia a la secuencia de factor VIII humano de longitud completa como se expone en la FIG. 3. En otro aspecto, la proteína de fusión de factor VIII recombinante comprende una primera secuencia de XTEN unida a dicho polipéptido de factor VIII en el extremo C de dicho polipéptido de factor VIII, y al menos un segundo XTEN dentro de o remplazando el dominio B de dicho polipéptido de factor VIII, en la que el segundo XTEN está unido al extremo C terminal de aproximadamente el residuo aminoacídico n.º 741 a aproximadamente 750 y al extremo N terminal del residuo aminoacídico n.º 1635 a aproximadamente 1648 con referencia a la secuencia de factor VIII humano de longitud completa como se expone en la FIG. 3, en la que la longitud acumulada del XTEN es de al menos aproximadamente 100 residuos aminoacídicos. En un aspecto, en la proteína de fusión anterior, el segundo XTEN se une a los aminoácidos del factor VIII entre N745 y P1640 o entre S743 y Q1638 o entre P747 y V1642 o entre N745 y Q1656 o entre N745 y S1657 o entre N745 y T1667 o entre N745 y Q1686 o entre R747 y V1642 o entre T751 y T1667. En un aspecto, la proteína de fusión de factor VIII recombinante comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 91 %, o al menos aproximadamente un 92 %, o al menos aproximadamente un 93 %, o al menos aproximadamente un 94 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % a aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de longitud comparable seleccionada de la tabla 21, cuando se alinean de forma óptima. En otro aspecto, la proteína de fusión de factor VIII recombinante comprende al menos un segundo XTEN, opcionalmente un tercer XTEN, opcionalmente un cuarto XTEN, opcionalmente un quinto XTEN y opcionalmente un sexto XTEN, en la que cada uno del segundo, tercero, cuarto, quinto o sexto XTEN está unido a dicho polipéptido de factor VIII en un segundo, tercero, cuarto, quinto o sexto sitio seleccionado del grupo que consiste en un sitio de inserción de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9; una ubicación dentro de 6 aminoácidos del residuo aminoacídico 32, 220, 224, 336, 339, 390, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 y 1910 del factor VIII maduro; una ubicación entre dos dominios adyacentes cualesquiera de dicho polipéptido de factor VIII, en el que dichos dos dominios adyacentes se seleccionan de grupo que consiste en los dominios A1 y A2, dominios A2 y B, dominios B y A3, dominios A3 y C1 y dominios C1 y C2; una ubicación dentro del domino B de dicho polipéptido de factor VIII, en el que el segundo XTEN está unido al extremo C terminal de aproximadamente el residuo aminoacídico n.º 741 a aproximadamente 750 y al extremo N terminal del residuo aminoacídico n.º 1635 a aproximadamente 1648 de una secuencia de factor VIII nativa; y el extremo C de dicho polipéptido de factor VIII. En un aspecto, el primer XTEN está separado del segundo XTEN por al menos 10 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, al menos 200 aminoácidos, al menos 300 aminoácidos o al menos 400 aminoácidos. En un aspecto de la proteína de fusión de factor VIII recombinante que comprende al menos un segundo XTEN, opcionalmente un tercer XTEN, opcionalmente un cuarto XTEN, opcionalmente un quinto XTEN y opcionalmente un sexto XTEN, cada XTEN tiene al

menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 91 %, o al menos aproximadamente un 92 %, o al menos aproximadamente un 93 %, o al menos aproximadamente un 94 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia en comparación con un XTEN de longitud comparable seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de la tabla 4, tabla 13, tabla 14, tabla 15, tabla 16 y tabla 17, cuando se alinean de forma óptima. En otro aspecto más de la proteína de fusión de factor VIII recombinante que comprende al menos un segundo XTEN, opcionalmente un tercer XTEN, opcionalmente un cuarto XTEN, opcionalmente un quinto XTEN y opcionalmente un sexto XTEN, en aspectos preferidos, la proteína de fusión de factor VIII recombinante muestra una semivida terminal de al menos aproximadamente 3 horas, o 4 horas, o 6 horas, o 12 horas, o 13 horas, o 14 horas, o 16 horas, o 24 horas, o 48 horas, o 72 horas, o 96 horas, o 120 horas, o 144 horas, o 7 días, o 14 días, o 21 días cuando se administra a un sujeto, en la que dicho sujeto se selecciona de ser humano o ratón de doble inactivación de factor VIII/factor de Von Willebrand. Además, en los aspectos de este párrafo, la proteína de fusión muestra unión reducida a anticuerpo antifactor VIII o mayor actividad procoagulante retenida, o ambas en comparación con un factor VIII correspondiente no unido a XTEN. En un aspecto la actividad procoagulante de la proteína de fusión de factor VIII recombinante es al menos un 30 % o un 40 %, un 50 %, un 80 %, un 100 %, un 200 %, un 300 %, un 400 % o un 500 % mayor de actividad procoagulante en presencia de un anticuerpo anti-FVIII en comparación con un factor VIII correspondiente no unido a XTEN cuando cada uno se ensaya por un ensayo de coagulación *in vitro.* En una aspecto, la unión reducida de la proteína de fusión a anticuerpo antifactor VIII se determina usando un ensayo de Bethesda usando anticuerpo antifactor VIII seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos de la tabla 10 y anticuerpo policlonal de un paciente con hemofilia A con inhibidores de factor VIII, en la que la unión reducida y la actividad procoagulante retenida de la proteína de fusión se evidencia por un menor valor de Bethesda de al menos aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 o 200 unidades Bethesda para la proteína de fusión en comparación con la del factor VIII no unido a XTEN.

En un aspecto, la proteína de fusión de factor VIII recombinante puede comprender, por ejemplo, uno o más XTEN, en la que el XTEN tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, a aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia en comparación con uno o más XTEN de longitud comparable seleccionados de la tabla 4, tabla 13, tabla 14, tabla 15, tabla 16 y tabla 17, cuando se alinean de forma óptima.

En otro aspecto, la enseñanza se refiere a proteínas de fusión de factor VIII recombinante que comprenden FVIII y uno o más XTEN en configuraciones específicas de extremo N a C. En un aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula I:

$$(XTEN)_x\text{-}CF\text{-}(XTEN)_y \qquad I$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, CF es un factor VIII como se define en la presente memoria, incluyendo secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias de la tabla 1; x es 0 o 1 e y es 0 o 1, en la que $x+y \geq 1$; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4. Por consiguiente, la composición de fusión CFXTEN puede tener las configuraciones XTEN-CF, XTEN-CF-XTEN o CF-XTEN.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula II:

$$(XTEN)_x\text{-}(S)_x\text{-}(CF)\text{-}(XTEN)_y \qquad II$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, CF es un factor VIII como se define en la presente memoria, incluyendo secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 1; S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que opcionalmente pueden incluir una secuencia de escisión o aminoácidos compatibles con sitios de restricción; x es 0 o 1 e y es 0 o 1, en la que $x+y \geq 1$; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos

aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante, en la que la proteína de fusión es de fórmula III:

$$(XTEN)_x\text{-}(S)_x\text{-}(CF)\text{-}(S)_y\text{-}(XTEN)_y \qquad \text{III}$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, CF es un factor VIII como se define en la presente memoria, incluyendo secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 1; S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que opcionalmente pueden incluir una secuencia de escisión o aminoácidos compatibles con sitios de restricción; x es 0 o 1 e y es 0 o 1, en la que x+y ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula IV:

$$(A1)\text{-}(XTEN)_u\text{-}(A2)\text{-}(XTEN)_v\text{-}(B)\text{-}(XTEN)_w(A3)\text{-}(XTEN)_x\text{-}(C1)\text{-}(XTEN)_y\text{-}(C2)\text{-}(XTEN)_z \qquad \text{IV}$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, A1 es un dominio A1 de FVIII; A2 es un dominio A2 de FVIII; A3 es un dominio A3 de FVIII; B es un dominio B de FVIII que puede ser un fragmento o una variante de corte y empalme del dominio B; C1 es un dominio C1 de FVIII; C2 es un dominio C2 de FVIII; v es 0 o 1; w es 0 o 1; x es 0 o 1; y es 0 o 1; y es 0 o 1; con la condición de que u + v + x + y + z ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula V:

$$(XTEN)_t\text{-}(S)_a\text{-}(A1)\text{-}(S)_b\text{-}(XTEN)_u\text{-}(S)_b\text{-}(A2)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_c\text{-}(B)\text{-}(S)_d\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_d\text{-}(A3)\text{-}(S)_e\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_e\text{-}(C1)\text{-}(S)_f\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_f\text{-}(C2)\text{-}(S)_g\text{-}(XTEN)_z \qquad \text{V}$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, A1 es un dominio A1 de FVIII; A2 es un dominio A2 de FVIII; A3 es un dominio A3 de FVIII; B es un dominio B de FVIII que puede ser un fragmento o una variante de corte y empalme del dominio B; C1 es un dominio C1 de FVIII; C2 es un dominio C2 de FVIII; S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que opcionalmente pueden incluir una secuencia de escisión o aminoácidos compatibles con sitios de restricción; a es 0 o 1; b es 0 o 1; c es 0 o 1; d es 0 o 1; e es 0 o 1; f es 0 o 1; g es 0 o 1; t es 0 o 1; u es 0 o 1; v es 0 o 1; w es 0 o 1; x es 0 o 1; y es 0 o 1; z es 0 o 1; con la condición de que t + u + v + w+ x + y + z ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4. En otro aspecto de fórmula V, la secuencia espaciadora es glicina o una secuencia seleccionada de las tablas 11 y 12.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula VI:

$$(XTEN)_u\text{-}(S)_a\text{-}(A1)\text{-}(S)_b\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_b\text{-}(A2)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_c\text{-}(A3)\text{-}(S)_d\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_d\text{-}(C1)\text{-}(S)_e\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_e\text{-}(C2)\text{-}(S)_f\text{-}(XTEN)_z \qquad \text{VI}$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, A1 es un dominio A1 de FVIII; A2 es un dominio A2 de FVIII; A3 es un dominio A3 de FVIII; C1 es un dominio C1 de FVIII; C2 es un dominio C2 de FVIII; S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que opcionalmente pueden incluir una secuencia de escisión o aminoácidos compatibles con sitios de restricción; a es 0 o 1; b es 0 o 1; c es 0 o 1; d es 0 o 1; e es 0 o 1; f es 0 o 1; u es 0 o 1; v es 0 o 1; w es 0 o 1; x es 0 o 1; y es 0 o 1; z es 0 o 1; con la condición de que u

+ v + w+ x + y + z ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4. En otro aspecto de fórmula V, la secuencia espaciadora es glicina o una secuencia seleccionada de las tablas 11 y 12.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula VII:

$$(SP)\text{-}(XTEN)_x\text{-}(CS)_x\text{-}(S)_x\text{-}(FVIII_1\text{-}745)\text{-}(S)_y\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_y\text{-}(FVIII_1640\text{-}2332)\text{-}(S)_z\text{-}(CS)_z\text{-}(XTEN)_z \qquad VII$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, SP es un péptido señal, preferiblemente con la secuencia MQIELSTCFFLCLLRFCFS (SEQ ID NO: 1611), CS es una secuencia de escisión enumerada en la tabla 12, S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que pueden incluir opcionalmente aminoácidos compatibles con sitios de restricción, "FVIII_1-745" es los residuos 1-745 del factor VIII y "FVIII_1640-2332" es los residuos 1640-2332 de FVIII, x es 0 o 1, y es 0 o 1 y z es 0 o 1, en la que x+y+z >2; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4. En un aspecto de fórmula VII la secuencia espaciadora es GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). En otro aspecto de fórmula V, la secuencia espaciadora es glicina o una secuencia seleccionada de las tablas 11 y 12.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula VIII:

$$(A1)\text{-}(S)_a\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_a\text{-}(A2)\text{-}(B1)\text{-}(S)_b\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_b\text{-}(B2)\text{-}(A3)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_c\text{-}(C1)\text{-}(S)_d\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_d\text{-}(C2)\text{-}(S)_e\text{-}(XTEN)_z \qquad VIII$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, A1 es un dominio A1 de FVIII; A2 es un dominio A2 de FVIII; B1 es un fragmento del dominio B que puede tener del residuo 741 a 743-750 de FVIII o como alternativa de aproximadamente el residuo 741 a aproximadamente el residuo 745 de FVIII; B2 es un fragmento del dominio B que puede tener de los residuos 1635-1686 a 1689 de FVIII o como alternativa de aproximadamente el residuo 1640 a aproximadamente el residuo 1689 de FVIII; A3 es un dominio A3 de FVIII; C1 es un dominio C1 de FVIII; C2 es un dominio C2 de FVIII; S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que opcionalmente pueden incluir una secuencia de escisión o aminoácidos compatibles con sitios de restricción; a es 0 o 1; b es 0 o 1; c es 0 o 1; d es 0 o 1; e es 0 o 1; f es 0 o 1; u es 0 o 1; v es 0 o 1; w es 0 o 1; x es 0 o 1; y es 0 o 1; z es 0 o 1; con la condición de que u + v + w+ x + y + z ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4. En un aspecto de fórmula VIII la secuencia espaciadora es GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). En otro aspecto de fórmula V, la secuencia espaciadora es glicina o una secuencia seleccionada de las tablas 11 y 12.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula IX:

$$(A1_N)\text{-}(S)_a\text{-}(XTEN)_t\text{-}(S)_b\text{-}(A1_C)\text{-}(A2_N)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_u\text{-}(S)_d\text{-}(A2_C)\text{-}(B_N)\text{-}(S)_e\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_f\text{-}(B_C)\text{-}(A3_N)\text{-}(S)_g\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_h\text{-}(A3_C)\text{-}(C1_N)\text{-}(S)_i\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_j\text{-}(C1_C)\text{-}(C2_N)\text{-}(S)_k\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_1\text{-}(C2_C)\text{-}(S)_m\text{-}(XTEN)_z \qquad IX$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, $A1_N$ es un fragmento del dominio A1 desde al menos el residuo número 1 (numerado con respecto a FVIII maduro nativo) a no más del residuo número 371, $A1_c$ es un fragmento del dominio A1 desde al menos el residuo número 2 a no más del residuo número 372, con la condición de que ninguna secuencia del fragmento $A1_N$ esté duplicada en el fragmento $A1_c$; $A2_N$ es un fragmento del dominio A2 desde al menos el residuo número 373 a no más del residuo número 739, $A2_c$ es un fragmento del dominio A2 desde al menos el residuo número 374 a no más del residuo número 740, con la condición de que ninguna secuencia del fragmento $A2_N$ esté duplicada en el fragmento $A2_c$; B_N es un fragmento del dominio B de al menos el residuo número 741 a no más del residuo número 1647, B_c es un fragmento del dominio B desde al menos el residuo número 742 a no más del residuo número 1648, con la condición de que ninguna secuencia del fragmento B_N esté duplicada en el fragmento B_c; $A3_N$ es un fragmento del dominio A3 desde al menos el residuo número 1649 a no más del residuo número 2019, $A3_c$ es un fragmento del dominio A3 desde al menos el residuo número 1650 a no más del residuo número 2019, con la condición de que ninguna secuencia del fragmento $A3_N$ esté duplicado en el fragmento $A3_c$; $C1_N$

es un fragmento del dominio C1 desde al menos el residuo número 2020 a no más del residuo número 2171, $C1_c$ es un fragmento del dominio C1 desde al menos el residuo número 2021 a no más del residuo número 2172, con la condición de que ninguna secuencia del fragmento $C1_N$ esté duplicada en el fragmento $C1_c$; $C2_N$ es un fragmento del dominio C2 desde al menos el residuo número 2173 a no más del residuo número 2331, $C2_c$ es un fragmento del dominio C2 desde al menos el residuo 2174 a no más del residuo número 2332, con la condición de que ninguna secuencia del fragmento $C2_N$ esté duplicada en el fragmento $C2_c$; S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que opcionalmente pueden incluir una secuencia de escisión o aminoácidos compatibles con sitios de restricción; a es 0 o 1; b es 0 o 1; c es 0 o 1; d es 0 o 1; e es 0 o 1; f es 0 o 1; g es 0 o 1; h es 0 o 1; i es 0 o 1; j es 0 o 1; k es 0 o 1; l es 0 o 1; m es 0 o 1; t es 0 o 1; u es 0 o 1; v es 0 o 1; w es 0 o 1; x es 0 o 1; y es 0 o 1; z es 0 o 1 con la condición de que t + u + v + w+ x + y + z ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, a aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia en comparación con uno o más XTEN de longitud comparable seleccionados de la tabla 4. En un aspecto de fórmula IX la secuencia espaciadora es GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). En otro aspecto de fórmula V, la secuencia espaciadora es glicina o una secuencia seleccionada de las tablas 11 y 12. En otro aspecto de fórmula IX, Z es 1. En otro aspecto de la proteína de fusión de fórmula IX, V es 1 y el XTEN está unido al extremo C terminal de aproximadamente el residuo aminoacídico número 741 a aproximadamente 750 y al extremo N terminal del residuo aminoacídico número 1635 a aproximadamente 1648 con referencia a la secuencia de factor VIII humano de longitud completa como se expone en la FIG. 3. En otro aspecto de la proteína de fusión de fórmula IX, la suma de t, u, v, w, x, y y z es igual a 2, 3, 4, 5 o 6. En otro aspecto de fórmula IX, la suma de t, u, v, w, x, y y z es igual a 2, y v es 1 y z es 1. En otro aspecto de la proteína de fusión de fórmula IX, la suma de t, u, v, w, x, y y z es igual a 3, v y z cada uno es igual a 1 y t, u, w, x o y es 1. En otro aspecto de fórmula IX, la suma de t, u, v, w, x, y y z es igual a 4, v y w y z cada uno es igual a 1, y dos de t, u, x o y es 1. En otro aspecto de la proteína de fusión de fórmula IX, la longitud acumulada de los XTEN es entre aproximadamente 84 y aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos. En otro aspecto de fórmula IX, al menos un XTEN se inserta inmediatamente en dirección 3' de un aminoácido que corresponde a un aminoácido en factor VIII humano nativo maduro seleccionado del grupo que consiste en el residuo aminoacídico número 32, 220, 224, 336, 339, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 y 1910. En otro aspecto de la proteína de fusión de fórmula IX, cada XTEN está unido a dicha proteína de fusión en sitios seleccionados de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9. En otro aspecto de la proteína de fusión de fórmula IX, cada XTEN tiene al menos aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 91 %, o al menos aproximadamente un 92 %, o al menos aproximadamente un 93 %, o al menos aproximadamente un 94 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia en comparación con un XTEN de longitud comparable seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de la tabla 4, tabla 13, tabla 14, tabla 15, tabla 16 y tabla 17, cuando se alinean de forma óptima.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona un primer polipéptido de factor VIII recombinante de fórmula X:

(A1)-a1-(A2)-a2-[B] X

y un segundo polipéptido que comprende la fórmula XI:

a3-(A3)-(C1)-(C2) XI

en la que el primer polipéptido y el segundo polipéptido se fusionan o existen como un heterodímero; en la que A1 es un dominio A1 de factor VIII; A2 es un dominio A2 de factor VIII; [B] es un dominio B de factor VIII, un fragmento del mismo o está eliminado; A3 es un dominio A3 de factor VIII; C1 es un dominio C1 de factor VIII; C2 es un dominio C2 de factor VIII; a1, a2, y a3 con regiones espaciadoras ácidas; en la que el dominio A1 comprende una región de bucle 1 permisivo de XTEN (A1-1) y una región de bucle 2 permisivo de XTEN (A1-2); en los que el dominio A2 comprende una región de bucle 1 permisivo de XTEN (A2-1) y una región de bucle 2 permisivo de XTEN (A2-2); en los que el dominio A3 comprende una región de bucle 1 permisivo de XTEN (A3-1) y una región de bucle 2 permisivo de XTEN (A3-2); en los que una secuencia de XTEN se inserta en al menos una de las regiones A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 o A3-2; y en los que la proteína de factor VIII recombinante muestra actividad procoagulante. En un aspecto del heterodímero, el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman una única cadena polipeptídica que comprende la fórmula (A1) - a1 - (A2) - a2 - [B] - [a3] - (A3) - (C1) - (C2). En un aspecto de lo anterior, "fusionado" significa un enlace peptídico.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona un primer polipéptido de factor VIII recombinante de fórmula X:

(A1)-a1-(A2)-a2-[B] X

y un segundo polipéptido que comprende la fórmula XI:

a3-(A3)-(C1)-(C2) XI

en la que el primer polipéptido y el segundo polipéptido están fusionados o existen como un heterodímero; en la que A1 es un dominio A1 de factor VIII; A2 es un dominio A2 de factor VIII; [B] es un dominio B de factor VIII, un fragmento del mismo o está eliminado; A3 es un dominio A3 de factor VIII; C1 es un dominio C1 de factor VIII; C2 es un dominio C2 de factor VIII; a1, a2 y a3 son regiones espaciadoras ácidas; en la que una secuencia de XTEN se inserta en a3; y en la que la proteína de factor VIII recombinante muestra actividad procoagulante. En un aspecto del heterodímero, el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman una única cadena polipeptídica que comprende la fórmula (A1) - a1 - (A2) - a2 - [B] - [a3] - (A3) - (C1) - (C2). En un aspecto de lo anterior, "fusionado" significa un enlace peptídico.

En aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, los bucles permisivos de XTEN están contenidos dentro de las estructuras de bucle flexible expuestas en la superficie, y en los que A1-1 está ubicado entre la hebra beta 1 y la hebra beta 2, A1-2 está ubicado entre la hebra beta 11 y la hebra beta 12, A2-1 está ubicado entre la hebra beta 22 y la hebra betas 23, A2-2 está ubicado entre la hebra beta 32 y la hebra beta 33, A3-1 está ubicado entre la hebra beta 38 y la hebra beta 39 y A3-2 está ubicado entre la hebra beta 45 y la hebra beta 46, de acuerdo con la estructura secundaria del factor VIII maduro almacenado como el número de acceso 2R7E de la base de datos DSSP. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, la estructura de bucle flexible expuesta en la superficie que comprende A1-1 corresponde a una región en factor VIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 15 a aproximadamente el aminoácido 45. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, el A1-1 corresponde a una región en factor VIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 18 a aproximadamente el aminoácido 41. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, la estructura de bucle flexible expuesta en la superficie que comprende A1-2 corresponde a una región en factor VIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 201 a aproximadamente el aminoácido 232. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, el A1-2 corresponde a una región en factor VIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 218 a aproximadamente el aminoácido 229. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, la estructura de bucle flexible expuesta en la superficie que comprende A2-1 corresponde a una región en factor VIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 395 a aproximadamente el aminoácido 421. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, el A2-1 corresponde a una región en factor VIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 397 a aproximadamente el aminoácido 418. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, la estructura de bucle flexible expuesta en la superficie que comprende A2-2 corresponde a una región en factor VIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 577 a aproximadamente el aminoácido 635. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, el A2-2 corresponde a una región en factor VIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 595 a aproximadamente el aminoácido 607. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, la estructura de bucle flexible expuesta en la superficie que comprende A3-1 corresponde a una región en factor VIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 1705 a aproximadamente el aminoácido 1732. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, el A3-1 corresponde a una región en factor VIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 1711 a aproximadamente el aminoácido 1725. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, la estructura de bucle flexible expuesta en la superficie que comprende A3-2 corresponde a una región en factor VIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 1884 a aproximadamente el aminoácido 1917. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, el A3-2 corresponde a una región en factor VIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 1899 a aproximadamente el aminoácido 1911. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, una secuencia de XTEN se inserta en al menos dos de las regiones A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 o A3-2. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, una secuencia de XTEN se inserta inmediatamente en dirección 3' de un aminoácido que corresponde a un aminoácido en factor VIII humano nativo maduro seleccionado del grupo que consiste en el residuo aminoacídico número 32, 220, 224, 336, 339, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 y 1910. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, una secuencia de XTEN adicional se inserta en la región espaciadora ácida a3. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, una secuencia de XTEN adicional se inserta en el espaciador ácido a3 inmediatamente en dirección 3' de un aminoácido que corresponde al aminoácido 1656. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, el dominio A1 comprende una región de bucle 1 permisivo de XTEN (A1-1) y una región de bucle 2 permisivo de XTEN (A1-2) en los que el dominio A2 comprende una región de bucle 1 permisivo de XTEN (A2-1) y una región de bucle 2 permisivo de XTEN (A2-2), y en los que el dominio A3 comprende una región de bucle 1 permisivo de XTEN (A3-1) y una región de bucle 2 permisivo de XTEN (A3-2), y en los que una secuencia de XTEN adicional se inserta en al menos una de las regiones A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 o A3-2. En otros aspectos de los polipéptidos de fórmulas X y XI anteriores, una secuencia de XTEN adicional se inserta inmediatamente en dirección 3' de un aminoácido que corresponde a un aminoácido en factor VIII humano nativo maduro seleccionado del grupo que consiste en el residuo aminoacídico número 32, 220, 224, 336, 339, 390, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 y 1910. En los aspectos anteriores de polipéptidos de fórmulas X y XI, la proteína de fusión muestra al menos aproximadamente un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 % o un 80 % o un 90 % de la actividad procoagulante del factor VIII correspondiente no unido a XTEN, en la que la actividad procoagulante se ensaya por un ensayo de coagulación *in vitro.*

En todos los aspectos, el polipéptido puede mostrar, por ejemplo, una actividad procoagulante *in vitro* que excede de 0,5 UI/ml, o 1,0 o 1,5 o 2,0 UI/ml cuando se expresa en medio de cultivo celular y se ensaya por un ensayo de coagulación *in vitro.* La actividad procoagulante puede medirse por un ensayo cromogénico, un ensayo de coagulación de una fase (por ejemplo, un aPTT) o ambos.

En algunos aspectos en los que la proteína de fusión de factor VIII recombinante comprende un factor VIII y al menos un primer y un segundo XTEN, el al menos primer XTEN está separado del al menos segundo XTEN por al menos 10 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, al menos 200 aminoácidos, al menos 300 aminoácidos o al menos 400 aminoácidos.

En aspectos preferidos, la proteína de fusión de factor VIII recombinante que comprende un factor VIII y al menos un primer XTEN y, opcionalmente, al menos un segundo, u opcionalmente al menos un tercero, u opcionalmente al menos un cuarto XTEN, la proteína de fusión muestra unión reducida a un anticuerpo antifactor VIII en comparación con el factor VIII correspondiente no unido a XTEN. La unión reducida puede evaluarse *in vivo* o por un ensayo *in vitro.* En un aspecto, el ensayo *in vitro* es un ensayo de ELISA, en el que la unión de un anticuerpo anti-FVIII a la proteína de fusión se reduce en al menos aproximadamente un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 % o al menos aproximadamente un 40 % o más en comparación con FVIII no unido a XTEN. En otro aspecto, el ensayo *in vitro* es un ensayo de Bethesda en el que la unión reducida de la proteína de fusión se evidencia por un valor de Bethesda inferior de al menos aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 o 200 unidades Bethesda para la proteína de fusión en comparación con el de un factor VIII no unido a XTEN. En los ensayos *in vitro* el anticuerpo antifactor VIII se selecciona de un anticuerpo de la tabla 10 y anticuerpo policlonal de un paciente con hemofilia A con inhibidores de factor VIII. En aspectos particulares de una proteína de fusión de factor VIII recombinante que comprende un factor VIII y al menos un primer y un segundo XTEN que muestra unión reducida a un anticuerpo inhibidor de factor VIII, el primer XTEN está unido a dicho polipéptido de factor VIII dentro de un dominio C2 de dicho polipéptido de factor VIII, y el segundo XTEN está unido a dicho polipéptido de factor VIII en un dominio A1 o A2 de dicho polipéptido de factor VIII, en la que dicha proteína de fusión muestra unión reducida a un anticuerpo inhibidor de factor VIII en comparación con el factor VIII correspondiente no unido a XTEN, en la que el anticuerpo inhibidor de factor VIII puede unirse a un epítopo ubicado dentro del dominio A1, A2 o C2, y además en la que la proteína de fusión muestra actividad procoagulante. En un aspecto de la proteína de fusión anterior, el segundo XTEN está unido a dicho polipéptido de factor VIII dentro del dominio A2 del polipéptido de factor VIII y el anticuerpo inhibidor de factor VIII se une al dominio A2 del polipéptido de factor VIII. En otro aspecto de la proteína de fusión anterior, el segundo XTEN está unido a dicho polipéptido de factor VIII dentro del dominio C2 del polipéptido de factor VIII y el anticuerpo inhibidor de factor VIII se une al dominio C2 del polipéptido de factor VIII. La unión de un anticuerpo antifactor VIII a la proteína de fusión se reduce en al menos aproximadamente un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 % o un 40 % en comparación con el factor VIII correspondiente no unido a XTEN cuando se ensaya por un ensayo de ELISA, en el que el anticuerpo antifactor VIII se selecciona del grupo que consiste en los anticuerpos de la tabla 10 y un anticuerpo policlonal de un sujeto con hemofilia A con inhibidores de factor VIII. Las proteínas de fusión anteriores pueden comprender además al menos tres XTEN, en las que el al menos tercer XTEN está unido al factor VIII en un sitio seleccionado de dentro de o remplazando el dominio B, en el extremo C, y en o dentro de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos de un sitio de inserción seleccionado de la tabla 7 o tabla 9. En los aspectos con unión reducida a anticuerpos antifactor VIII, la proteína de fusión tiene mayor actividad procoagulante en presencia del anticuerpo anti-FVIII de al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 80 %, un 100 %, un 200 %, un 300 %, un 400 % o un 500 % o más en comparación con un factor VIII correspondiente no unido a XTEN cuando se ensaya por un ensayo de coagulación *in vitro* (por ejemplo, un ensayo cromogénico o de coagulación de una fase).

En todos los aspectos, el XTEN de la proteína de fusión puede caracterizarse, por ejemplo, por que el XTEN comprende al menos 36, o al menos 42, o al menos 72, o al menos 96, o al menos 144, o al menos 288, o al menos 400, o al menos 500, o al menos 576, o al menos 600, o al menos 700, o al menos 800, o al menos 864, o al menos 900, o al menos 1000, o al menos 2000, a aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos o incluso más residuos; la suma de residuos de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P) constituye al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de los residuos aminoacídicos totales del XTEN; el XTEN es sustancialmente no repetitivo de modo que (i) el XTEN no contiene tres aminoácidos contiguos que sean idénticos salvo que los aminoácidos sean serina; (ii) al menos aproximadamente un 80 % de la secuencia de XTEN consiste en motivos de secuencia no solapantes, comprendiendo cada uno de los motivos de secuencia aproximadamente 9 a aproximadamente 14, o aproximadamente 12 residuos aminoacídicos que consisten en cuatro a seis aminoácidos seleccionados de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P), en el que dos residuos aminoacídicos contiguos cualesquiera no aparecen más de dos veces en cada uno de los motivos de secuencia no solapantes; o (iii) la secuencia de XTEN tiene una puntuación de su secuencia de menos de 10; el XTEN tiene más de un 90 %, o más de un 95 % o más de un 99 % de formación de enrollamiento aleatorio que se determina por el algoritmo GOR; el XTEN tiene menos de un 2 % de hélices alfa y un 2 % de láminas beta que se determina por el algoritmo de Chou-Fasman; el XTEN carece de un epítopo de linfocitos T predicho cuando se analiza por el algoritmo TEPITOPE, en el que la puntuación umbral de TEPITOPE para dicha predicción por dicho algoritmo tiene un umbral de -9, y en el que dicha

proteína de fusión muestra una semivida terminal que es más larga de al menos aproximadamente 12 h, o al menos aproximadamente 24 h, o al menos aproximadamente 48 h, o al menos aproximadamente 72 h, o al menos aproximadamente 96 h, o al menos aproximadamente 120 h, o al menos aproximadamente 144 h, o al menos aproximadamente 21 días o mayor. En un aspecto, la proteína de fusión de factor VIII recombinante comprende al menos un segundo, o al menos un tercero, o al menos un cuatro XTEN, que puede ser idéntico o diferente al otro XTEN. De acuerdo con una estrategia diferente, el al menos uno, al menos un segundo, o al menos un tercero, o al menos un cuarto XTEN de la proteína de fusión de CFXTEN tiene cada uno al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, a aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia en comparación con uno o más XTEN de longitud comparable seleccionados de la tabla 4, tabla 13, tabla 14, tabla 15, tabla 16 y tabla 17, cuando se alinean de forma óptima. En otra estrategia diferente más, el al menos uno, al menos un segundo, o al menos un tercero, o al menos un cuatro XTEN de la proteína de fusión de CFXTEN tiene cada uno al menos un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, a aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia selecciona de AE42_1, AE42_2, AE42_3, AG42_1, AG42_2, AG42_3, AG42_4, AE144_1A, AE144_2A, AE144_2B, AE144_3A, AE144_3B, AE144_4A, AE144_4B, AE144_5A, AE144_6B, AG144_1, AG144_2, AG144_A, AG144_B, AG144_C, AG144_F, AG144_3, AG144_4, AE288_1, AE288_2, AG288_1 y AG288_2.

En un aspecto, el componente de factor VIII de la proteína de fusión de factor VIII recombinante de CFXTEN comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácidos seleccionadas de los residuos R1648, Y1680 y R1689, numerados con respecto al factor VIII humano maduro, en el que las sustituciones se seleccionan de alanina, glicina y fenilalanina. Ejemplos no limitantes de dichas sustituciones incluyen R1648A, Y1680F y R1689A.

En otro aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN muestra un factor de peso molecular aparente de al menos aproximadamente 1,3, o al menos aproximadamente dos, o al menos aproximadamente tres, o al menos aproximadamente cuatro, o al menos aproximadamente cinco, o al menos aproximadamente seis, o al menos aproximadamente siete, o al menos aproximadamente ocho, o al menos aproximadamente nueve o al menos aproximadamente 10, cuando se mide por cromatografía de exclusión por tamaño o método comparable.

En algunos aspectos de las proteínas de fusión de CFXTEN, uno o más de los XTEN es para el FVIII mediante una o dos secuencias de escisión que cada una es escindible por una proteasa de mamífero seleccionada del grupo que consiste en factor XIa, factor XIIa, calicreína, factor VIIa, factor IXa, factor Xa, factor IIa (trombina), elastasa-2, MMP-12, MMP13, MMP-17 y MMP-20, en las que la escisión en la secuencia de escisión por la proteasa de mamífero libera la secuencia de factor VIII de la secuencia de XTEN, y en las que la secuencia de factor VIII liberada muestra un aumento en la actividad procoagulante en comparación con la proteína de fusión no escindida. En un aspecto, la una o más secuencias de escisión son escindibles por factor XIa.

De acuerdo con una estrategia diferente, las proteínas de fusión de CFXTEN comprenden al menos tres XTEN ubicados en diferentes ubicaciones del polipéptido de factor VIII, en las que dichas diferentes ubicaciones se seleccionan de: una ubicación de inserción en o dentro de 1 a 6 aminoácidos desde un sitio seleccionado de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9; una ubicación en o dentro de 1 a 6 aminoácidos del residuo aminoacídico 32, 220, 224, 336, 339, 390, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 y 1910 del factor VIII maduro; una ubicación entre dos dominios adyacentes cualesquiera en la secuencia de factor VIII, en las que dichos dos dominios adyacentes se seleccionan del grupo que consiste en A1 y A2, A2 y B, B y A3, A3 y C1 y C1 y C2; una ubicación dentro de una eliminación de dominio B interna que empieza desde una primera posición en aproximadamente el residuo aminoacídico número 741 a aproximadamente 750 y que finaliza en una segunda posición en el residuo aminoacídico número 1635 a aproximadamente 1648 con referencia a la secuencia de factor VIII humano de longitud completa como se expone en la FIG. 3 y el extremo C de la secuencia de factor VIII, en las que la longitud acumulada de los múltiples XTEN es de al menos aproximadamente 100 a aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos y en las que la proteína de fusión retiene al menos aproximadamente un 30 %, o aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 % de la actividad procoagulante en comparación con el factor VIII correspondiente no unido a XTEN, en las que la actividad procoagulante se ensaya por un ensayo de coagulación *in vitro*. En un aspecto de lo anterior, la proteína de fusión muestra una semivida terminal prolongada cuando se administra a un sujeto en comparación con un polipéptido de factor VIII correspondiente que carece de dicho XTEN, en la que dicha proteína de fusión muestra una semivida terminal de al menos aproximadamente 3 horas, o 4 horas, o 6 horas, o 12 horas, o 13 horas o 14 horas, o 16 horas, o 24 horas, o 48 horas, o 72 horas, o 96 horas o 120 horas, 144 horas, o 7 días, o 14 días, o 21 días cuando se administra a un sujeto. En un aspecto, el sujeto se selecciona del grupo que consiste en ser humano o un ratón de doble inactivación de factor VIII/factor de Von Willebrand. En un aspecto de lo anterior, la proteína de fusión no comprende una secuencia seleccionada de GTPGSGTASSSP (SEQ ID NO: 31), GSSTPSGATGSP (SEQ ID NO: 32), GSSPSASTGTGP (SEQ ID NO: 33), GASPGTSSTGSP (SEQ ID NO: 34), y GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEP

ATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP (SEQ ID NO: 59). En otro aspecto de lo anterior, la proteína de fusión no contiene una secuencia de XTEN que consiste en

GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSG
SETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST
EPSEGSAP (SEQ ID NO: 59).

PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS
STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP
GSGTASSS (SEQ ID NO: 71), o

PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG
ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGA
SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG
SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG
TASSSPGSSTPSGATGS (SEQ ID NO: 80).

En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a proteínas de fusión de CFXTEN con propiedades farmacocinéticas potenciadas, incluyendo parámetros potenciados en comparación con FVIII no unido a XTEN, en las que las propiedades potenciadas incluyen, aunque sin limitación, una semivida terminal más larga, mayor área bajo la curva, tiempo aumentado en que la concentración en sangre permanece dentro de la ventana terapéutica, tiempo aumentado entre dosis consecutivas que provoca concentraciones en sangre dentro de la ventana terapéutica y dosis disminuida en UI a lo largo del tiempo que pueden administrarse en comparación con un FVIII no unido a XTEN, que aún provoca una concentración en sangre por encima de una concentración umbral necesaria para un efecto procoagulante. En algunos aspectos, una proteína de fusión de CFXTEN muestra una semivida terminal prolongada cuando se administra a un sujeto en comparación con un polipéptido de factor VIII correspondiente que carece de dicho XTEN. El sujeto puede ser un ser humano o un ratón, tal como un ratón de doble inactivación de factor VIII/factor de Von Willebrand. En un aspecto de lo anterior, la CFXTEN muestra una semivida terminal que es al menos aproximadamente dos veces, o aproximadamente tres veces, o aproximadamente cuatro veces, o aproximadamente cinco veces, o aproximadamente 10 veces, o aproximadamente 20 veces más larga cuando se administra a un sujeto en comparación con el factor VIII correspondiente no unido a XTEN. En un aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN muestra una semivida terminal de al menos aproximadamente 3 horas, o 4 horas, o 6 horas, o 12 horas, o 13 horas o 14 horas, o 16 horas, o 24 horas, o 48 horas, o 72 horas, o 96 horas o 120 horas, 144 horas, o 7 días, o 14 días, o 21 días cuando se administra al sujeto. En otros aspectos, la propiedad farmacocinética potenciada de las proteínas de fusión de los aspectos es la propiedad de mantener una concentración en sangre circulante de la proteína de fusión procoagulante en un sujeto que lo necesita por encima de una concentración umbral de 0,01 UI/ml, o 0,05 UI/ml, o 0,1 UI/ml, o 0,2 UI/ml, o 0,3 UI/ml, o 0,4 UI/ml o 0,5 UI/ml durante un periodo que es al menos aproximadamente dos veces, o al menos aproximadamente tres veces, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente seis veces, o al menos aproximadamente ocho veces, o al menos aproximadamente diez veces, o al menos aproximadamente 20 veces, o al menos aproximadamente 40 veces, o al menos aproximadamente 60 veces más largo en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN y administrado a un sujeto a una dosis comparable. El aumento en la semivida y el tiempo empleado por encima de la concentración umbral permite una dosificación menos frecuente y cantidades disminuidas de la proteína de fusión (en equivalentes molares) que se administran a un sujeto, en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN. En un aspecto, la administración de una proteína de fusión en cuestión a un sujeto usando una pauta posológica terapéuticamente eficaz provoca una ahorro de tiempo de al menos dos veces, o al menos tres veces, o al menos cuatro veces, o al menos cinco veces, o al menos seis veces, o al menos ocho veces, o al menos 10 veces, o al menos aproximadamente 20 veces, o al menos aproximadamente 40 veces, o al menos aproximadamente 60 veces o mayor entre al menos dos picos de Cmáx consecutivos y/o mínimos de Cmín para los niveles en sangre de la proteína de fusión en comparación con el FVIII correspondiente no unido al XTEN y administrado usando una pauta posológica comparable a un sujeto.

En aspectos preferidos, las proteínas de fusión de CFXTEN retienen al menos aproximadamente un 30 %, o aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 % de la actividad procoagulante en comparación con el factor VIII correspondiente no unido a XTEN, en las que la actividad procoagulante se ensaya por un ensayo de coagulación *in vitro* tal como, aunque sin limitación, un ensayo cromogénico o un ensayo de coagulación de una o dos fases.

De acuerdo con una estrategia diferente, la enseñanza proporciona proteínas de fusión de factor VIII recombinante que comprenden un polipéptido de factor VIII y al menos un polipéptido recombinante prolongado (XTEN), en las que dicho polipéptido de factor VIII comprende dominio A1, dominio A2, dominio A3, dominio C1, dominio C2 y opcionalmente la totalidad o una parte de dominio B, y en las que dicho al menos un XTEN está unido a dicho polipéptido de factor VIII en un sitio de inserción seleccionado del residuo número 18-32, o 40, o 211-224, o 336-403, o 599, o 745-1640, o 1656-1728, o 1796-1804, o 1900-1912, o 2171-2332; y en las que la proteína de fusión retiene al menos aproximadamente un 30 %, o aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 % o aproximadamente un 90 % de la actividad procoagulante en comparación con el factor VIII correspondiente no unido a XTEN. En un aspecto de lo anterior, la proteína de fusión comprende al menos un segundo XTEN, o al menos un tercero, o al menos un cuarto XTEN en la que el XTEN está unido al factor VIII en un sitio en o dentro de 1 a 6 aminoácidos de un sitio seleccionado de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9. En otro aspecto la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante que comprende además al menos un segundo XTEN, o al menos un tercero, o al menos un cuarto XTEN unido a dicho polipéptido de FVIII en un sitio de inserción seleccionado de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 en o dentro de 6 aminoácidos al extremo N o C de una ubicación de inserción en una o más ubicaciones de inserción de la figura 8 y dentro de uno o más intervalos de inserción de la figura 9, en la que al menos dos XTEN están separados por una secuencia de aminoácidos de al menos 100 a aproximadamente 400 aminoácidos.

La enseñanza proporciona CFXTEN, en la que el XTEN tiene una relación de radios de XTEN de al menos 2,3 o al menos 2,5, y están separados por una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 20 residuos aminoacídicos, o al menos aproximadamente 50, o al menos aproximadamente 100, o al menos aproximadamente 200, o al menos aproximadamente 300, o al menos aproximadamente 400 residuos aminoacídicos. En otros aspectos, la CFXTEN comprende al menos cuatro XTEN, en la que los XTEN tienen una relación de radios de XTEN de al menos 2,3, o al menos 2,5, o al menos 2,8 y en la que al menos tres de los cuatro XTEN unidos a la proteína de fusión están separados por una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 20 residuos aminoacídicos, o al menos aproximadamente 50, o al menos aproximadamente 100, o al menos aproximadamente 200, o al menos aproximadamente 300, o al menos aproximadamente 400 residuos aminoacídicos, y el cuatro XTEN está unido dentro del dominio B (o un fragmento del mismo) o dentro del dominio C (o el extremo del mismo).

En algunos aspectos, las presentes composiciones están configuradas para tener afinidad de unión reducida por un receptor de eliminación en un sujeto en comparación con el FVIII correspondiente no unido al XTEN. En un aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN muestra afinidad de unión por un receptor de eliminación del FVIII en el intervalo de aproximadamente un 0,01 %-30 %, o aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 20 %, o aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 15 %, o aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 10 % de la afinidad de unión del FVIII correspondiente no unido al XTEN. En otro aspecto, una proteína de fusión con afinidad reducida por un receptor de eliminación tiene eliminación activa reducida y un aumento correspondiente en la semivida de al menos aproximadamente 2 veces o 3 veces, o al menos 4 veces, o al menos aproximadamente 5 veces, o al menos aproximadamente 6 veces, o al menos aproximadamente 7 veces, o al menos aproximadamente 8 veces, o al menos aproximadamente 9 veces, o al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 12 veces, o al menos aproximadamente 15 veces, o al menos aproximadamente 17, o al menos aproximadamente 20 veces más larga en comparación con el FVIII correspondiente que no está unido al XTEN.

En un aspecto, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante que comprende FVIII y uno o más XTEN, en la que la proteína de fusión muestra solubilidad aumentada de al menos tres veces, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente seis veces, o al menos aproximadamente siete veces, o al menos aproximadamente ocho veces, o al menos aproximadamente nueve veces, o al menos aproximadamente diez veces, o al menos aproximadamente 15 veces, o al menos 20 veces, o al menos 40 veces, o al menos 60 veces en condiciones fisiológicas en comparación con el FVIII no unido a XTEN.

En un aspecto adicional, la enseñanza proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de cualquiera de los aspectos descritos en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la enseñanza proporciona un método de tratamiento de una coagulopatía en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz coagulante de la composición farmacéutica. En un aspecto del método, después de dicha administración, una concentración en sangre de factor VIII procoagulante se mantiene a aproximadamente 0,05 o 1 o 1,5 UI/ml o más durante al menos 48 horas después de dicha administración. En otro aspecto, la enseñanza proporciona un método de coagulación de la sangre en un sujeto, que comprende poner en contacto una cantidad eficaz coagulante de la composición farmacéutica dentro de la sangre.

En otro aspecto, la enseñanza proporciona un método de tratamiento de una coagulopatía en un sujeto con inhibidores circulantes de factor VIII, que comprende administrar a dicho sujeto una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de CFXTEN, en el que la composición muestra mayor actividad procoagulante en dicho sujeto en comparación con una composición que comprende el factor VIII

correspondiente no unido a XTEN y administrado usando una cantidad comparable. En un aspecto del método, la coagulopatía es hemofilia A. En otro aspecto, la coagulopatía es el resultado de traumatismo o cirugía o infección.

La enseñanza proporciona un método de tratamiento de un episodio hemorrágico en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz coagulante de la composición farmacéutica de CFXTEN, en el que la cantidad eficaz coagulante de la proteína de fusión detiene un episodio hemorrágico durante un periodo que es al menos tres veces, o al menos cuatro veces, o al menos cinco veces más largo en comparación con un factor VIII correspondiente no unido a XTEN y administrado usando una cantidad comparable a dicho sujeto. Ejemplos no limitantes de un factor VIII correspondiente no unido a XTEN incluyen FVIII nativo, la secuencia de la tabla 1, BDD-FVIII y el FVIII pCB0114.

En otro aspecto, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de CFXTEN para su uso en un régimen farmacéutico para el tratamiento de un paciente con hemofilia A, comprendiendo dicho régimen una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de CFXTEN. En un aspecto del régimen farmacéutico, el régimen comprende además la etapa de determinar la cantidad de composición farmacéutica que comprende la CFXTEN necesaria para conseguir hemostasia en el paciente con hemofilia A. En otro aspecto, el régimen farmacéutico para el tratamiento de un sujeto con hemofilia A comprende administrar la composición farmacéutica en dos o más dosis sucesivas al sujeto a una cantidad eficaz, en el que la administración provoca al menos un 10 % o un 20 %, o un 30 %, o un 40 %, o un 50 %, o un 60 %, o un 70 %, o un 80 %, o un 90 % mayor de mejora de al menos uno, dos o tres parámetros asociados con la enfermedad de hemofilia A en comparación con el factor VIII no unido a XTEN y administrado usando una dosis comparable. Ejemplos no limitantes de parámetros mejorados incluyen la concentración en sangre de FVIII procoagulante, un tiempo de ensayo de protrombina parcial activada (aPTT) reducido, un tiempo de ensayo de coagulación de una fase o dos fases reducido, aparición retardada de un episodio hemorrágico, un tiempo de ensayo cromogénico reducido, un tiempo de ensayo de hemorragia reducido, resolución de un evento hemorrágico o un valor de Bethesda reducido para FVIII nativo.

En otro aspecto, la enseñanza proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican las proteínas de fusión de uno cualquiera de los aspectos de la proteína de fusión de CFXTEN. En un aspecto, el ácido nucleico aislado es el complemento de una secuencia que codifica una proteína de fusión de CFXTEN de los aspectos. En un aspecto, el ácido nucleico aislado comprende además una secuencia que codifica un péptido señal, en el que dicha secuencia es ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGT (SEQ ID NO: 1613), o el complemento de la misma. En otro aspecto, la enseñanza proporciona un vector de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión, o el complemento del mismo. En otro aspecto, la enseñanza proporciona una célula hospedadora aislada que comprende el vector de expresión anterior. En otro aspecto, la enseñanza proporciona un método de producción de la proteína de fusión de cualquiera de los aspectos, que comprende proporcionar una célula hospedadora que comprende el vector de expresión; cultivar la célula hospedadora para lograr la producción de la proteína de fusión; y recuperar la proteína de fusión.

En un aspecto, la enseñanza proporciona una proteína de fusión aislada que comprende un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, a aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de longitud comparable seleccionada de la tabla 21, cuando se alinean de forma óptima.

En otro aspecto, la enseñanza proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de (a) una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, a aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de longitud comparable seleccionada de la tabla 21, cuando se alinean de forma óptima, o (b) el complemento del polinucleótido de (a). En otro aspecto, el ácido nucleico aislado comprende la secuencia ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGT (SEQ ID NO: 1613) unida al extremo 5' del ácido nucleico de (a) o el complemento de la secuencia unido al extremo 3' de (b).

Se contempla específicamente que las proteínas de fusión de factor VIII recombinante pueden mostrar una o más o cualquier combinación de las propiedades divulgadas en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

Las características y ventajas de la enseñanza pueden explicarse adicionalmente por referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos que exponen aspectos ilustrativos.

La FIG. 1 muestra una representación esquemática de la arquitectura de FVIII y la disposición espacial de los dominios durante el procesamiento y coagulación, y pretende representar tanto FVIII nativo como variantes con el dominio B

eliminado. El dominio A1 varía del residuo 1 a 372 (numeración con respecto a la forma madura de la secuencia de FVIII NCBI Protein RefSeq NP_000123 y que abarca los residuos a1), el domino A2 varía del residuo 373 a 740, el dominio B varía del residuo 741 a 1648, el dominio A3 varía del residuo 1649 a 2019 (que abarca la región ácida a3), el dominio C1 varía de 2020 a 2172 y el dominio C2 varía del residuo 2173 a 2332. Las variantes BDD incluyen eliminaciones entre el intervalo de 741 a 1648, dejando algunos residuos remanentes o ninguno, siendo una secuencia remanente de BDD no limitante SFSQNPPVLKRHQR (SEQ ID NO: 1614). La FIG. 1A muestra la arquitectura de dominios de un FVIII monocatenario antes del procesamiento. Las flechas indican los sitios en los residuos R372, R740, R1648, y R1689 que se escinden en el procesamiento y la conversión de FVIII en FVIIIa. La FIG. 1B muestra la molécula de FVIII que se ha procesado en el heterodímero por la escisión en el residuo R1648, con la región ácida a3 del domino A3 indicada en el extremo N del A3. La FIG. 1C muestra la molécula de FVIII procesada en el heterotrímero de FVIIIa mediante la escisión en los residuos R372, R740, y R1689.

La FIG. 2 es un esquema de la cascada de coagulación, que muestra los brazos intrínseco y extrínseco que dan lugar a la vía común.

La FIG. 3 representa la secuencia de aminoácidos de factor VIII humano maduro (SEQ ID NO: 1592).

La FIG. 4 representa una secuencia de factor VIII con una eliminación de una parte del dominio B (SEQ ID NO: 1593).

La FIG. 5 ilustra varios ejemplos de configuraciones CFXTEN de FVIII unido a XTEN (el último mostrado como líneas onduladas gruesas). En todos los casos, el FVIII puede ser nativo o una forma BDD de FVIII, o una forma monocatenaria en que el dominio B completo, incluyendo los sitios de escisión nativos están eliminados. La FIG. 5A muestra, de izquierda a derecha, tres variaciones de factor VIII monocatenario con XTEN unido al extremo N, el extremo C y dos XTEN unidos al extremo N y C. La FIG. 5B muestra seis variaciones de FVIII heterodimérico maduro con, de izquierda a derecha, un XTEN unido al extremo N del dominio A1; un XTEN unido al extremo C del dominio C2; un XTEN unido al extremo N del dominio A1 y el extremo C del dominio C2; un XTEN unido al extremo N del dominio A1 y al extremo N del dominio A3; un XTEN unido al extremo C del dominio C2 y al extremo N del domino A3 mediante aminoácidos residuales del dominio B; y un XTEN unido al extremo N del dominio A1, el extremo C del dominio A2 mediante aminoácidos residuales del dominio B y al extremo C del dominio C2. La FIG. 5C muestra, de izquierda a derecha, tres variaciones de factor VIII monocatenario: un XTEN unido al extremo N del dominio A1, un XTEN unido dentro de un bucle superficial del dominio A1 y un XTEN unido dentro de un bucle superficial del dominio A3; un XTEN unido dentro de un bucle superficial del dominio A2, un XTEN unido dentro de un bucle superficial del dominio C2 y un XTEN unido al extremo C del dominio C2; un XTEN unido al extremo N del domino A1 y dentro de un bucle superficial del dominio C1 y al extremo C del dominio C. La FIG. 5D muestra seis variaciones del FVIII heterodimérico maduro con, de izquierda a derecha, un XTEN unido al extremo N del dominio A1, un XTEN unido dentro de un bucle superficial del dominio A1 y un XTEN unido dentro de un bucle superficial del dominio A3; un XTEN unido dentro de un bucle superficial del dominio A2 y un XTEN unido dentro de un bucle superficial del dominio C1 y un XTEN unido al extremo C del dominio C2; un XTEN unido al extremo N del dominio A1, un XTEN unido dentro de un bucle superficial del dominio A1, un XTEN unido dentro de un bucle superficial del dominio A3 y un XTEN unido al extremo C del dominio C2; un XTEN unida al extremo N del dominio A1, un XTEN unido al extremo N del dominio A3 mediante aminoácidos residuales del dominio B y un XTEN unido dentro de un bucle superficial del dominio C2; un XTEN unido dentro de un bucle superficial del dominio A2, un XTEN unido al extremo N del dominio A3 mediante aminoácidos residuales del dominio B, un XTEN unido dentro de un bucle superficial del dominio C1 y un XTEN unido al extremo C del dominio C2; y un XTEN unido dentro del dominio B o entre residuos residuales del dominio B de la variante BDD (y la enseñanza también contempla una variación en que el XTEN remplaza la totalidad del dominio B, incluyendo todos los sitios de escisión nativos, que unen los dominio A2 y A3, produciendo una forma monocatenaria de factor VIII. Esta figura también plasma todas las variaciones en que se insertan una o más secuencias de XTEN dentro del dominio B y las fusiones resultantes se escinden en uno o más sitios (por ejemplo, en el sitio R1648) durante el procesamiento intracelular.

La FIG. 6 es una imagen gráfica de una construcción de CFXTEN con un XTEN insertado dentro del dominio B y unido al extremo C del domino C2 que ilustra la característica no estructurada del XTEN que da lugar a formación de enrollamiento aleatorio que puede cubrir partes del factor VIII proximales al XTEN. En el panel inferior, el dibujo representa que cuando XTEN está en enrollamiento aleatorio, puede adoptar una conformación que provoca impedancia estérica que bloquea la unión de los anticuerpos inhibidores de factor VIII que de lo contrario tendrían afinidad por epítopos proximales al sitio de inserción de XTEN.

La FIG. 7 es una imagen gráfica de los diversos análisis realizados en una secuencia de FVIII con dominio B eliminado para identificar sitios de inserción para XTEN dentro de la secuencia de FVIII. Cada una de las líneas A-H están en una escala arbitraria de valores del eje de ordenadas a través de la secuencia BDD de FVIII de modo que valores bajos representan zonas con una alta tolerancia prevista para la inserción de XTEN, con los números de residuo en el eje de abscisas. La línea A muestra los límites de los dominios; todas las interrupciones en esta línea representan límites que probablemente aceptan XTEN. La línea B muestra límites exónicos; es decir, cada paso en la línea representa un nuevo exón. La línea C muestra regiones que no eran visibles en la estructura de rayos X debido a la ausencia de orden en el cristal. Las líneas marcadas con D representan múltiples predicciones de orden que se

calcularon usando los programas respectivos FoldIndex encontrados en el sitio web bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex (último acceso el 23 de febrero de 2011) (véase, Jaime Prilusky, Clifford E. Felder, Tzviya Zeev-Ben-Mordehai, Edwin Rydberg, Orna Man, Jacques S. Beckmann, Israel Silman, y Joel L. Sussman, 2005, Bioinformatics based on the Kyte & Doolitlle algorithm, así como RONN encontrado en el sitio web strubi.ox.ac.uk/RONN (último acceso el 23 de febrero de 2011) (véase, Yang,Z.R., Thomson, R., McMeil, P. and Esnouf, R.M. (2005) RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins Bioinformatics 21: 3369-3376. Las líneas E y F se calcularon basándose en alineaciones de múltiples secuencias de genes de FVIII de 11 mamíferos disponibles en GenBank. La línea E representa la conservación de residuos individuales. La línea F representa la conservación de 3 segmentos de aminoácidos de FVIII. Las líneas G y H representan huecos e inserciones observados en la alineación de múltiples secuencias de 11 genes de FVIII de mamífero. La línea J enumera los puntos de inserción de XTEN por el número de aminoácido, que se obtuvieron basándose en la combinación de las múltiples mediciones anteriores.

La FIG. 8 representa los sitios en una secuencia de FVIII con el dominio B eliminado (SEQ ID NO: 1594) identificados como puntos de inserción activos para XTEN usando la información representada en la FIG. 8 y que se confirma en los ensayos del ejemplo 34.

La FIG. 9 representa el intervalo de sitios en una secuencia de FVIII con domino B eliminado (SEQ ID NO: 1595) identificados para la inserción de XTEN usando la información representada en la FIG. 8 y/o el ejemplo 34 más un tramo de aminoácidos alrededor de cada punto de inserción que se consideraban adecuados para la inserción de XTEN.

La FIG. 10 es un esquema del ensamblaje de una colección de CFXTEN creada identificando puntos de inserción como se describe para las FIG. 7 seguido por la inserción de un único XTEN (barras negras) en los diversos puntos de inserción usando técnicas de biología molecular. Las construcciones se expresan y se recuperan, después se evalúan para la actividad de FVIII y las propiedades farmacocinéticas para identificar aquellas configuraciones de CFXTEN que produzcan propiedades potenciadas.

La FIG. 11 es un esquema del ensamblaje de una colección de componentes de CFXTEN en que se ensamblan segmentos de dominios BDD de FVIII, individualmente o unidos a diversas longitudes de XTEN (barras negras) de un modo combinatorio en colecciones de genes que codifican CFXTEN, que después pueden evaluarse para la actividad de FVIII y las propiedades farmacocinéticas para identificar aquellas configuraciones de CFXTEN que produzcan propiedades potenciadas.

La FIG. 12 ilustra varios ejemplos de configuraciones de CFXTEN con XTEN (mostrado como líneas onduladas gruesas), con determinado XTEN liberable por inserción de secuencias de escisión (indicadas por triángulos negros) que se pueden escindir por proteasas procoagulantes. La FIG. 12A ilustra un scFVIII con dos XTEN liberables terminales. La FIG. 12B ilustra la misma configuración que la FIG. 12A, pero con un XTEN no liberable adicional que une los dominios A3 y C1. La FIG. 12C ilustra un FVIII heterodimérico maduro con dos XTEN liberables terminales. La FIG. 12D ilustra la misma configuración que 10C, pero con un XTEN no liberable adicional que une los dominios A3 y C1.

La FIG. 13 es un diagrama de flujo esquemático de las etapas representativas en el ensamblaje, producción y la evaluación de un XTEN.

La FIG. 14 es un diagrama de flujo esquemático de las etapas representativas en el ensamblaje de una construcción polinucleotídica de CFXTEN que codifica una proteína de fusión. Los oligonucleótidos individuales **501** se hibridan en motivos de secuencia **502** tal como un motivo de 12 aminoácidos ("oligómero de 12 monómeros"), que se liga a motivos de secuencia adicionales de una colección para crear una combinación que abarca la longitud deseada del XTEN **504,** así como se liga a una concentración más pequeña de un oligo que contiene los sitios de restricción BbsI y KpnI **503.** La combinación resultante de productos de ligamiento se purifica en gel y la banda con la longitud deseada de XTEN se corta, produciendo un gen de XTEN aislado con una secuencia de tope **505.** El gen de XTEN se clona en un vector de relleno. En este caso, el vector codifica una secuencia de CBD opcional **506** y un gen de GFP **508.** La digestión entonces se realiza con BbsI/HindIII para eliminar **507** y **508** y colocar el codón de parada. El producto resultante entonces se clona en un vector digerido con BsaI/HindIII que contiene un gen que codifica el FVIII, produciendo el gen **500** que codifica una proteína de fusión de FVIII-XTEN.

La FIG. 15 es un diagrama de flujo esquemático de las etapas representativas en el ensamblaje de un gen que codifica la proteína de fusión que comprende un CF y XTEN, su expresión y recuperación como proteína de fusión y su evaluación como producto de CFXTEN candidato.

La FIG. 16 ilustra el uso de secuencias de XTEN donadoras que producen XTEN truncados. La FIG. 16A proporciona la secuencia de AG864 (SEQ ID NO: 1596), con la secuencia subrayada usada para generar una longitud de secuencia de 576 (SEQ ID NO: 1597). La FIG. 16B proporciona la secuencia de AG864 (SEQ ID NO: 1598), con la secuencia subrayada usada para generar una longitud de secuencia de 288 (SEQ ID NO: 1599). La FIG. 16C proporciona la

secuencia de AG864 (SEQ ID NO: 1600), con la secuencia subrayada usada para generar una longitud de secuencia de 144 (SEQ ID NO: 1601). La FIG. 16D proporciona la secuencia de AE864 (SEQ ID NO: 1602), con la secuencia subrayada usada para generar una longitud de secuencia de 576 (SEQ ID NO: 1603). La FIG. 16E proporciona la secuencia de AE864 (SEQ ID NO: 1604), con la secuencia subrayada usada para generar una longitud de secuencia de 288 (SEQ ID NO: 1605). La FIG. 16F proporciona la secuencia de AE864 (SEQ ID NO: 1606) usada para generar cuatro secuencias de longitud de 144 (SEQ ID NO: 1607-1610, respectivamente, en orden de aparición) (el doble subrayado indica el primer aminoácido en la secuencia 144, representando el subrayado simple el equilibrio de esa secuencia).

La FIG. 17 es una representación esquemática del diseño de vectores de expresión de factor VIII-XTEN con diferentes estrategias que introducen elementos XTEN en la secuencia codificante de FVIII. La FIG. 17A muestra un vector de expresión que codifica XTEN fusionado al extremo 3' de la secuencia que codifica FVIII. La FIG. 17B representa un vector de expresión que codifica un elemento XTEN insertado en el centro de la secuencia codificante que codifica un único FVIII. La FIG. 17C representa un vector de expresión que codifica dos elementos XTEN: uno insertado interno a la secuencia codificante de FVIII y el otro fusionado al extremo 3' de la secuencia que codifica FVIII.

La FIG. 18 ilustra el proceso de ensamblaje génico combinatorio de genes que codifican XTEN. En este caso, los genes se ensamblan a partir de fragmentos de 6 bases y cada fragmento está disponible en 4 versiones de codones diferentes (A, B, C y D). Esto permite una diversidad teórica de 4096 en el ensamblaje de un motivo de 12 aminoácidos.

La FIG. 19 muestra el perfil farmacocinético (concentraciones en plasma) en macacos después de dosis individuales de diferentes composiciones de GFP unida a polipéptidos no estructurados de longitud variable, administradas por vía subcutánea o intravenosa, como se describe en el ejemplo 41. Las composiciones eran GFP-L288, GFP-L576, GFP-XTEN AF576, GFP-Y576 y XTEN_AD836-GFP. Se analizaron muestras de sangre en diferentes momentos después de la inyección y la concentración de GFP en plasma se midió por ELISA usando un anticuerpo policlonal contra GFP para la captura y una preparación biotinilada del mismo anticuerpo policlonal para la detección. Los resultados se presentan como la concentración en plasma frente al tiempo (h) después de la dosificación y muestran, en particular, un aumento considerable en la semivida para la XTEN AD836-GFP, la composición con la longitud de secuencia más larga de XTEN. La construcción con la longitud de secuencia más corta, la GFP-L288 tuvo la semivida más corta.

La FIG. 20 muestra un gel de SDS-PAGE de muestras de un estudio de estabilidad de la proteína de fusión de XTEN_AE864 fusionada al extremo N de GFP (véase el ejemplo 42). La GFP-XTEN se incubó en plasma de macaco y lisado de riñón de rata durante hasta 7 días a 37 °C. Además, también se evaluó GFP-XTEN administrada a macacos. Se extrajeron muestras a 0, 1 y 7 días y se analizaron por SDS-PAGE seguido de detección usando análisis de Western con anticuerpos contra GFP.

La FIG. 21 muestra los resultados de un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de muestras de construcción de glucagón-XTEN medidas frente a patrones proteínicos de peso molecular conocido, con el resultado del gráfico como la absorbancia frente al volumen de retención, como se describe en el ejemplo 40. Las construcciones de glucagón-XTEN son 1) glucagón-Y288; 2) glucagónY-144; 3) glucagón-Y72; y 4) glucagón-Y36. Los resultados indican un aumento en el peso molecular aparente con longitud creciente del resto XTEN (véase el ejemplo 40 para los datos).

La FIG. 22 muestra los resultados de una transferencia de Western de proteínas expresadas por cultivo celular de células transformadas con construcciones diseñadas (ejemplo 25). Las muestras en los carriles 1-12 fueron: Patrones de PM, FVIII (42,5 ng), pBC0100B, pBC0114A, pBC0100, pBC0114, pBC0135, pBC0136, pBC0137, pBC0145, pBC0149 y pBC0146, respectivamente. Los carriles 8, 9 y 12 muestran bandas coherentes con un FVIII con un XTEN288 en el extremo C, con un PM estimado de 95 kDa. Los carriles 7 y 11 muestran bandas coherentes con un FVIII con un XTEN42 en el extremo C, con un PM estimado de 175 kDa. Los carriles 2-6 muestran bandas coherentes con FVIII y cadena pesada. Los carriles 10 y 23 muestran bandas coherentes con cadena pesada. El carril 7 muestra una banda coherente con cadena pesada y un XTEN42 adherido.

La FIG. 23 muestra los resultados del ensayo de FVIII sobre muestras obtenidas de ratones de doble inactivación de FVIII y factor de Von Willebrand con inyección hidrodinámica de ADN plasmídico, como se detalla en el ejemplo 36.

La FIG. 24 es un gráfico e imagen tabular de las propiedades farmacocinéticas de rBDD-FVIII y las proteínas de fusión de CFXTEN purificadas pBC0145 y pBC0146 (con XTEN en el extremo C) administradas a ratones HemA o con doble inactivación de FVIII/VWF como se describe en el ejemplo 30, que muestran la semivida potenciada de la CFXTEN en ambas cepas de ratones.

La FIG. 25 es un gráfico e imagen tabular de las propiedades farmacocinéticas de rBDD-FVIII y las proteínas de fusión de CFXTEN pSD0050 y pSD0062 (con XTEN insertado interno) administradas a ratones HemA (FIG. 25A) o de doble inactivación de FVIII/VWF (FIG. 25B) usando un ensayo de PK de cultivo celular en ratones HemA. La dosis, la recuperación de 5 minutos y la semivida (T1/2) se muestran, como se describe en el ejemplo 32, destacando la

recuperación potenciada y la semivida de la CFXTEN en comparación con el control positivo de FVIII en ambas cepas de ratones.

La FIG. 26 es una representación gráfica de una valoración del inhibidor de FVIII GMA8021 usando el pBC0114 BDD-FVIII y la construcción de CFXTEN LSD0049.002 con tres inserciones de XTEN de 144 aminoácidos en los residuos 18, 745 y 2332. Los datos indican un desplazamiento a la derecha de aproximadamente 0,7 de orden de magnitud en la cantidad de anticuerpo en µg/ml necesario para inhibir la CFXTEN hasta el nivel de un 50 %, en comparación con el control positivo de FVIII.

La FIG. 27 es un esquema del diagrama de flujo lógico del algoritmo SegScore. En la figura, se aplican las siguientes leyendas: i, j - contadores usados en los bucles de control que discurren a través de la secuencia completa; HitCount - esta variable es un contador que rastrea las veces que una sustancia encuentra una subsecuencia idéntica en un bloque; SubSeqX - esta variable mantiene la subsecuencia que se está comprobando para redundancia; SubSeqY - esta variable mantiene la subsecuencia frente a la que se comprueba SubSeqX; BlockLen - esta variable mantiene la longitud determinada por el usuario del bloque; SegLen - esta variable mantiene la longitud de un segmento. El programa está codificado para generar puntuaciones para subsecuencias de longitudes de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; Block - esta variable mantiene una cadena de longitud BlockLen. La cadena está compuesta de letras de una secuencia de XTEN introducida y se determina por la posición del contador i; SubSeqList - esto es una lista que mantiene todas las puntuaciones de subsecuencia generadas.

La FIG. 28 representa la aplicación del algoritmo SegScore a un XTEN hipotético de 11 aminoácidos (SEQ ID NO: 1591) para determinar la repetitividad. Una secuencia de XTEN que consiste en N aminoácidos se divide en N-S+1 subsecuencias de longitud S (S=3 en este caso). Se realizan una comparación por parejas de todas las subsecuencias y el número promedio de subsecuencias idénticas se calcula para producir la puntuación de subsecuencia de 1,89.

La FIG. 29 es un gráfico de los valores de construcción individuales de la relación de actividad de FVIII en la CFXTEN ensayada con la del control positivo de FVIII pBC114 después de la exposición al anticuerpo GMA8021 contra FVIII, agrupados de acuerdo con el número de XTEN en la proteína de fusión de la construcción (véase el ejemplo 28). Los resultados muestran una relación esencialmente lineal en la capacidad de la CFXTEN de retener la actividad de FVIII con un número creciente de XTEN incorporados.

La FIG. 30 representa la secuencia primaria y la estructura de dominios de la construcción de FVIII humano con dominio B eliminado (BDD) madura (ejemplo 46). Se muestra la ubicación de los sitios de restricción *NheI* y *ClaI* introducidos. Obsérvese que la numeración de aminoácidos corresponde a las posiciones de aminoácidos en la secuencia primaria de FVIII maduro (FIG. 30). Los dominios individuales están unidos por líneas grises/recuadros con la identificación del dominio en texto en gris. Las regiones ácidas (a1, a2, a3) se indican con recuadros discontinuos. Las cuñas/triángulos rellenos indican sitios de escisión de trombina en la activación de FVIII a FVIIIa. Las cuñas/triángulos no rellenos indican el sitio de procesamiento proteolítico intracelular en la forma bicatenaria de FVIII. Los hexágonos indican sitios de glucosilación ligada a N. Los círculos indican sitios de sulfatación de Tyr. Los sitios de restricción no nativos únicos (*NheI,* GCTAG; *ClaI,* ATCGAT) introducidos en el ADNc para facilitar la inserción/recombinación de XTEN están resaltados en gris con doble subrayado.

La FIG. 31 proporciona una representación gráfica de la construcción de FVIII descrita en la FIG. 30, que indica la organización de dominios y la ubicación de los sitios de restricción nativos y no nativos.

La FIG. 32 muestra los resultados de ASAView gráficos para los conjuntos de datos estructurales 2R7E, 3CDZ y PM0076106. Las zonas accesibles al disolvente (ASA) para los aminoácidos en los dominios A1, A2, A3, C1 y C2 se muestran. Se realizaron análisis sobre coordenadas cristalográficas de rayos X 3CDZ (Ngo *et al*., Structure 16: 597-606 (2008)) y 2R7E (Shen *et al*., Blood 111:1240-1247 (2008)) depositadas en el Protein Data Bank mantenido por el Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB; http://www.rcsb.org/pdb), así como sobre coordenadas anatómicas PM0076106 para la estructura de FVIII refinada prevista derivada de un estudio de simulación de dinámica molecular (Venkateswarlu, BMC Struct. Biol. 10:7 (2010)) depositada en la Protein Model Database (http://mi.caspur.it/PMDB/main.php) mantenida por Consorzio Interuniversitario per le Applicazioni di Supercalcolo per Università e Riserca (CASPUR) y el Departamento de Ciencias Bioquímicas de la Universidad de Roma.

La FIG. 33 muestra una representación estructural de la ubicación de los sitios de inserción de XTEN. El dibujo central que corresponde a la estructura cristalina de FVIII (PDB: 2R7E) está rodeado por una vista detallada de los dominios A1, A2, A3, C1 y C2. Se muestran hebras beta y hélices alfa como representación de cintas. Los bucles se muestran como tubos de carbono alfa. los aminoácidos a los sitios de inserción de XTEN se muestran como representación de esferas de CPK. El número en cada gráfico indica la ubicación de los sitios de inserción de XTEN de acuerdo con la numeración de la FIG. 30.

La FIG. 34 muestra una representación estructural de la ubicación de los sitios de inserción de XTEN mostrados en la FIG. 33, en la que la proteína de FVIII recombinante resultante presenta actividad de FVIII.

La FIG. 35 muestra una representación estructural de la ubicación de los sitios de inserción de XTEN mostrados en la FIG. 34, en la que la proteína de FVIII recombinante resultante presenta actividad de FVIII.

La FIG. 36 muestra una representación estructural de la ubicación de los sitios de inserción de XTEN mostrados en la FIG. 35, en la que la proteína de FVIII recombinante resultante presenta actividad de FVIII.

La FIG. 37 muestra una alineación de múltiples secuencias de ClustalW de los dominios A1, A2, A3, C1 y C2 de FVIII que muestra la ubicación de inserciones de XTEN que producen proteínas de FVIII recombinantes que presentan actividad de FVIII (recuadro negro, texto blanco) o que no presentan actividad de FVIII (recuadro gris, texto en negrita).

La FIG. 38 muestra una representación gráfica de DSSP de la estructura secundaria de las dos cadenas polipeptídicas en una estructura cristalina de FVIII humano activo nativo depositada según el identificador 2R7E en el Protein Data Bank (véase el ejemplo 47). La numeración de la secuencia de aminoácidos es la misma que en la secuencia proteínica de la FIG. 30. Las regiones de lámina beta se muestran como flechas rellenas y se denominan β1 a β66. La ubicación de los bucles permisivos de XTEN se indica por recuadros sombreados. Los bucles permisivos de XTEN de dominio A1 se denominan bucle A1-1 y bucle A1-2. Los bucles permisivos de XTEN de dominio A2 se denominan bucle A2-1 y bucle A2-2. Los bucles permisivos de XTEN de dominio A3 se denominan bucle A3-1 y bucle A3-2.

La FIG. 39 muestra una representación gráfica de DSSP de la estructura secundaria de las dos cadenas polipeptídicas en una estructura cristalina de FVIII humano activo nativo depositada según el identificador 2R7E en el Protein Data Bank (véase el ejemplo 47). La numeración de la secuencia de aminoácidos es la misma que en la secuencia proteínica de la FIG. 30. Las regiones de lámina beta se muestran como flechas rellenas y se denominan β1 a β66. La ubicación de los bucles permisivos de XTEN se indica por recuadros sombreados. Los bucles permisivos de XTEN de dominio A1 se denominan bucle A1-1 y bucle A1-2. Los bucles permisivos de XTEN de dominio A2 se denominan bucle A2-1 y bucle A2-2. Los bucles permisivos de XTEN de dominio A3 se denominan bucle A3-1 y bucle A3-2.

La FIG. 40 muestra una alineación de múltiples secuencias de ClustalW de los dominios A1, A2, A3, C1 y C2 de FVIII que muestra la ubicación de inserciones de XTEN que producen proteínas de FVIII recombinantes que presentan actividad de FVIII (recuadro negro, texto blanco) o que no presentan actividad de FVIII (recuadro gris, texto en negrita). Las ubicaciones de los bucles permisivos de XTEN se indican por rectángulos discontinuos (véase el ejemplo 47).

FIG. 41. La FIG. 41A representa una representación estructural de vista frontal de FVIII humano (PDB:2R7E) que muestra la ubicación de los dominios A1, A2, A3, C1 y C2 (en círculo de línea discontinua) y las ubicaciones de los bucles permisivos de XTEN A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 y A3-2 resaltados como representaciones de esferas de CPK. La FIG. 41B representa una representación estructural de vista lateral de FVIII humano (PDB:2R7E) que muestra la ubicación de los dominios A1, A2, A3, C1 y C2 (en círculo de línea discontinua) y las ubicaciones de los bucles permisivos de XTEN A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 y A3-2 resaltados como representaciones de esferas de CPK.

La FIG. 42 muestra las representaciones estructurales de vista superior de dominios A de FVIII humano (PDB:2R7E) aislados que muestran la ubicación de los bucles permisivos de XTEN resaltados como representaciones de esferas de CPK. La FIG. 42B, 42D y 42F muestran representaciones estructurales de vista lateral de dominios A de FVIII humano (PDB:2R7E) aislados que muestran la ubicación de los bucles permisivos de XTEN resaltados como representaciones de esferas de CPK.

La FIG. 43 muestra secuencias de diversas eliminaciones de dominio B de factor VIII y mutaciones individuales. Las líneas 4-10 muestran diversas eliminaciones de dominio B con el XTEN indicado uniendo los residuos residuales de dominio B o de dominio A3 flanqueantes. La mutación R1648A se indica por la flecha en la línea 5 y 8, mientras que la mutación Y1680F se indica por la flecha en las líneas 8-10.

La FIG. 44 es un gráfico de barras de la actividad de ensayo cromogénico y de aPTT de diversas CFXTEN con inserciones de XTEN individuales (ejemplo 49).

La FIG. 45 es un gráfico de barras de la actividad de ensayo cromogénico y de aPTT de diversas CFXTEN con 2 inserciones de XTEN (ejemplo 49).

La FIG. 46 es un gráfico de barras de la actividad de ensayo cromogénico y de aPTT de diversas CFXTEN con 3 inserciones de XTEN (ejemplo 49).

La FIG. 47 es un gráfico de los niveles plasmáticos en ratones DKO de diversas CFXTEN administradas con inserciones de un solo XTEN en comparación con un control de BDD-FVIII, que demuestra la semivida de 10 a 20 veces más larga conseguida por las inserciones de XTEN en diversas ubicaciones (ejemplo 50).

La FIG. 48 es un gráfico de los niveles plasmáticos en ratones DKO de diversas CFXTEN administradas con una, dos y tres inserciones de XTEN en comparación con un control de BDD-FVIII, que demuestra los aumentos en la semivida

conseguidos por la inclusión de inserciones de XTEN adicionales en comparación con una sola inserción o dos inserciones (ejemplo 51).

La FIG. 49 es gráficos de las curvas de inhibición representadas para la actividad procoagulante de factor VIII remanente en muestras ensayadas en el ensayo de Bethesda con tres sueros de pacientes con hemofilia (FIG. 49A-C) o anticuerpo de oveja anti-FVIII (FIG. 49D) descrito en el ejemplo 52, que demuestra un claro desplazamiento a la izquierda de la curva de inhibición para las dos moléculas de CFXTEN en comparación con el FVIII no unido a XTEN.

Descripción detallada

Antes de describir los aspectos de la enseñanza, debe entenderse que dichos aspectos se proporcionan a modo de ejemplo únicamente, y que pueden emplearse diversas alternativas a los aspectos de la enseñanza descritos en la presente memoria en la práctica de la enseñanza.

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el habitualmente comprendido por un experto en la materia a la que pertenece esta enseñanza. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente enseñanza, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos únicamente y no pretenden ser limitantes.

Definiciones

En el contexto de la presente memoria descriptiva, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a ellos salvo que se especifique lo contrario:

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares "un/o", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales salvo que le contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente memoria para hacer referencia a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por elementos no aminoacídicos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado, por ejemplo, por formación de enlace disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquiera otra manipulación, tal como conjugación con un compuesto marcador.

Como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos incluyendo, aunque sin limitación, ambos isómeros ópticos D o L y análogos aminoacídicos y peptidomiméticos. Se usan códigos convencionales de una letra o tres letras para denominar los aminoácidos.

El término "dominio", cuando se usa en referencia a un polipéptido de factor VIII, se refiere a un dominio de longitud completa o un fragmento funcional del mismo, por ejemplo, fragmentos de longitud completa o funcionales del dominio A1, dominio A2, dominio A3, dominio B, dominio C1 y/o dominio C2 de factor VIII.

La expresión "L-aminoácido natural" significa las formas de isómero óptico L de glicina (G), prolina (P), alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), metionina (M), cisteína (C), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), histidina (H), lisina (K), arginina (R), glutamina (Q), asparagina (N), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), serina (S) y treonina (T).

La expresión "de origen no natural", como se aplica a secuencias y como se usa en la presente memoria, significa secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas que no tienen un equivalente, no son complementarias o no tienen un alto grado de homología con una secuencia de tipo silvestre o de origen natural encontrada en un mamífero. Por ejemplo, un polipéptido o fragmento de origen no natural puede compartir no más de un 99 %, un 98 %, un 95 %, un 90 %, un 80 %, un 70 %, un 60 %, un 50 % o incluso menos de identidad de secuencia de aminoácidos en comparación con una secuencia natural cuando se alinean adecuadamente.

Los términos "hidrófilo" e "hidrófobo" se refieren al grado de afinidad que una sustancia tiene con el agua. Una sustancia hidrófila tiene una fuerte afinidad por agua, tendiendo a disolverse en, mezclarse con o humedecerse por el agua, mientras que una sustancia hidrófoba carece sustancialmente de afinidad por el agua, tendiendo a repeler y no absorber agua y tendiendo a no disolverse en o mezclarse con o humedecerse por el agua. Los aminoácidos pueden caracterizarse basándose en su hidrofobia. Se han desarrollado varias escalas. Un ejemplo es una escala desarrollada por Levitt, M, *et al.*, J Mol Biol (1976) 104:59, que se enumera en Hopp, TP, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (1981) 78:3824. Ejemplos de "aminoácidos hidrófilos" son arginina, lisina, treonina, alanina, asparagina y glutamina. Son de particular interés los aminoácidos hidrófilos aspartato, glutamato y serina y glicina. Ejemplos de "aminoácidos hidrófobos" son triptófano, tirosina, fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina y valina.

Un "fragmento", cuando se aplica a una proteína, es una forma truncada de una proteína biológicamente activa nativa que retiene al menos una parte de la actividad terapéutica y/o biológica. Una "variante", cuando se aplica a una proteína, es una proteína con homología de secuencia con la proteína biológicamente activa nativa que retiene al menos una parte de la actividad terapéutica y/o biológica de la proteína biológicamente activa. Por ejemplo, una proteína variante puede compartir al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos en comparación con la proteína biológicamente activa de referencia. Como se usa en la presente memoria, la expresión "resto proteínico biológicamente activo" incluye proteínas modificadas deliberadamente, como por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio, síntesis del gen codificante, inserciones o accidentalmente mediante mutaciones.

La expresión "variante de secuencia" significa polipéptidos que se han modificado en comparación a su secuencia nativa u original por una o más inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácido. Las inserciones pueden estar ubicadas en cualquiera o ambos extremos de la proteína, y/o pueden colocarse dentro de regiones internas de la secuencia de aminoácidos. Un ejemplo no limitante es la inserción de una secuencia de XTEN dentro de la secuencia de la proteína de carga biológicamente activa. En variantes de eliminación, se eliminan uno o más residuos aminoacídicos en un polipéptido como se describe en la presente memoria. las variantes de eliminación, por lo tanto, incluyen todos los fragmentos de una secuencia polipeptídica de carga. En variantes de sustitución, uno o más residuos aminoacídicos de un polipéptido se eliminan y se remplazan con residuos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son de naturaleza conservativa y las sustituciones conservativas de este tipo son bien conocidas en la técnica.

Como se usa en la presente memoria, "XTEN interno" se refiere a secuencias de XTEN que se han insertado en la secuencia del factor de coagulación. Pueden construirse XTEN internos mediante inserción de una secuencia de XTEN en la secuencia de un factor de coagulación tal como FVIII, por inserción entre dos aminoácidos adyacentes dentro de un dominio ("intradominio") o entre dos dominios ("interdominio") del factor de coagulación o en los que el XTEN remplaza una secuencia parcial interna del factor de coagulación.

Como se usa en la presente memoria, "XTEN terminal" se refiere a secuencias de XTEN que se han fusionado a o en el extremo N o C del factor de coagulación o a una secuencia de escisión proteolítica o conector en el extremo N o C del factor de coagulación. Los XTEN terminales pueden fusionarse a los extremos nativos del factor de coagulación. Como alternativa, los XTEN terminales pueden remplazar una parte de una secuencia terminal del factor de coagulación.

La expresión "sitio de liberación de XTEN" se refiere a una secuencia de escisión en proteínas de fusión de CFXTEN que pueden reconocerse y escindirse por una proteasa de mamífero, logrando la liberación de un XTEN o una parte de un XTEN de la proteína de fusión de CFXTEN. Como se usa en la presente memoria, "proteasa de mamífero" significa una proteasa que existe normalmente en los líquidos corporales, células o tejidos de un mamífero. Los sitios de liberación de XTEN pueden genomanipularse para que se escindan por diversas proteasas de mamífero (denominadas también "proteasas de liberación de XTEN") tales como FXIa, FXIIa, calicreína, FVIIIa, FVIIIa, FXa, FIIa (trombina), elastasa-2, MMP-12, MMP13, MMP-17, MMP-20 o cualquier proteasa que esté presente durante un evento de coagulación. Pueden utilizarse otras proteasas equivalentes (endógenas o exógenas) que puedan reconocer un sitio de escisión definido. Los sitios de escisión pueden ajustarse y adaptarse a la proteasa utilizada.

El término "dentro", cuando se refiere a un primer polipéptido que está unido a un segundo polipéptido, abarca la unión que conecta el extremo N del primer o segundo polipéptido al extremo C del segundo o primer polipéptido, respectivamente, así como la inserción del primer polipéptido en la secuencia del segundo polipéptido. Por ejemplo, cuando un XTEN está unido "dentro" de un dominio de un polipéptido de factor VIII, el XTEN puede estar unido al extremo N, el extremo C o puede estar insertado en dicho dominio.

Como se usa en la presente memoria, el término "sitio", cuando se usa para hacer referencia a un sitio de inserción de un XTEN dentro de o en un polipéptido biológico tal como un factor VIII, representa la posición aminoacídica en que el XTEN se une. Cuando se describen sitios numerados, tales como un primero, segundo, tercero, cuarto, quinto o sexto sitio para la inserción de un XTEN dentro de o en el factor VIII, cada sitio se entenderá representando un sitio distinto en el factor VIII; por ejemplo, el segundo sitio es una ubicación diferente del factor VIII del primer sitio, el tercer sitio es diferente del segundo y el primero, etc.

"Actividad" o "actividad procoagulante" que se aplica a una o más formas de un polipéptido de CFXTEN proporcionado en la presente memoria, se refiere a la capacidad de unirse a un sustrato de proteína de coagulación diana o cofactor y promover un evento de coagulación, ya sea medido por un ensayo *in vitro, ex vivo* o *in vivo.* Dichos ensayos incluyen, aunque sin limitación, ensayos de coagulación de una fase, ensayos de coagulación de dos fases, ensayos cromogénicos y ensayos de ELISA. "Actividad biológica" se refiere a una función biológica *in vitro* o *in vivo* o efecto incluyendo, aunque sin limitación, unión a receptor o ligando, o un efecto sobre la coagulación en general conocido en la técnica para el factor de coagulación FVIII, o una respuesta celular, fisiológica o clínica incluyendo la detención de un episodio hemorrágico.

Como se usa en la presente memoria, el término "ELISA" se refiere a un ensayo de inmunoadsorción enzimática como se describe en la presente memoria o como se conoce de otra forma en la técnica.

Una "célula hospedadora" incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser destinatario o ha sido destinatario de los presentes vectores. Las células hospedadoras incluyen la descendencia de una sola célula hospedadora. La descendencia puede no ser necesariamente idéntica completamente (en morfología o en genómica del complemento de ADN total) a la célula precursora original debido a mutación natural, accidental o deliberada. Una célula hospedadora incluye células transfectadas *in vivo* con un vector de esta enseñanza.

"Aislado", cuando se usa para describir los diversos péptidos divulgados en la presente memoria, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que típicamente interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas u otros solutos proteínicos o no proteínicos. Como es evidente para los expertos en la materia, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos de los mismos de origen no natural no requieren "aislamiento" para distinguirlos de su equivalente de origen natural. Además, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos de los mismos "concentrados", "separados" o "diluidos" son distinguibles de su equivalente de origen natural por que la concentración o número de moléculas por volumen en general es mayor que el de su equivalente de origen natural. En general, un polipéptido preparado por medios recombinante y expresado en una célula hospedadora se considera "aislado".

Un polinucleótido o ácido nucleico codificante de polipéptido u otro ácido nucleico codificante de polipéptido "aislado" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está habitualmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico codificante de polipéptido. Una molécula de ácido nucleico codificante de polipéptido aislada es distinta en la forma o entorno en que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico codificantes de polipéptido aisladas, por lo tanto, se distinguen de la molécula de ácido nucleico codificante de polipéptido específica ya que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico codificante de polipéptido aislada incluye moléculas de ácido nucleico codificantes de polipéptido contenidas en células que expresan normalmente el polipéptido donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en un cromosoma o ubicación extracromosómica diferente de la de células naturales.

Una proteína "quimérica" contiene al menos un polipéptido de fusión que comprende al menos una región en una posición diferente en la secuencia que la que se produce en la naturaleza. Las regiones normalmente pueden existir en proteínas diferentes y se ponen juntas en el polipéptido de fusión; o normalmente pueden existir en la misma proteína, pero se colocan en una nueva disposición en el polipéptido de fusión. Una proteína quimérica puede crearse, por ejemplo, por síntesis química o creando y traduciendo un polinucleótido en que las regiones peptídicas estén codificadas en la relación deseada.

"Conjugado", "unido", "fusionado" y "fusión" se usan indistintamente en la presente memoria. Estos términos se refieren a la unión conjunta de dos o más elementos químicos, secuencias o componentes, sea cual sea el medio incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. En general, "unido de forma funcional" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y están en la misma fase de lectura o en el marco. Una "fusión en el marco" se refiere a la unión de dos o más marcos abiertos de lectura (ORF) para formar un ORF más largo continuo, de una manera que mantiene el marco de lectura correcto de los ORF originales. Por tanto, la proteína de fusión recombinante resultante es una única proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (que son segmentos que no están normalmente así unidos en la naturaleza).

En el contexto de polipéptidos, una "secuencia lineal" o una "secuencia" es un orden de aminoácidos en un polipéptido en una dirección del extremo amino al extremo carboxilo en que los residuos que están cercanos a otros en la secuencia están contiguos en la estructura primaria del polipéptido. Una "secuencia parcial" es una secuencia lineal de parte de un polipéptido que se sabe que comprende residuos adicionales en una o ambas direcciones.

"Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta del resto de la entidad con la que se compara. Por ejemplo, una secuencia rica en glicina retirada de su secuencia codificante nativa y unida de forma funcional a una secuencia codificante distinta de la secuencia nativa es una secuencia rica en glicina heteróloga. El término "heterólogo" como se aplica a un polinucleótido, un polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido se obtiene de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se compara.

Los términos "polinucleótidos", "ácidos nucleicos", "nucleótidos" y oligonucleótidos" se usan indistintamente. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones

codificantes o no codificantes de un gen o fragmento génico, locus definidos a partir de análisis de ligamiento, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN transferente, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos nucleotídicos. Si están presentes, las modificaciones a la estructura de nucleótidos pueden conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente marcador.

La expresión "complemento de un polinucleótido" indica una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de bases complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de referencia, de modo que pueda hibridar con una secuencia de referencia con fidelidad completa.

"Recombinante", como se aplica a un polinucleótido, significa que el polinucleótido es el producto de diversas combinaciones de etapas de clonación, restricción y/o ligamiento *in vitro,* y otros procedimientos que producen en una construcción que puede expresarse potencialmente como una proteína recombinante en una célula hospedadora.

Los términos "gen" y "fragmento génico" se usan indistintamente en la presente memoria. Se refieren a un polinucleótido que contiene al menos un marco abierto de lectura que puede codificar una proteína particular después de transcribirse y traducirse. Un gen o fragmento génico puede ser ADN genómico o ADNc, siempre que el polinucleótido contenga al menos un marco abierto de lectura, que puede cubrir la región codificante completa o un segmento de la misma. Un "gen de fusión" es un gen compuesto de al menos dos polinucleótidos heterólogos que se unen juntos.

"Homología" u "homólogo" o "identidad de secuencia" se refiere a similitud de secuencia o capacidad de intercambio entre dos o más secuencias polinucleotídicas o entre dos o más secuencias polipeptídicas. Cuando se usa un programa tal como BestFit para determinar la identidad de secuencia, similitud u homología entre dos secuencias de aminoácidos diferentes, pueden usarse los ajustes por defecto, o puede seleccionarse una matriz de puntuación apropiada tal como blosum45 o blosum80 para optimizar las puntuaciones de identidad, similitud u homología. Preferiblemente, los polinucleótidos que son homólogos son aquellos que hibridan en condiciones rigurosas como se define en la presente memoria y tienen al menos un 70 %, preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente un 95 %, más preferiblemente un 97 %, más preferiblemente un 98 % e incluso más preferiblemente un 99 % de identidad de secuencia en comparación con esas secuencias. Los polipéptidos que son homólogos preferiblemente tienen identidades de secuencias que son al menos un 70 %, preferiblemente al menos un 80 %, incluso más preferiblemente al menos un 90 %, incluso más preferiblemente al menos un 95-99 % y mucho más preferiblemente un 100 % idénticas.

"Ligamiento" se refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico o genes, uniéndolos conjuntamente. Para ligar los fragmentos de ADN o genes conjuntamente, los extremos del ADN deben ser compatibles entre sí. En algunos casos, los extremos serán directamente compatibles después de digestión con endonucleasa. Sin embargo, puede ser necesario convertir en primer lugar los extremos escalonados habitualmente producidos después de digestión con endonucleasa en extremos romos para hacerlos compatibles para el ligamiento.

Las expresiones "condiciones rigurosas" o "condiciones rigurosas de hibridación" incluyen referencias a condiciones en que un polinucleótido hibridará con su secuencia diana, a un grado detectablemente mayor que otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces por encima del fondo). En general, la rigurosidad de hibridación se expresa, en parte, con referencia a la temperatura y concentración salina en que se realiza la etapa de lavado. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en que la concentración salina es menor de aproximadamente 1,5 M de iones Na, típicamente aproximadamente de 0,01 a 1,0 M de concentración de iones Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para polinucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para polinucleótidos largos (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos), por ejemplo, "condiciones rigurosas" pueden incluir hibridación en formamida al 50 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C y tres lavados durante 15 minutos cada uno en SSC 0,1x/SDS al 1 % a 60 °C, a 65 °C. Como alternativa, pueden usarse temperaturas de aproximadamente 65 °C, 60 °C, 55 °C o 42 °C. La concentración de SSC puede variarse de aproximadamente 0,1 a 2x de SSC, estando SDS presente a aproximadamente un 0,1 %. Dichas temperaturas de lavado típicamente se seleccionan para que sean de aproximadamente 5 °C a 20 °C inferiores al punto de fusión térmica para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La Tm es la temperatura (en fuerza iónica y pH definidos) a la que un 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente acoplada. Una ecuación para calcular la Tm y las condiciones para la hibridación de ácidos nucleicos son bien conocidos y pueden encontrarse en Sambrook, J. *et al*., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3.ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Típicamente, se usan reactivos de bloqueo para bloquear la hibridación no específica. Dichos reactivos de bloqueo incluyen, por ejemplo, ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado a aproximadamente 100-200 µg/ml. También puede usarse disolvente orgánico tal como formamida a una concentración de aproximadamente un 35-50 % v/v en circunstancias particulares, tales como para hibridaciones de ARN:ADN. Serán muy evidentes para los expertos en la materia variaciones útiles sobre estas condiciones de lavado.

Las expresiones "porcentaje de identidad", "porcentaje de identidad de secuencia" y "% de identidad", aplicadas a secuencias polinucleotídicas, se refieren al porcentaje de acoplamiento de residuos entre al menos dos secuencias polinucleotídicas alineadas usando un algoritmo normalizado. Dicho algoritmo puede insertar, de una manera normalizada y reproducible, huecos en las secuencias que se están comparando para optimizar la alineación entre dos secuencias y, por lo tanto, conseguir una comparación más significativa de las dos secuencias. El porcentaje de identidad puede medirse sobre la longitud de una secuencia polinucleotídica definida completa, o puede medirse sobre una longitud más corta, por ejemplo, sobre la longitud de un fragmento tomado de una secuencia polinucleotídica definida más larga, por ejemplo, un fragmento de al menos 45, al menos 60, al menos 90, al menos 120, al menos 150, al menos 210 o al menos 450 residuos contiguos. Dichas longitudes son únicamente ejemplares, y se entiende que puede usarse cualquier longitud de fragmento respaldada por las secuencias mostradas en la presente memoria, en las tablas, figuras o lista de secuencias, para describir una longitud sobre la que puede medirse el porcentaje de identidad. El porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones acopladas (en que aparecen residuos idénticos en ambas secuencias polipeptídicas), dividiendo el número de posiciones acopladas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Cuando se tienen que comparar secuencias de diferente longitud, la secuencia más corta define la longitud de la ventana de comparación. Las sustituciones conservativas no se consideran cuando se calcula la identidad de secuencia.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a las secuencias polipeptídicas identificadas en la presente memoria se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en una secuencia de consulta que son idénticos a los residuos aminoacídicos de una segunda secuencia polipeptídica de referencia o una parte de la misma, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que están dentro de las habilidades de la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible al público tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir una alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. El porcentaje de identidad puede medirse sobre la longitud de una secuencia polipeptídica definida completa o puede medirse sobre una longitud más corta, por ejemplo, sobre la longitud de un fragmento tomado de una secuencia polipeptídica definida más grande, por ejemplo, un fragmento de al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 70 o al menos 150 residuos contiguos. Dichas longitudes son únicamente ejemplares, y se entiende que puede usarse cualquier longitud de fragmento respaldada por las secuencias mostradas en la presente memoria, en las tablas, figuras o lista de secuencias, para describir una longitud sobre la que puede medirse el porcentaje de identidad.

La expresión "sin repetitividad", como se usa en la presente memoria en el contexto de un polipéptido, se refiere a una ausencia o grado limitado de homología interna en una secuencia peptídica o polipeptídica. La expresión "sustancialmente no repetitivo" puede significar, por ejemplo, que hay unos pocos o ningún caso de cuatro aminoácidos contiguos en la secuencia que sean tipos de aminoácidos idénticos o que el polipéptido tiene una puntuación de subsecuencia (definida *infra*) de 10 o menos o que no hay un patrón en el orden, del extremo N al C, de los motivos de secuencia que constituyen la secuencia polipeptídica. El término "repetitividad", como se usa en la presente memoria en el contexto de un polipéptido, se refiere al grado de homología interna en una secuencia peptídica o polipeptídica. Por el contrario, una secuencia "repetitiva" puede contener múltiples copias idénticas de secuencias de aminoácidos cortas. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica de interés puede dividirse en secuencias de n monómeros y puede contarse el número de secuencias idénticas. Las secuencias altamente repetitivas contienen una gran fracción de secuencias idénticas mientras que las secuencias no repetitivas contienen pocas secuencias idénticas. En el contexto de un polipéptido, una secuencia puede contener múltiples copias de secuencias más cortas de longitud definida o variable, o motivos, en que los propios motivos tienen secuencias no repetitivas, haciendo que el polipéptido de longitud completa sea sustancialmente no repetitivo. La longitud del polipéptido dentro del que se mide la ausencia de repetitividad puede variar de 3 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 50 aminoácidos o de aproximadamente 9 a aproximadamente 14 aminoácidos. "Repetitividad", usada en el contexto de secuencias polinucleotídicas, se refiere al grado de homología interna en la secuencia tal como, por ejemplo, la frecuencia de secuencias de nucleótidos idénticas de una longitud dada. La repetitividad puede medirse, por ejemplo, analizando la frecuencia de secuencias idénticas.

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, preferiblemente de autorreplicación en un hospedador apropiado, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células hospedadoras. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula, la replicación de vectores que funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriores. Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula hospedadora apropiada, puede transcribirse y traducirse en uno o más polipéptidos. Un "sistema de expresión" habitualmente indica una célula

hospedadora adecuada compuesta de un vector de expresión que puede funcionar produciendo un producto de expresión deseado.

"Resistencia de degradación en suero", aplicada a un polipéptido, se refiere a la capacidad de los polipéptidos de resistir la degradación en sangre o componentes de la misma, que típicamente implica proteasas en el suero o plasma. La resistencia a la degradación en suero puede medirse combinando la proteína con suero o plasma humano (o de ratón, rata, mono, según lo apropiado), típicamente durante un intervalo de días (por ejemplo, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 días) típicamente a aproximadamente 37 °C. Las muestras para estos puntos temporales pueden procesarse en un ensayo de transferencia de Western y la proteína se detecta con un anticuerpo. El anticuerpo puede estar en una marca en la proteína. Si la proteína muestra una única banda en la transferencia de Western, donde el tamaño de la proteína es idéntico al de la proteína inyectada, entonces no se ha producido degradación. En este método ejemplar, el punto temporal donde un 50 % de la proteína está degradada, valorado por transferencias de Western o técnicas equivalentes, es la semivida de degradación en suero o "semivida en suero" de la proteína.

El término "$t_{1/2}$" como se usa en la presente memoria, significa la semivida terminal calculada como $\ln(2)/K_{el}$. K_{el} es la constante de la velocidad de eliminación terminal calculada por regresión lineal de la parte lineal terminal de la curva del logaritmo de concentración frente al tiempo. La semivida típicamente se refiere al tiempo requerido para que la mitad de la cantidad de una sustancia administrada depositada en un organismo vivo se metabolice o elimine por procesos biológicos normales. Las expresiones "$t_{1/2}$", "semivida terminal", "semivida de eliminación" y "semivida en circulación" se usan indistintamente en la presente memoria.

"Eliminación activa" significa los mecanismos por los que una proteína se elimina de la circulación distintos de filtración o coagulación, y que incluye la eliminación de la circulación mediada por células, receptores, metabolismo o degradación de la proteína.

"Factor de peso molecular aparente" y "peso molecular aparente" son términos relacionados que se refieren a una medida del aumento o disminución relativo en el peso molecular aparente mostrado por una secuencia de aminoácidos particular. El peso molecular aparente se determina usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o métodos similares comparando los patrones de proteínas globulares y se mide en unidades de "kDa aparente". El factor de peso molecular aparente es la relación entre el peso molecular aparente y el peso molecular real; el último se predice añadiendo, basándose en la composición de aminoácidos, el peso molecular calculado de cada tipo de aminoácido en la composición o mediante estimación de comparación con patrones de peso molecular en un gel de electroforesis de SDS.

Las expresiones "radio hidrodinámico" o "radio de Stokes" es el radio eficaz (R_h en nm) de una molécula en una disolución, medida suponiendo que es un cuerpo que se mueve a través de la disolución y se resiste por la viscosidad de la disolución. En los aspectos de la enseñanza, las mediciones del radio hidrodinámico de las proteínas de fusión de XTEN se correlacionan con el "factor de peso molecular aparente" que es una medida más intuitiva. El "radio hidrodinámico" de una proteína afecta a su tasa de difusión en disolución acuosa, así como a su capacidad de migrar en geles de macromoléculas. El radio hidrodinámico de una proteína se determina por su peso molecular, así como por su estructura, incluyendo la forma y la compactación. Los métodos para determinar el radio hidrodinámico son bien conocidos en la técnica, tal como mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 6406632 y 7294513. La mayoría de las proteínas tienen estructura globular, que es la estructura tridimensional más compacta que una proteína puede tener con el radio hidrodinámico más pequeño. Algunas proteínas adoptan una conformación aleatoria y abierta, no estructurada o "lineal" y como resultado tienen un radio hidrodinámico mucho más grande en comparación con proteínas globulares típicas de peso molecular similar.

"Condiciones fisiológicas" se refiere a un conjunto de condiciones en un hospedador vivo, así como condiciones *in vitro,* incluyendo la temperatura, concentración salina, pH, que imitan esas condiciones de un sujeto vivo. Se ha establecido un hospedador de condiciones fisiológicamente pertinentes para su uso en ensayos *in vitro.* En general, un tampón fisiológico contiene una concentración fisiológica de sal y se ajusta hasta un pH neutro que varía de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8 y preferiblemente de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5. Se enumera una diversidad de tampones fisiológicos en Sambrook *et al.* (2001). La temperatura fisiológicamente pertinente varía de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 38 °C y preferiblemente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 37 °C.

Un "grupo reactivo" es una estructura química que puede acoplarse a un segundo grupo reactivo. Ejemplos de grupos reactivos son grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo, grupos aldehído, grupos azida. Algunos grupos reactivos pueden activarse para facilitar el acoplamiento con un segundo grupo reactivo. Ejemplos no limitantes para la activación son la reacción de un grupo carboxilo con carbodiimida, la conversión de un grupo carboxilo en un éster activado o la conversión de un grupo carboxilo en una función azida.

"Agente de liberación controlada", "agente de liberación lenta", "formulación de depósito" y "agente de liberación mantenida" se usan indistintamente para hacer referencia a un agente que puede prolongar la duración de la liberación

de un polipéptido de la enseñanza con respecto a la duración de la liberación cuando el polipéptido se administra en ausencia de agente. Diferentes aspectos de la presente enseñanza pueden tener diferentes tasas de liberación, produciendo cantidades terapéuticas diferentes.

Las expresiones "antígeno", "antígeno diana" e "inmunógeno" se usan indistintamente en la presente memoria para hacer referencia a la estructura o determinante de unión al que un fragmento de anticuerpo o agente terapéutico basado en fragmento de anticuerpo se une o por el que tiene especificidad.

El término "carga", como se usa en la presente memoria, se refiere a una proteína o secuencia peptídica que tiene actividad biológica o terapéutica; el equivalente al farmacóforo de moléculas pequeñas. Ejemplos de cargas incluyen, aunque sin limitación, factores de coagulación, citocinas, enzimas, hormonas y factores sanguíneos y de crecimiento.

El término "antagonista", como se usa en la presente memoria, incluye cualquier molécula que bloquee parcial o completamente, inhiba o neutralice una actividad biológica de un polipéptido nativo divulgado en la presente memoria. Los métodos para identificar antagonistas de un polipéptido pueden comprender poner en contacto un polipéptido nativo con una molécula antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido nativo. En el contexto de la presente enseñanza, los antagonistas pueden incluir proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, anticuerpos o cualquier otra molécula que disminuya el efecto de una proteína biológicamente activa.

El término "agonista", se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido nativo divulgado en la presente memoria. Las moléculas agonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos agonistas o fragmentos de anticuerpo, fragmentos a variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos nativos, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Los métodos para identificar agonistas de un polipéptido nativo pueden comprender poner en contacto un polipéptido nativo con una molécula agonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido nativo.

Como se usa en la presente memoria "tratar o "tratamiento", o "paliar" o "mejorar" se usan indistintamente y significan administrar un fármaco o un agente biológico para conseguir un beneficio terapéutico, para curar o reducir la gravedad de una afección existente, o para conseguir un beneficio profiláctico, prevenir o reducir la probabilidad de aparición o la gravedad de la aparición de una afección. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o mejora de la afección subyacente que se está tratando o uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con la afección subyacente de modo que se observe una mejora en el sujeto, a pesar de que el sujeto aún puede estar afectado por la afección subyacente.

Un "efecto terapéutico" o "beneficio terapéutico", como se usa en la presente memoria, se refiere a un efecto fisiológico, incluyendo, aunque sin limitación, la mitigación, mejora o prevención de una enfermedad en seres humanos u otros animales, o para potenciar de otro modo el bienestar físico o mental de seres humanos o animales, como resultado de la administración de una proteína de fusión de la enseñanza distinta de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigénico que está en la proteína biológicamente activa. Para un beneficio profiláctico, las composiciones pueden administrarse a un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad particular, afección o síntoma de la enfermedad (por ejemplo, una hemorragia en un sujeto diagnosticado de hemofilia A) o en un sujeto que presenta uno o más síntomas fisiológicos de una enfermedad, aunque puede no haberse hecho un diagnóstico de esta enfermedad.

Las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz" y "dosis terapéuticamente eficaz", como se usan en la presente memoria, se refieren a una cantidad de un fármaco o una proteína bilógicamente activa, en solitario o como parte de una composición de proteína de fusión, que puede tener cualquier efecto beneficioso detectable sobre cualquier síntoma, aspecto, parámetro medido o característica de un estado patológico o afección cuando se administra en una o dosis repetidas a un sujeto. Dicho efecto no tiene que ser absoluto para ser beneficioso. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz pertenece a las capacidades de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en la presente memoria.

La expresión "pauta posológica terapéuticamente eficaz", como se usa en la presente memoria, se refiere a un programa para administrar consecutivamente múltiples dosis (es decir, al menos dos o más) de una proteína biológicamente activa, en solitario o como parte de una composición de proteína de fusión, en la que las dosis se administran en cantidades terapéuticamente eficaces para provocar un efecto beneficioso mantenido sobre cualquier síntoma, aspecto, parámetro medido o característica de un estado patológico o afección.

I). Técnicas generales

La práctica de la presente enseñanza emplea, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de inmunología, bioquímica, química, biología molecular, microbiología, biología celular, genómica y ADN recombinante, que están dentro de las habilidades de la técnica. Véase, Sambrook, J. *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory

Manual," 3.ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; "Current protocols in molecular biology", F. M. Ausubel, *et al*. eds., 1987; la serie "Methods in Enzymology," Academic Press, San Diego, CA.; "PCR 2: a practical approach", M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds., Oxford University Press, 1995; "Antibodies, a laboratory manual" Harlow, E. y Lane, D. eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; "Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics," 11.ª edición, McGraw-Hill, 2005; y Freshney, R.I., "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique," 4.ª edición, John Wiley & Sons, Somerset, NJ, 2000.

II). Factor de coagulación VIII

La presente enseñanza se refiere, en parte, a composiciones que comprenden factor de coagulación (CF) factor VIII unido a una o más proteínas recombinantes prolongadas (XTEN), produciendo una composición de proteína de fusión de CFXTEN. Como se usa en la presente memoria "CF" se refiere a factor VIII (FVIII) o miméticos, variantes de secuencia y versiones truncadas de FVIII, como se describe a continuación.

"Factor VIII" o "FVIII" o "proteína de FVIII" significa una proteína de factor de coagulación sanguínea y especies (incluyendo proteínas de FVIII humanas, porcinas, caninas, de rata o murinas) y variantes de secuencia de las mismas que incluye, aunque sin limitación, la proteína precursora monocatenaria de 2351 aminoácidos (con un péptido señal hidrófobo de 19 aminoácidos), la proteína de cofactor del factor VIII de 2332 aminoácidos madura de aproximadamente 270-330 kDa con la estructura de dominios A1-A2-B-A3-C1-C2, así como las forma "activa" no enzimática o de cofactor de FVIII (FVIIIa) que es un heterodímero en circulación de dos cadenas que se forma como resultado de la escisión proteolítica después de R1648 de una forma de cadena pesada compuesta de A1-A2-B (en el intervalo de 90-220 kDa) de 1-1648 aminoácidos (numerada con respecto a la forma de FVIII madura) y una cadena ligera A3-C1-C2 de 80 kDa de 1649-2232 aminoácidos, cada una de las cuales se represente esquemáticamente en la FIG. 1. Además, y como se usa en la presente memoria, cada uno de los dominios A1, A2 y A3 abarca regiones espaciadoras ácidas; las regiones ácidas a1, a2 y a3, respectivamente. Por tanto, se entenderá que las construcciones de CFXTEN descritas que tienen los dominios A1, A2, A3 B, C1 y C2 incluyen las regiones ácidas a1, a2 y a3. Como se usa en la presente memoria, factor VIII" o "FVIII" o "polipéptido de FVIII" también incluye formas variantes, incluyendo proteínas con sustituciones, adiciones y/o eliminaciones, siempre que la variante retenga su actividad biológica deseada tal como actividad procoagulante. Se ha construido una miríada de variantes de FVIII funcionales y pueden usarse como proteínas de FVIII recombinantes como se describe en la presente memoria. Véanse las publicaciones PCT n.º WO 2011/069164 A2, WO 2012/006623 A2, WO 2012/006635 A2 o WO 2012/006633 A2. Se conocen muchísimas variantes de FVIII funcionales. Además, se han identificado cientos de mutaciones no funcionales en FVIII en pacientes con hemofilia. Véase, por ejemplo, Cutler *et al*., Hum. Mutat. 19:274-8 (2002). Además, comparaciones entre FVIII de seres humanos y otras especies han identificado residuos conservados que probablemente son necesarios para la función. Véase, por ejemplo, Cameron *et al*., Thromb. Haemost. 79:317-22 (1998) y el documento US 6251632.

En un aspecto, los dominios del factor VIII humano se definen por los siguientes residuos aminoacídicos: A1, residuos Ala1-Arg372; A2, residuos Ser373-Arg740; B, residuos Ser741-Arg1648; A3, residuos Ser1649-Asn2019; C1, residuos Lys2020-Asn2172; C2, residuos Ser2173-Tyr2332. La secuencia A3-C1-C2 incluye los residuos Ser1649-Tyr2332. En otro aspecto, los residuos Arg336-Arg372 se mencionan habitualmente como la región a1, y la Arg372 se escinde por trombina. En determinados aspectos, la región a2 es parte del dominio A1. En otro aspecto, los residuos Glu1649-Arg1689 se mencionan como la región ácida a3. En determinados aspectos, la región ácida a3 es una parte del dominio A3. En otro aspecto, una proteína de FVIII nativa tiene la siguiente fórmula: A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2, donde A1, A2 y A3 son "los dominios A" estructuralmente relacionados, B es "el dominio B", C1 y C2 son "los dominios C" estructuralmente relacionados, y a1, a2 y a3 son regiones espaciadoras ácidas. En la fórmula anterior y con referencia a la posición de la secuencia de aminoácidos primaria en la FIG. 30, el dominio A1 de FVIII humano se extiende desde Ala1 hasta aproximadamente Arg336, la región espaciador se extiende desde aproximadamente Met337 hasta aproximadamente Arg372, el A2 se extiende desde aproximadamente Ser373 hasta aproximadamente Tyr719, la región espaciadora a2 se extiende desde aproximadamente Glu720 hasta aproximadamente Arg740, el dominio B se extiende desde aproximadamente Ser741 hasta aproximadamente Arg1648, la región espaciadora a3 se extiende desde aproximadamente Glu1649 hasta aproximadamente Arg1689, el dominio A3 se extiende desde aproximadamente Ser1690 hasta aproximadamente Asn2019, el dominio C1 se extiende desde aproximadamente Lys2020 hasta aproximadamente Asn2172 y el dominio C2 se extiende desde aproximadamente Ser2173 hasta Tyr2332 (Saenko *et al*., 2005, J Thromb Hemostasis, 1, 922-930). Distintos de los sitios de escisión proteolíticos específicos, la denominación de las ubicaciones de los límites entre los dominios y las regiones de FVIII pueden variar en diferentes referencias de la bibliografía. Los límites indicados en la presente memoria, por lo tanto, se denominan como aproximados mediante el uso del término "aproximadamente".

Dicho factor VIII incluye secuencias truncadas tales como secuencias "BDD" con el dominio B eliminado en que una parte o la mayoría de la secuencia del domino B está eliminada (tales como secuencias BDD divulgadas o remitidas en las patentes de Estados Unidos n.º 6818439 y 7632921. Un ejemplo de un BDD FVIII es REFACTO® o XYNTHA® (BDD FVIII recombinante), que comprende un primer polipéptido que corresponde a los aminoácidos 1 a 743 de la FIG. 30, fusionado a un segundo polipéptido correspondiente a los aminoácidos 1638 a 2332 de la FIG. 30. Construcciones ejemplares de BDD FVIII que pueden usarse para producir proteínas recombinantes de la enseñanza

incluyen, aunque sin limitación, FVIII con una eliminación de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 747-1638 del FVIII humano maduro (FIG. 30) (Hoeben R.C., *et al*. J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990), y FVIII con una eliminación de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 771-1666 o aminoácidos 868-1562 de FVIII humano maduro (FIG. 30) (Meulien P., *et al.* Protein Eng. 2(4): 301-6 (1988).

Además, las secuencias que incluyen inserciones o sustituciones de aminoácidos heterólogos (tales como ácido aspártico sustituido en el lugar de la valina en la posición 75), o FVIII monocatenario (scFVIII) en que las cadenas pesada y ligera están conectadas covalentemente por un conector. Como se usa en la presente memoria, "FVIII" será cualquier forma funcional de la molécula de factor VIII con las características típicas del factor VIII de coagulación sanguínea que puede corregir las deficiencias de factor VIII humano cuando se administra a dicho sujeto, por ejemplo, un sujeto con hemofilia A. FVIII o variantes de secuencia se han aislado, caracterizado y clonado como se describe en la patente de Estados Unidos o las solicitudes n.º 4757006; 4965199; 5004804; 5198349, 5250421; 5919766; 6228620; 6818439; 7138505; 7632921; y 20100081615.

El factor VIII humano está codificado por un gen de una sola copia que reside en la punta del brazo largo del cromosoma X (q28). Comprende casi 186 000 pares de bases (pb) y constituye aproximadamente un 0,1 % del cromosoma X (White, G.C. y Shoemaker, C.B., Blood (1989) 73:1-12). La secuencia de aminoácidos de FVIII humano se dedujo del ADNc como se muestra la patente de Estados Unidos n.º 4965199. El FVIII humano maduro nativo derivado de la secuencia de ADNc (es decir, sin el péptido señal secretor, pero antes de otro procesamiento postraduccional) se presenta como la FIG. 3.

El ADN que codifica el ARNm de factor VIII maduro se encuentra en 26 exones separados que varían en tamaño de 69 a 3106 pb. Las 25 regiones intrónicas intermedias que separan los exones varían en tamaño de 207 a 32 400 pb. El gen completo consiste en aproximadamente 9 kb de exón y 177 kb de intrón. Los tres dominios de repetición A tienen aproximadamente un 30 % de homología de secuencia. El dominio B contiene 19 de los aproximadamente 25 sitios de glucosilación previstos, y se cree que el dominio A3 contiene un sitio de unión para el factor de Von Willebrand. Los dominios C en tándem siguen al dominio A3 y tienen aproximadamente un 37 % de homología entre sí (White, G.C. y Shoemaker, C.B., Blood (1989) 73:1-12).

El dominio B separa los dominios A2 y A3 del factor VIII nativo en la molécula monocatenaria precursora recién sintetizada. Los límites precisos del dominio B se han presentado de forma variada extendiéndose desde los aminoácidos 712 a 1648 de la secuencia precursora (Wood *et al.*, Nature (1984) 312:330-337) o los aminoácidos 741-1648 (Pipe, SW, Haemophilia (2009) 15:1187-1196 y patente de Estados Unidos n.º 7560107) o los aminoácidos 740-1689 (Toole, JJ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:5939-5942). Como se usa en la presente memoria, "dominio B" significa los aminoácidos 741-1648 del factor VIII maduro. Como se usa en la presente memoria, "eliminación del dominio B de FVIII" o "FVIII BDD" significa una secuencia de FVIII con cualquiera, un fragmento de, o todos los aminoácidos 741 a 1648 eliminados. En un aspecto, las variantes de FVIII BDD retienen los aminoácidos remanentes del dominio B del extremo N terminal ("B1" como se usa en la presente memoria) y el extremo C terminal ("B2" como se usa en la presente memoria). En una variante de FVIII BDD, los aminoácidos remanentes del dominio B son SFSQNPPVLKRHQR (SEQ ID NO: 1614). En una variante de FVIII BDD, el B1 remanente es SFS y el B2 remanente es QNPPVLKRHQR (SEQ ID NO: 1615). En otra variante de FVIII BDD, el B1 remanente es SFSQN (SEQ ID NO: 1616) y el B2 remanente es PPVLKRHQR (SEQ ID NO: 1617). Un "factor VIII con el dominio B eliminado", "FVIII BDD" o "BDD FVIII" pueden tener las eliminaciones completas o parciales divulgadas en las patentes de Estados Unidos n.º 6316226, 6346513, 7041635, 5789203, 6060447, 5595886, 6228620, 5972885, 6048720, 5543502, 5610278, 5171844, 5112950, 4868112 y 6458563. En algunos aspectos, una secuencia de factor VIII con el dominio B eliminado de la presente enseñanza comprende una cualquiera de las eliminaciones divulgadas en la col. 4, línea 4 a col. 5 línea 28 y los ejemplos 1-5 de la patente de Estados Unidos n.º 6316266 (también en el documento US 6346513). En otro aspecto, un factor VIII con el dominio B eliminado es el factor VIII con el dominio B eliminado S743/Q1638 (versión SQ de factor VIII) (por ejemplo, factor VIII que tiene una eliminación del aminoácido 744 al aminoácido 1637, por ejemplo, factor VIII que tiene los aminoácidos 1-743 y los aminoácidos 1638-2332 del factor VIII de longitud completa. En algunos aspectos, un factor VIII con el dominio B eliminado de la presente enseñanza tiene una eliminación divulgada en la col. 2, líneas 26-51 y los ejemplos 5-8 de la patente de Estados Unidos n.º 5789203 (también documentos US 6060447, US 5595886 y US 6228620). En algunos aspectos, un factor VIII con el dominio B eliminado tiene una eliminación descrita en la col. 1 línea 25 a col. 2 línea 40 de la patente de Estados Unidos n.º 5972885; col. 6, líneas 1-22 y ejemplo 1 de la patente de Estados Unidos n.º 6048720; col. 2, líneas 17-46 de la patente de Estados Unidos n.º 5543502; col. 4, línea 22 a col. 5, línea 36 de la patente de Estados Unidos n.º 5171844; col. 2, líneas 55-68, figura 2 y ejemplo 1 de la patente de Estados Unidos n.º 5112950; col. 2, línea 2 a col. 19, línea 21 y tabla 2 de la patente de Estados Unidos n.º 4868112; 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 Estados Unidos n.º 7041635; o col. 4, líneas 25-53, de la patente de Estados Unidos n.º 6458563. En algunos aspectos, un factor VIII con el dominio B eliminado tiene una eliminación de la mayor parte del dominio B, pero aún contiene secuencias aminoterminales del dominio B que son esenciales para el procesamiento proteolítico *in vivo* del producto de traducción primario en dos cadenas polipeptídicas, como se divulga en la publicación internacional WO 91/09122. En algunos aspectos, un factor VIII con el dominio B eliminado se construye con una eliminación de los aminoácidos 747-1638, es decir, casi una eliminación completa del dominio B. Hoeben R.C., *et al. J. Biol. Chem*. 265 (13): 7318-7323 (1990). Un factor VIII con el dominio

B eliminado también puede contener una eliminación de los aminoácidos 771-1666 o aminoácidos 868-1562 del factor VIII. Meulien P., *et al. Protein Eng*. 2(4): 301-6 (1988). Eliminaciones del dominio B adicionales que son parte de la enseñanza incluyen: eliminación de los 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 publicada PCT n.º WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, *et al., DNA* (1987) 6:553-564)), 741 a 1648 (Pasek (solicitud PCT n.º 88/00831)), o 816 a 1598 o 741 a 1648 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) n.º 82:16-25, documento EP 295597). Cada una de las eliminaciones anteriores puede hacerse en cualquier secuencia de factor VIII utilizada en los aspectos de la presente enseñanza.

Las proteínas implicadas en la coagulación incluyen factor I, factor II, factor III, factor IV, factor V, factor VI, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, proteína C y factor tisular (colectiva o individualmente "una o más proteínas de coagulación"). La interacción de las proteínas de coagulación principales en las vías de coagulación intrínseca y extrínseca se muestra en la FIG. 2. La mayoría de las proteínas de coagulación están presentes en forma de zimógeno, pero cuando se activan, muestran una actividad de proteasa procoagulante en que activan otras de las proteínas coagulantes, contribuyendo a la vía de coagulación intrínseca o extrínseca y la formación del coágulo. La vía intrínseca de la cascada de coagulación, FVIII se asocia con un complejo de factor IX activado, factor X, calcio y fosfolípido. El heterodímero de factor VIII no tiene actividad enzimática, pero el heterodímero llega a ser activo como un cofactor de la enzima facto IXa después de la activación proteolítica por trombina o factor Xa, con la actividad del factor VIIIa caracterizada por su capacidad de formar un sitio de unión a membrana para los factores IXa y X en una conformación adecuada para la activación del factor X por el factor IXa. Tras la escisión por trombina, FVIII activado (FVIIIa) se disocia del factor de Von Willebrand y se une al fosfolípido cargado negativamente PL, y el complejo resultante participa como cofactor para el factor IXa en el complejo de activación de factor X (tenase). Dentro del domino C2 y los residuos aminoacídicos 1649 a 1689 en el dominio A3 están los sitios de unión al factor de Von Willebrand (vWF) que actúan para formar complejos con el factor de Von Willebrand, el complejo en circulación resultante protege FVIII de la rápida degradación en la sangre (Weiss HJ, *et al*. Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. J Clin Invest (1977) 60:390).

El factor VIII activado es un heterotrímero compuesto del compuesto A1 y el dominio A2 y la cadena ligera que incluye los dominios A3-C1-C2. La activación del factor IX se consigue por una eliminación de dos etapas del péptido de activación (Ala 146-Arg 180) de la molécula (Bajaj *et al*., Human factor IX and factor IXa, in METHODS IN ENZYMOLOGY. 1993). La primera escisión se hace en el sitio de Arg 145-Ala 146 por el factor XIa o el factor VIIa/factor tisular. La segunda escisión, y limitante de la velocidad se hace en Arg 180-Val 181. La activación elimina 35 residuos. El factor IX humano activado sale como un heterodímero de la cadena pesada C terminal (28 kDa) y una cadena ligera N terminal (18 kDa), que se mantienen juntas por un puente disulfuro que adhiere la enzima al dominio Gla. El factor IXa, a su vez, activa el factor X en concierto con el factor VIII activado. Como alternativa, los factores IX y X pueden activarse ambos por el factor VIIa en complejo con factor tisular lipidado, generado mediante la vía extrínseca. El factor Xa entonces participa en la vía común final por la que la protrombina se convierte en trombina, y la trombina, a su vez, convierte el fibrinógeno en fibrina para formar el coágulo.

Los defectos en el proceso de coagulación pueden dar lugar a trastornos hemorrágicos (coagulopatías) en que se prolonga el tiempo que tarda en formarse el coágulo. Dichos defectos pueden ser congénitos o adquiridos. Por ejemplo, la hemofilia A y B son enfermedades hereditarias caracterizadas por deficiencias en FVIII y FIX, respectivamente. Indicado de forma diferente, el factor VIII biológicamente activo corrige el defecto de coagulación en el plasma derivado de individuos afectados con hemofilia A. Se ha mostrado que FVIII recombinante es eficaz y se ha aprobado para el tratamiento de hemofilia A en pacientes adultos y pediátricos, y también se usa para detener los episodios hemorrágicos o evitar la hemorragia asociada con traumatismo y/o cirugía. Los usos terapéuticos actuales del factor VIII pueden ser problemáticos en el tratamiento de individuos que muestran una deficiencia de factor VIII, así como aquellos individuos con enfermedad de Von Willebrand. Además, los individuos que reciben factor VIII en tratamiento de remplazo frecuentemente desarrollan anticuerpos contra estas proteínas que a menudo reducen o eliminan la actividad procoagulante del FVIII unido. El tratamiento continuado es extremadamente difícil a causa de la presencia de estos anticuerpos que reducen o anulan la eficacia del tratamiento.

En un aspecto, la enseñanza contempla la inclusión de secuencias de FVIII en las composiciones de proteína de fusión CFXTEN que son idénticas a FVIII humano, secuencias que tienen homología a las secuencias de FVIII, secuencias que son naturales, tales como de seres humanos, primates no humanos, mamíferos (incluyendo animales domésticos) o versiones truncadas de FVIII; todos ellos retienen al menos una parte de la actividad procoagulante del FVIII nativo y que son útiles para prevenir, tratar, mediar o mejorar la hemofilia A o episodios hemorrágicos relacionados con traumatismo, cirugía o deficiencia de factor VIII de coagulación. Las secuencias con homología con FVIII pueden encontrarse por técnicas convencionales de búsqueda de homología tales como NCBI BLAST, o en bases de datos públicas tales como Chemical Abstracts Services Databases (por ejemplo, el Registro CAS), GenBank, The Universal Protein Resource (UniProt) y bases de datos proporcionadas por suscripción tales como GenSeq (por ejemplo, Derwent).

En un aspecto, el FVIII incorporado de las presentes composiciones de CFXTEN es un polipéptido recombinante con una secuencia correspondiente a una proteína de FVIII encontrada en la naturaleza. En otro aspecto, el FVIII es una variante de secuencia de FVIII no natural, fragmento, homólogo o un mimético de una secuencia natural que retiene al menos una parte de la actividad procoagulante del FVIII nativo correspondiente. En otro aspecto, el FVIII es una variante truncada con la totalidad o una parte del dominio B eliminado ("FVIII BDD"), que puede estar en forma heterodimérica o puede permanecer como una sola cadena ("scFVIII"), describiéndose el último en Meulien *et al*., Protein Eng. (1988) 2(4):301-306. Ejemplos no limitantes de FVIII BDD son secuencias de factor VIII en que los aminoácidos se eliminan entre el número de residuo 741 y el número de residuo 1640 (numerados con respecto a FVIII maduro nativo) o entre el número de residuo 745 y el número de residuo 1640, o entre el número de residuo 745 y el número de residuo 1640, o entre el número de residuo 741 y el número de residuo 1690, o entre el número de residuo 745 y el número de residuo 1667, o entre el número de residuo 745 y el número de residuo 1657, o entre el número de residuo 747 y el número de residuo 1642, o entre el número de residuo 751 y el número de residuo 1667.

En otro aspecto, se incorporan secuencias heterólogas en el FVIII, que puede incluir XTEN, como se describe más completamente a continuación. La tabla 1 proporciona una lista no limitante de secuencias de aminoácidos de FVIII que están englobadas por las proteínas de fusión de CFXTEN de la enseñanza. En algunos aspectos, el FVIII incorporado en las proteínas de fusión de CFXTEN incluye proteínas que tienen al menos aproximadamente un 70 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de aminoácidos de longitud comparable seleccionada de la tabla 1.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de FVIII

Nombre (fuente)	**Secuencia de aminoácidos**	SEQ ID NO:
Polipéptido precursor de FVIII (humano)	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPK SFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKEN GPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLF AVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLL FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNG PQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASR PYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPR CLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENR SWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWY ILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHN SDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPS TRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLS DLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNE KLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQL DTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLF KGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVW QNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKE GPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSV EGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEK KIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVL QDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQ QNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNE KEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPA ASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTY KKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQ GTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWK SQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCS QNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQK KTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPL YRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPR KNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLL VCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPT FKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVR KKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNK CQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDL LAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVD SSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDA QITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVT GVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVN SLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	1

Nombre (fuente)	**Secuencia de aminoácidos**	SEQ ID NO:
FVIII maduro (humano)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD PWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAID SNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSST SNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSL SEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFK VSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDR MLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFL PESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEF TKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLP QIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTA HFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPL EETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHS IPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQG AKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKV ELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFL RVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLN ACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSD QEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSS SPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHH MAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEF ALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGL VMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETV EMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASG QYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSL YISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHP THYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKA RLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEF LISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVH QIALRMEVLGCEAQDLY	2

Nombre (fuente)	**Secuencia de aminoácidos**	SEQ ID NO:
FVIII (canino)	MQVELYTCCFLCLLPFSLSATRKYYLGAVELSWDYMQSDLLSALHADTSFSSRVP GSLPLTTSVTYRKTVFVEFTDDLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVIVLKN MASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYEDQTSQKEKEDDNVIPGESHTYVWQVLKE NGPMASDPPCLTYSYFSHVDLVKDLNSGLIGALLVCKEGSLAKERTQTLQEFVLL FAVFDEGKSWHSETNASLTQAEAQHELHTINGYVNRSLPGLTVCHKRSVYWHVI GMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTFLMDLGQFLLFCHISSH QHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEDKDYDDGLYDSDMDVVSFDDDSSSPFI QIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPSGPTPNDRSHKNLYLNNGPQRIGKKY KKVRFVAYTDETFKTREAIQYESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGI NYVTPLHTGRLPKGVKHLKDMPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSS FINLERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQMMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTEN MQRFLPNADVVQPHDPEFQLSNIMHSINGYVFDNLQLSVCLHEVAYWYILSVGA QTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWVLGCHNSDFR NRGMTALLKVSSCNRNIDDYYEDTYEDIPTPLLNENNVIKPRSFSQNSRHPSTKEK QLKATTTPENDIEKIDLQSGERTQLIKAQSVSSSDLLMLLGQNPTPRGLFLSDLREA TDRADDHSRGAIERNKGPPEVASLRPELRHSEDREFTPEPELQLRLNENLGTNTTV ELKKLDLKISSSSDSLMTSPTIPSDKLAAATEKTGSLGPPNMSVHFNSHLGTIVFGN NSSHLIQSGVPLELSEEDNDSKLLEAPLMNIQESSLRENVLSMESNRLFKEERIRGP ASLIKDNALFKVNISSVKTNRAPVNLTTNRKTRVAIPTLLIENSTSVWQDIMLERN TEFKEVTSLIHNETFMDRNTTALGLNHVSNKTTLSKNVEMAHQKKEDPVPLRAE NPDLSSSKIPFLPDWIKTHGKNSLSSEQRPSPKQLTSLGSEKSVKDQNFLSEEKVVV GEDEFTKDTELQEIFPNNKSIFFANLANVQENDTYNQEKKSPEEIERKEKLTQENV ALPQAHTMIGTKNFLKNLFLLSTKQNVAGLEEQPYTPILQDTRSLNDSPHSEGIHM ANFSKIREEANLEGLGNQTNQMVERFPSTTRMSSNASQHVITQRGKRSLKQPRLS QGEIKFERKVIANDTSTQWSKNMNYLAQGTLTQIEYNEKEKRAITQSPLSDCSMR NHVTIQMNDSALPVAKESASPSVRHTDLTKIPSQHNSSHLPASACNYTFRERTSGV QEGSHFLQEAKRNNLSLAFVTLGITEGQGKFSSLGKSATNQPMYKKLENTVLLQP GLSETSDKVELLSQVHVDQEDSFPTKTSNDSPGHLDLMGKIFLQKTQGPVKMNK TNSPGKVPFLKWATESSEKIPSKLLGVLAWDNHYDTQIPSEEWKSQKKSQTNTAF KRKDTILPLGPCENNDSTAAINEGQDKPQREAMWAKQGEPGRLCSQNPPVSKHH QREITVTTLQPEEDKFEYDDTFSIEMKREDFDIYGDYENQGLRSFQKKTRHYFIAA VERLWDYGMSRSPHILRNRAQSGDVQQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL GLLGPYIRAEVEDNIVVTFKNQASRPYSFYSSLISYDEDEGQGAEPRRKFVNPNET KIYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLICRSNTLNPA HGRQVTVQEFALVFTIFDETKSWYFTENLERNCRAPCNVQKEDPTLKENFRFHAI NGYVKDTLPGLVMAQDQKVRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMA VYNLYPGVFETVEMLPSQVGIWRIECLIGEHLQAGMSTLFLVYSKKCQTPLGMAS GHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKDPFSWIKVDLLAPMIIHGI MTQGARQKFSSLYVSQFIIMYSLDGNKWHSYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIAQYIRLHPTHYSIRSTLRMELLGCDFNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYLS SMLATWSPSQARLHLQGRTNAWRPQANNPKEWLQVDFRKTMKVTGITTQGVKS LLISMYVKEFLISSSQDGHNWTLFLQNGKVKVFQGNRDSSTPVRNRLEPPLVARY VR LHPQSWAHHIALRLEVLGCDTQQPA	3
FVIII (de cerdo)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL	4

Nombre (fuente)	**Secuencia de aminoácidos**	SEQ ID NO:
	IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD PWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAID SNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSST SNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSL SEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFK VSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDR MLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFL PESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEF TKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLP QIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTA HFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPL EETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHS IPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQG AKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKV ELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFL RVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLN ACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSD QEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSS SPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHH MAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEF ALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGL VMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETV EMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASG QYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSL YISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHP THYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKA RLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEF LISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVH QIALRMEVLGCEAQDLY	
FVIII (de ratón)	AIRRYYLGAVELSWNYIQSDLLSVLHTDSRFLPRMSTSFPFNTSIMYKKTVFVEYK DQLFNIAKPRPPWMGLLGPTIWTEVHDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGDEYEDQTSQMEKEDDKVFPGESHTYVWQVLKENGPMASDPPCLTYSYMSHV DLVKDLNSGLIGALLVCKEGSLSKERTQMLYQFVLLFAVFDEGKSWHSETNDSY TQSMDSASARDWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEIHSIF LEGHTFFVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLIDLGQFLLFCHISSHKHDGMEAYVKV DSCPEESQWQKKNNNEEMEDYDDDLYSEMDMFTLDYDSSPFIQIRSVAKKYPKT WIHYISAEEEDWDYAPSVPTSDNGSYKSQYLSNGPHRIGRKYKKVRFIAYTDETF KTRETIQHESGLLGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVSPLHARRLPR GIKHVKDLPIHPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFINPERDLASGLIGP LLICYKESVDQRGNQMMSDKRNVILFSIFDENQSWYITENMQRFLPNAAKTQPQD PGFQASNIMHSINGYVFDSLELTVCLHEVAYWHILSVGAQTDFLSIFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWVLGCHNSDFRKRGMTALLKVSSCDKST SDYYEEIYEDIPTQLVNENNVIDPRSFFQNTNHPNTRKKKFKDSTIPKNDMEKIEPQ FEEIAEMLKVQSVSVSDMLMLLGQSHPTPHGLFLSDGQEAIYEAIHDDHSPNAIDS NEGPSKVTQLRPESHHSEKIVFTPQPGLQLRSNKSLETTIEVKWKKLGLQVSSLPS NLMTTTILSDNLKATFEKTDSSGFPDMPVHSSSKLSTTAFGKKAYSLVGSHVPLN ASEENSDSNILDSTLMYSQESLPRDNILSIENDRLLREKRFHGIALLTKDNTLFKDN VSLMKTNKTYNHSTTNEKLHTESPTSIENSTTDLQDAILKVNSEIQEVTALIHDGT LLGKNSTYLRLNHMLNRTTSTKNKDIFHRKDEDPIPQDEENTIMPFSKMLFLSESS NWFKKTNGNNSLNSEQEHSPKQLVYLMFKKYVKNQSFLSEKNKVTVEQDGFTK NIGLKDMAFPHNMSIFLTTLSNVHENGRHNQEKNIQEEIEKEALIEEKVVLPQVHE ATGSKNFLKDILILGTRQNISLYEVHVPVLQNITSINNSTNTVQIHMEHFFKRRKDK ETNSEGLVNKTREMVKNYPSQKNITTQRSKRALGQFRLSTQWLKTINCSTQCIIKQ IDHSKEMKKFITKSSLSDSSVIKSTTQTNSSDSHIVKTSAFPPIDLKRSPFQNKFSHV QASSYIYDFKTKSSRIQESNNFLKETKINNPSLAILPWNMFIDQGKFTSPGKSNTNS VTYKKRENIIFLKPTLPEESGKIELLPQVSIQEEEILPTETSHGSPGHLNLMKEVFLQ	5

Nombre (fuente)	**Secuencia de aminoácidos**	SEQ ID NO:
	KIQGPTKWNKAKRHGESIKGKTESSKNTRSKLLNHHAWDYHYAAQIPKDMWKS KEKSPEIISIKQEDTILSLRPHGNSHSIGANEKQNWPQRETTWVKQGQTQRTCSQIP PVLKRHQRELSAFQSEQEATDYDDAITIETIEDFDIYSEDIKQGPRSFQQKTRHYFI AAVERLWDYGMSTSHVLRNRYQSDNVPQFKKVVFQEFTDGSFSQPLYRGELNEH LGLLGPYIRAEVEDNIMVTFKNQASRPYSFYSSLISYKEDQRGEEPRRNFVKPNET KIYFWKVQHHMAPTEDEFDCKAWAYFSDVDLERDMHSGLIGPLLICHANTLNPA HGRQVSVQEFALLFTIFDETKSWYFTENVKRNCKTPCNFQMEDPTLKENYRFHAI NGYVMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGNNENIQSIHFSGHVFTVRKKEEYKMA VYNLYPGVFETLEMIPSRAGIWRVECLIGEHLQAGMSTLFLVYSKQCQIPLGMAS GSIRDFQITASGHYGQWAPNLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIVHGIK TQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWLSYQGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNSF NPPIIARYIRLHPTHSSIRSTLRMELMGCDLNSCSIPLGMESKVISDTQITASSYFTN MFATWSPSQARLHLQGRTNAWRPQVNDPKQWLQVDLQKTMKVTGIITQGVKSL FTSMFVKEFLISSSQDGHHWTQILYNGKVKVFQGNQDSSTPMMNSLDPPLLTRYL RIHPQIWEHQIALRLEILGCEAQQQY	6
Variante de FVIII BDD (patente de Estados Unidos n.º 7632921, SEQ ID NO: 3)	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPK SFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKEN GPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLF AVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLL FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNG PQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASR PYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPR CLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENR SWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWY ILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHN SDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYF IAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNE HLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPN ETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTL NPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRF HAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG MASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMII HGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIK HNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPL LTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	

Nombre (fuente)	**Secuencia de aminoácidos**	SEQ ID NO:
FVIII BDD-2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT VHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDY DDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKD EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSK AGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQ GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLY	7
FVIII BDD-3 (G1648)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT VHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQGEITRTTLQSDQEEIDY DDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKD EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSK AGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQ GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLY	8

Nombre (fuente)	**Secuencia de aminoácidos**	SEQ ID NO:
FVIII BDD-4	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT VHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEK TDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSP GAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDF KVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTE SGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLT KDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFK KVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNP DMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSE KNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEK KETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSL NDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVT QRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEK GAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPA ASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTY KKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLL QGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEE WKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRT ERLCSQDPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQ SPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFT DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEED QRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDV HSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAP CNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIH FSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMS TLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKE PFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGT LMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD FQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGN QDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	9
FVIII BDD-5	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT VHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFT DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEED QRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDV HSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAP CNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIH FSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMS TLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKE PFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGT LMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD FQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGN QDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	10

Nombre (fuente)	**Secuencia de aminoácidos**	SEQ ID NO:
FVIII BDD-6	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD TISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNR AQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFR NQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDE TKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQR IRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAG IWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAP KLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMY SLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTL RMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRS NAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEV LGCEAQDLY	11
FVIII BDD-7	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT VHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYG MSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRA EVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQ HHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTV QEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTL PGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVF ETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQIT ASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKF SSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRL HPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVK EFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSW VHQIALRMEVLGCEAQDLY	12

Nombre (fuente)	**Secuencia de aminoácidos**	SEQ ID NO:
Precursor de FVIII BDD-8 (patente de Estados Unidos n.º 6818439 SEQ ID NO: 47)	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPK SFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKEN GPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLF AVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLL FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNG PQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASR PYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPR CLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENR SWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWY ILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHN SDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYF IAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNE HLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPN ETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTL NPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRF HAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG MASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMII HGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIK HNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPL LTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	13
FVIII BDD-9 maduro (patente de Estados Unidos n.º 6818439	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDY DDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKD EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSK AGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQ GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLY	14

Nombre (fuente)	**Secuencia de aminoácidos**	SEQ ID NO:
FVIII BDD-10	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDY DDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKD EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSK AGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQ GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLY	15
FVIII BDD-11	ATRATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLF VEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSY WKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSY LSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETK NSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEV HSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAY VKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKK HPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMA YTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYS RRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDL ASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPA GVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSG YTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVS SCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQ EEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSS PHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVED NIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHM APTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFA LFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLV MAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVE MLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYI SQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTH YSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLIS SSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA LRMEVLGCEAQDLY	16

Nombre (fuente)	**Secuencia de aminoácidos**	SEQ ID NO:
FVIII BDD-12	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDY DDTISVEMKKEDFDIFDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKD EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSK AGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQ GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLY	17
FVIII BDD-13	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDY DDTISVEMKKEDFDIFDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKD EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSK AGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQ GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLY	18

La presente enseñanza también contempla CFXTEN que comprende FVIII con diversas eliminaciones, inserciones y sustituciones de aminoácido hechas en las secuencias de FVIII de la tabla 1 que retienen la actividad procoagulante. Ejemplos de sustituciones conservativas para aminoácidos en secuencias polipeptídicas se muestran en la tabla 2. En

aspectos de la CFXTEN en que la identidad de secuencia del FVIII es menor de un 100 % en comparación con una secuencia específica divulgada en la presente memoria, la enseñanza contempla la sustitución de cualquiera de los otros 19 L-aminoácidos para un residuo de aminoácido dado del FVIII dado, que puede estar en cualquier posición dentro de la secuencia del FVIII, incluyendo residuos aminoacídicos adyacentes. Si una sustitución cualquiera provoca un cambio indeseable en la actividad procoagulante, entonces puede emplearse uno de los aminoácidos alternativos y la proteína de la construcción puede evaluarse por los métodos descritos en la presente memoria (por ejemplo, los ensayos de la tabla 49) o usando cualquiera de la técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5364934 o usando métodos conocidos en general en la técnica. En una sustitución preferida, el componente de FVIII de los aspectos de CFXTEN se modifica remplazando el residuo R1648 (numerado con respecto a la forma madura nativa de FVIII) con glicina o alanina para evitar el procesamiento proteolítico en la forma heterodimérica. En otra sustitución, el componente de FVIII de los aspectos de CFXTEN se modifica remplazando el residuo Y1680 (numerado con respecto a la forma madura nativa de FVIII) con fenilalanina. En otro aspecto, el componente de FVIII de los aspectos de CFXTEN se modifica remplazando el residuo Y1680 (numerado con respecto a la forma madura nativa de FVIII) con fenilalanina y el residuo R1648 (numerado con respecto a la forma madura nativa de FVIII) con glicina o alanina.

En un aspecto, el FVIII de la composición de la proteína de fusión tiene una o más sustituciones de aminoácido diseñadas para reducir la unión de inhibidores de FVIII en epítopos reconocidos por los anticuerpos de la tabla 9 incluyendo, aunque sin limitación, las sustituciones en Lys(377), Lys(466), Lys(380), Ser(488), Arg(489), Arg(490), Leu(491), Lys(493), Lys(496), His(497), Lys(499), Lys(512), Lys(523), Lys(556), Met (2199), Phe(2200), Leu(2252), Val(2223) y Lys(2227). Además, las variantes pueden incluir, por ejemplo, polipéptidos en los que uno o más residuos aminoacídicos se añaden o eliminan en o cerca del extremo N o C de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa o de un dominio de un FVIII, siempre que la variante retenga algo de, si no toda, la actividad procoagulante del péptido nativo. Las secuencias de FVIII resultantes que retienen al menos una parte (por ejemplo, al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % o al menos un 95 % o más) de la actividad procoagulante en comparación con el FVIII en circulación nativo se consideran útiles para las composiciones de proteína de fusión de esta enseñanza. Los ejemplos de variantes de FVIII son conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en las patentes de Estados Unidos y solicitudes n.º 6316226; 6818439; 7632921; 20080227691. En un aspecto, una variante de secuencia de FVIII tiene un ácido aspártico sustituido en el lugar de la valina en la posición del aminoácido 75 (numerada con respecto a la forma madura nativa de FVIII).

Tabla 2: Sustituciones de aminoácidos conservativas

Residuo original	Sustituciones ejemplares
Ala (A)	val; leu; ile
Arg (R)	lys; gln; asn
Asn (N)	gln; his; lys; arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro
His (H)	asn: gln: lys: arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe: norleucina
Leu (L)	norleucina: ile: val; met; ala: phe
Lys (K)	arg: gln: asn
Met (M)	leu; phe; ile
Phe (F)	leu: val: ile; ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr(Y)	Trp: phe: thr: ser
Val (V)	Ile; leu; met; phe; ala; norleucina

III). Polipéptidos recombinantes prolongados

En un aspecto, la enseñanza proporciona composiciones polipeptídicas de XTEN que son útiles como uno o más compañeros de proteínas de fusión para unirse a y/o incorporarse dentro del polipéptido de FVIII, produciendo una proteína de fusión de CFXTEN. Los XTEN en general son polipéptidos con secuencias sustancialmente no repetitivas que no son de origen natural que tienen un bajo grado de o ninguna estructura secundaria o terciaria en condiciones fisiológicas. El XTEN típicamente tiene de aproximadamente 36 a aproximadamente 3000 aminoácidos de los que la mayoría o la totalidad son aminoácidos hidrófilos pequeños. Como se usa en la presente memoria, "XTEN" excluye específicamente anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios y fragmentos Fc). Los polipéptidos XTEN tienen utilidad como compañeros de proteínas de fusión en que cumplen

diversas funciones, confiriendo determinadas propiedades farmacocinéticas, fisicoquímicas, farmacológicas y farmacéuticas deseables cuando se unen a una proteína de FVIII para crear una proteína de fusión de CFXTEN. Dichas composiciones de proteínas de fusión de CFXTEN tienen propiedades potenciadas en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN, haciéndolas útiles en el tratamiento de determinadas afecciones relacionadas con deficiencias de FVIII o trastornos hemorrágicos, como se describe más completamente a continuación.

Los criterios de selección para el XTEN a fusionar a las proteínas de FVIII usadas para crear las composiciones de proteínas de fusión de la enseñanza en general se refieren a atributos de propiedades físicas/químicas y estructura conformacional del XTEN que se usa, a su vez, para conferir propiedades farmacéuticas, farmacológicas y farmacocinéticas potenciadas a las composiciones de proteínas de fusión de FVIII. La característica no estructurada y las propiedades físicas/químicas del XTEN resultan, en parte, de la composición de aminoácidos global desproporcionadamente limitada a 4-6 aminoácidos hidrófilos, la unión de los aminoácidos en un diseño no repetitivo cuantificable y la longitud del polipéptido XTEN. En una característica ventajosa común al XTEN, pero no común a los polipéptidos, las propiedades del XTEN divulgado en la presente memoria no están vinculadas a secuencias de aminoácidos primarias absolutas, como se evidencia por la diversidad de las secuencias ejemplares de la tabla 4 que, dentro de intervalos variables de longitud, poseen propiedades similares, muchas de las cuales están documentadas en los ejemplos. El XTEN de la presente enseñanza puede mostrar una o más, o todas las siguientes propiedades ventajosas: conformación no estructurada, flexibilidad conformacional, solubilidad acuosa potenciada, alto grado de resistencia a proteasa, baja inmunogenia, baja unión a receptores de mamífero, un grado definido de carga y radios hidrodinámicos aumentados (o de Stokes); propiedades que pueden hacerlos particularmente útiles como compañeros de proteínas de fusión. Ejemplos no limitantes de las propiedades potenciadas que el XTEN confiere a las proteínas de fusión que comprenden FVIII fusionado a XTEN, en comparación con FVIII no unido a XTEN, incluyen aumentos en la solubilidad y/o estabilidad metabólica global, susceptibilidad reducida a proteólisis, inmunogenia reducida, tasa reducida de absorción cuando se administra por vía subcutánea o intramuscular, unión reducida a receptores de eliminación de FVIII, reactividad reducida a anticuerpos anticarga, interacciones potenciadas con el sustrato y/o propiedades farmacocinéticas potenciadas cuando se administra a un sujeto. Las propiedades farmacocinéticas potenciadas de las composiciones de CFXTEN en comparación con el FVIII no unido a XTEN incluyen semivida terminal más larga (por ejemplo, dos veces, tres veces, cuatro veces o mayor), área bajo la curva (ABC) aumentada (por ejemplo, un 25 %, un 50 %, un 100 % o más), menor volumen de distribución y absorción potenciada después de inyección subcutánea o intramuscular (una ventaja en comparación con las formas disponibles en el mercado de FVIII que deben administrarse por vía intravenosa). Además, se cree que las composiciones de CFXTEN que comprenden secuencias de escisión (descritas más completamente, a continuación) permiten una liberación mantenida del FVIII biológicamente activo, de modo que la CFXTEN administrada actúa como depósito. Se contempla específicamente que las proteínas de fusión de CFXTEN de la enseñanza pueden mostrar una o más o cualquier combinación de las propiedades mejoradas divulgadas en la presente memoria. Como resultado de estas propiedades potenciadas, se cree que las composiciones de CFXTEN permiten una dosificación menos frecuente en comparación con el FVIII no unido a XTEN cuando se administra a dosificaciones comparables. Dichas composiciones de proteína de fusión de CFXTEN tienen utilidad para tratar determinadas afecciones relacionadas con el factor VIII, como se describe en la presente memoria.

En la técnica se conoce una diversidad de métodos y ensayos para determinar las propiedades físicas/químicas de las proteínas tales como las composiciones de CFXTEN que comprenden XTEN. Dichas propiedades incluyen, aunque sin limitación, estructura secundaria o terciaria, solubilidad, agregación de proteínas, estabilidad, peso molecular absoluto y aparente, pureza y uniformidad, propiedades de fusión, contaminación y contenido de agua. Los métodos para ensayar estas propiedades incluyen centrifugación analítica, EPR, HPLC-intercambio iónico, HPLC-exclusión por tamaño, HPLC-fase inversa, dispersión de luz, electroforesis capilar, dicroísmo circular, calorimetría diferencial de barrido, fluorescencia, HPLC-intercambio iónico, HPLC-exclusión por tamaño, IR, RMN, espectroscopia de Raman, refractometría y espectroscopia del UV/visible. Se divulgan métodos adicionales en Arnau, *et al*., Prot Expr and Purif (2006) 48, 1-13.

El uno o más componentes de XTEN de la CFXTEN se diseñan para que se comporten como secuencias peptídicas desnaturalizadas en condiciones fisiológicas, a pesar de la longitud prolongada del polímero. "Desnaturalizado" describe el estado de un péptido en disolución que se caracteriza por una libertad conformacional grande de la cadena principal peptídica. La mayoría de péptidos y proteínas adoptan una conformación desnaturalizada en presencia de altas concentraciones de desnaturalizantes o a elevada temperatura. Los péptidos en conformación desnaturalizada tienen, por ejemplo, espectros característicos de dicroísmo circular (CD) y se caracterizan por ausencia de interacciones de largo alcance como se determina por RMN. "Conformación desnaturalizada" y "conformación no estructurada" se usan como sinónimos en la presente memoria. En algunos aspectos, la enseñanza proporciona secuencias de XTEN que, en condiciones fisiológicas, están en gran medida desprovistas de estructura secundaria. En otros casos, las secuencias de XTEN están sustancialmente desprovistas de estructura secundaria en condiciones fisiológicas de modo que el XTEN pueda adoptar una conformación de enrollamiento aleatorio. "En gran medida desprovisto", como se usa en este contexto, significa que al menos un 50 % de los residuos aminoacídicos de XTEN de la secuencia de XTEN no contribuyen a la estructura secundaria que se mide o determina por el medio descrito en la presente memoria. "Sustancialmente desprovisto", como se usa en este contexto, significa que al menos aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 %,

o aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % de los residuos aminoacídicos del XTEN de la secuencia de XTEN no contribuyen a la estructura secundaria, que se mide o determina por los métodos descritos en la presente memoria.

Se ha establecido una diversidad de métodos en la técnica para discernir la presencia o ausencia de estructuras secundarias y terciarias en un polipéptido dado. En particular, la estructura secundaria puede medirse espectrofotométricamente, por ejemplo, por espectroscopia de dicroísmo circular en la región espectral de "UV lejano" (190-250 nm). Los elementos de estructura secundaria, tales como hélice alfa y lámina beta, dan lugar cada uno a una forma característica y magnitud del espectro CD, y también la ausencia de estos elementos estructurales. La estructura secundaria también puede predecirse para una secuencia polipeptídica mediante determinados programas informáticos o algoritmos, tales como el algoritmo bien conocido de Chou-Fasman (Chou, P. Y., *et al.* (1974) *Biochemistry*, 13: 222-45) y el algoritmo de Garnier-Osguthorpe-Robson ("GOR") (Garnier J, Gibrat JF, Robson B. (1996), GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. Methods Enzymol 266:540-553), como se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20030228309A1. Para una secuencia dada, los algoritmos pueden predecir si existe alguna estructura secundaria o no en absoluto, expresada como el total y/o porcentaje de residuos de la secuencia que forman, por ejemplo, hélices alfa o láminas beta o el porcentaje de residuos de la secuencia que se ha predicho que provocarán una formación de enrollamiento aleatorio (que carece de estructura secundaria).

En un aspecto, las secuencias de XTEN usadas en las presentes composiciones de proteína de fusión tienen un porcentaje de hélice alfa que varía de un 0 % a menos de aproximadamente un 5 % como se determina por el algoritmo de Chou-Fasman. En otro aspecto, las secuencias de XTEN de las composiciones de proteína de fusión tienen un porcentaje de lámina beta que varía de un 0 % a menos de aproximadamente un 5 % como se determina por el algoritmo de Chou-Fasman. En algunas realizaciones, las secuencias de XTEN de las composiciones de proteína de fusión tienen un porcentaje de hélice alfa que varía de un 0 % a menos de aproximadamente un 5 % y un porcentaje de lámina beta que varía de un 0 % a menos de aproximadamente un 5 %como se determina por el algoritmo de Chou-Fasman. En algunos aspectos, las secuencias de XTEN de las composiciones de proteína de fusión tienen un porcentaje de hélice alfa de menos de aproximadamente un 2% y un porcentaje de lámina beta de menos de aproximadamente un 2 %. Las secuencias de XTEN de las composiciones de proteína de fusión tienen un alto grado de porcentaje de enrollamiento aleatorio, como se determina por el algoritmo de GOR. En algunos aspectos, una secuencia de XTEN tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente un 99 % de enrollamiento aleatorio, como se determina por el algoritmo de GOR. En algunos aspectos, las secuencias de XTEN de las composiciones de proteína de fusión tienen un porcentaje de hélice alfa que varía de un 0 % a menos de aproximadamente un 5 % y un porcentaje de lámina beta que varía de un 0 % a menos de aproximadamente un 5 %como se determina por el algoritmo de Chou-Fasman y al menos de aproximadamente un 90 % de enrollamiento aleatorio, como se determina por el algoritmo de GOR. En otros aspectos, las secuencias de XTEN de las composiciones de proteína de fusión tienen un porcentaje de hélice alfa de menos de aproximadamente un 2% y un porcentaje de lámina beta de menos de aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 90 % de enrollamiento aleatorio, como se determina por el algoritmo de GOR.

1. Secuencias no repetitivas

Se contempla que las secuencias de XTEN de los aspectos de CFXTEN son sustancialmente no repetitivos. En general, las secuencias de aminoácidos repetitivas tienen tendencia a agregarse y formar estructuras de orden mayor, como se ejemplifica por secuencias repetitivas naturales tales como colágenos y cremalleras de leucina. Estos aminoácidos repetitivos también pueden tender a formar contactos que provocan estructuras cristalinas o seudocristalinas. Por el contrario, la baja tendencia de las secuencias no repetitivas a agregarse posibilita el diseño de XTEN de secuencia larga con una frecuencia relativamente baja de aminoácidos cargados que de lo contrario probablemente se agregarían si las secuencias fueran repetitivas. La ausencia de repetitividad de un presente XTEN puede observarse evaluando una o más de las siguientes características. En un aspecto, una secuencia de XTEN "sustancialmente no repetitiva" tiene aproximadamente 36 o al menos 72, o al menos 96, o al menos 144, o al menos 288, o al menos 400, o al menos 500, o al menos 600, o al menos 700, o al menos 800, o al menos 864, o al menos 900, o al menos 1000, o al menos 2000, a aproximadamente 3000 o más residuos aminoacídicos, o tiene una longitud que varía de aproximadamente 36 a aproximadamente 3000, de aproximadamente 100 a aproximadamente 500, de aproximadamente 500 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 1000 a aproximadamente 3000 aminoácidos y residuos, en que ninguno de los tres aminoácidos contiguos en la secuencia son tipos de aminoácidos idénticos salvo que el aminoácido sea serina, en cuyo caso no más de tres aminoácidos contiguos son residuos de serina. En otro aspecto, como se describe más completamente a continuación, una secuencia de XTEN "sustancialmente no repetitiva" comprende motivos de 9 a 14 residuos aminoacídicos en los que los motivos consisten de 4 a 6 tipos de aminoácidos seleccionados de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P), y en la que la secuencia de dos residuos aminoacídicos contiguos cualesquiera en un motivo cualquiera no se repite más de dos veces en el motivo de secuencia.

El grado de repetitividad de un polipéptido o un gen puede medirse por programas informáticos o algoritmos o por otros medios conocidos en la técnica. De acuerdo con la presente enseñanza, los algoritmos a usar en el cálculo del grado de repetitividad de un polipéptido particular, tal como un XTEN, se divulgan en la presente memoria, y se proporcionan ejemplos de secuencias analizadas por los algoritmos (véanse los ejemplos, a continuación). En un aspecto, la repetitividad de un polipéptido de una longitud predeterminada puede calcularse (a partir de ahora en la presente memoria "puntuación de subsecuencia") de acuerdo con la fórmula dada por la ecuación 1:

$$\text{Puntuación de subsecuencia} = \frac{\sum_{i=1}^{m} Recuento_i}{m} \qquad \text{I}$$

en la que: m = (longitud de aminoácidos del polipéptido) - (longitud de aminoácidos de la subsecuencia) + 1; y recuento$_i$ = número acumulado de aparición de cada subsecuencia única dentro la secuencia$_i$

Un algoritmo llamado "SegScore" se desarrolló para aplicar la secuencia anterior para cuantificar la repetitividad de los polipéptidos, tal como un XTEN, proporcionando la puntuación de subsecuencia en la que subsecuencias de una longitud de aminoácidos predeterminada "n" se analizan para la repetitividad determinando el número de veces (un "recuento") que una subsecuencia única de longitud "s" aparece en la longitud establecida, dividida por el número absoluto de subsecuencias dentro de la longitud predeterminada de la secuencia. La FIG. 27 representa un diagrama de flujo lógico del algoritmo SegScore, mientras que la FIG. 28 retrata un esquema de la manera en que se obtiene una puntuación de subsecuencia para un XTEN ficticio con 11 aminoácidos y una longitud de subsecuencia de 3 residuos aminoacídicos. Por ejemplo, una longitud de polipéptido predeterminada de 200 residuos aminoacídicos tiene 192 subsecuencias de 9 aminoácidos solapantes y 198 subsecuencias de 3 monómeros, pero la puntuación de subsecuencia de cualquier polipéptido dado dependerá del número absoluto de subsecuencias únicas y de lo frecuentemente que aparezca cada subsecuencia única (lo que significa una diferente secuencia de aminoácidos) en la longitud predeterminada de la secuencia.

En el contexto de la presente enseñanza, "puntuación de subsecuencia" significa la suma de veces que aparece cada tramo de 3 monómeros único entre 200 aminoácidos consecutivos del polipéptido XTEN acumulado dividido por el número absoluto de subsecuencias de 3 monómeros únicas dentro de la secuencia de 200 aminoácidos. Ejemplos de dichas puntuaciones de subsecuencia derivadas de 200 aminoácidos consecutivos de polipéptidos repetitivos y no repetitivos se presentan en el ejemplo 45. En un aspecto, la enseñanza proporciona una CFXTEN que comprende un XTEN en que el XTEN tiene una puntuación de subsecuencia menor de 12, más preferiblemente menor de 10, más preferiblemente menor de 9, más preferiblemente menor de 8, más preferiblemente menor de 7, más preferiblemente menor de 6 y mucho más preferiblemente menor de 5. En otro aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN que comprende al menos dos a aproximadamente seis XTEN en que 200 aminoácidos del XTEN tienen una puntuación de subsecuencia de menos de 10, más preferiblemente menos de 9, más preferiblemente menos de 8, más preferiblemente menos de 7, más preferiblemente menos de 6 y mucho más preferiblemente menos de 5. En los aspectos de las composiciones de proteína de fusión de CFXTEN descritas en la presente memoria, un componente de XTEN de una proteína de fusión con una puntuación de subsecuencia de 10 o menos (es decir, 9, 8, 7, etc.) también es sustancialmente no repetitivo.

Se cree que la característica no repetitiva de XTEN de la presente enseñanza conjuntamente con los tipos particulares de aminoácidos que predominan en el XTEN, en lugar de la secuencia primaria absoluta, confiere muchas de las propiedades fisicoquímicas y biológicas potenciadas de las proteínas de fusión de CFXTEN. Estas propiedades potenciadas incluyen un mayor grado de expresión de la proteína de fusión en la célula hospedadora, mayor estabilidad genética del gen que codifica XTEN, un mayor grado de solubilidad, menor tendencia a agregarse y farmacocinética potenciada de la CFXTEN resultante en comparación con las proteínas de fusión que comprenden polipéptidos que tienen secuencias repetitivas. Estas propiedades potenciadas permiten una fabricación más eficaz, menores costes de bienes y facilitan la formulación de preparaciones farmacéuticas que comprenden XTEN que contienen concentraciones de proteína extremadamente altas, excediendo en algunos casos de 100 mg/ml. Además, las secuencias polipeptídicas de XTEN de los aspectos se diseñan para que tengan un bajo grado de repetitividad interna para reducir o eliminar sustancialmente la inmunogenia cuando se administran a un mamífero. Las secuencias polipeptídicas compuestas de motivos repetidos cortos limitadas en gran medida a únicamente tres aminoácidos, tales como glicina, serina y glutamato, pueden producir valores de anticuerpo relativamente altos cuando se administran a un mamífero a pesar de la ausencia de epítopos de linfocitos T previstos en estas secuencias. Esto puede estar causado por la naturaleza repetitiva de los polipéptidos, ya que se muestra que los inmunógenos con epítopos repetidos, incluyendo agregados de proteínas, inmunógenos reticulados y carbohidratos repetitivos son muy inmunógenos y pueden provocar, por ejemplo, la reticulación de receptores de linfocitos B causando activación de linfocitos B. (Johansson, J., *et al.* (2007) Vaccine, 25:1676-82; Yankai, Z., *et al.* (2006) Biochem Biophys Res Commun, 345:1365-71; Hsu, C. T., *et al.* (2000) Cancer Res, 60:3701-5); Bachmann MF, *et al.* Eur J Immunol. (1995) 25(12):3445-3451).

2. Motivos de secuencia ejemplares

La presente enseñanza abarca XTEN usados como compañeros de fusión que comprenden múltiples unidades de secuencias más cortas, o motivos, en que las secuencias de aminoácidos de los motivos son no repetitivas. La propiedad no repetitiva se cumple a pesar del uso de una estrategia de "componentes básicos" usando una colección de motivos de secuencia que se multimerizan para crear las secuencias de XTEN. Por tanto, aunque una secuencia de XTEN puede consistir en múltiples unidades de tan pocos como cuatro tipos diferentes de motivos de secuencia, como los propios motivos en general consisten en secuencias de aminoácidos no repetitivas, la secuencia de XTEN global se diseña para hacer que la secuencia sea sustancialmente no repetitiva.

En un aspecto, un XTEN tiene una secuencia sustancialmente no repetitiva de más de aproximadamente 36 a aproximadamente 3000, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 2000, o de aproximadamente 144 a aproximadamente 1000 residuos aminoacídicos, o incluso más larga en la que al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 85 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 100 % de la secuencia de XTEN consiste en motivos de secuencia no solapantes, y en la que cada uno de los motivos tiene de aproximadamente 9 a 36 residuos aminoacídicos. En otros aspectos, al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 85 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 100 % de la secuencia de XTEN consiste en motivos de secuencia no solapantes en la que cada uno de los motivos tiene de 9 a 14 residuos aminoacídicos. En otros aspectos más, al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 85 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 100 % de la secuencia de XTEN consiste en motivos de secuencia no solapantes en la que cada uno de los motivos tiene 12 residuos aminoacídicos. En estos aspectos, se prefiere que los motivos de secuencia estén compuestos de sustancialmente (por ejemplo, un 90 % o más) o exclusivamente aminoácidos hidrófilos pequeños, de modo que la secuencia global tenga una característica flexible no estructurada. Ejemplos de aminoácidos que se incluyen en XTEN son, por ejemplo, arginina, lisina, treonina, alanina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, serina y glicina. Como resultado de ensayar variables tales como la optimización de codones, polinucleótidos de ensamblaje que codifican motivos de secuencia, expresión de proteínas, distribución de cargas y solubilidad de la proteína expresada, y estructura secundaria y terciaria, se descubrió que las composiciones de XTEN con las características potenciadas divulgadas en la presente memoria incluyen principal o exclusivamente residuos de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P), en las que las secuencias están diseñadas para ser sustancialmente no repetitivas. En un aspecto, las secuencias del XTEN tienen predominante de cuatro a seis tipos de aminoácidos seleccionados de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) o prolina (P) que están dispuestos en una secuencia sustancialmente no repetitiva que es de más de aproximadamente 36 a aproximadamente 3000, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 2000, o de aproximadamente 144 a aproximadamente 1000 residuos aminoacídicos de longitud. En algún aspecto, una secuencia de XTEN está hecha de 4, 5 o 6 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) o prolina (P). En algunos aspectos, el XTEN tiene secuencias de más de aproximadamente 36 a aproximadamente 1000, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 2000, o de aproximadamente 400 a aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos en las que al menos aproximadamente un 80 % de la secuencia consiste en motivos de secuencia no solapantes en los que cada uno de los motivos tiene de 9 a 36 residuos aminoacídicos y en los que al menos un 90 %, o al menos un 91 %, o al menos un 92 %, o al menos un 93 %, o al menos un 94 %, o al menos un 95 %, o al menos un 96 %, o al menos un 97 % o un 100 % de cada uno de estos motivos consiste en 4 a 6 tipos de aminoácidos seleccionados de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P), y en los que el contenido de un tipo de aminoácido cualquiera en el XTEN de longitud completa no excede un 30 %. En otros aspectos, al menos aproximadamente un 90 % de la secuencia de XTEN consiste en motivos de secuencia no solapantes en los que cada uno de los motivos tiene de 9 a 36 residuos aminoacídicos en los que los motivos consisten en 4 a 6 tipos de aminoácidos seleccionados de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P), y en los que el contenido de un tipo de aminoácido cualquiera en el XTEN de longitud completa no excede de un 40 %, o aproximadamente un 30 % o un 25 % o aproximadamente un 17 %. En otros aspectos, al menos aproximadamente un 90 % de la secuencia de XTEN consiste en motivos de secuencia no solapantes en los que cada uno de los motivos tiene 12 residuos aminoacídicos que consisten en 4 a 6 tipos de aminoácidos seleccionados de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P), y en los que el contenido de un tipo de aminoácido cualquiera en el XTEN de longitud completa no excede de un 40 %, o un 30 % o aproximadamente un 25%. En otros aspectos más, al menos aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, a aproximadamente un 100 % de la secuencia de XTEN consiste en motivos de secuencia no solapantes en los que cada uno de los motivos tiene 12 residuos aminoacídicos que consisten en glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P).

En otros aspectos más, los XTEN comprenden secuencias sustancialmente no repetitivas de más de aproximadamente 36 a aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos en las que al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 % de la secuencia consiste en motivos de secuencia no solapantes de 9 a 14 residuos aminoacídicos, en las que los motivos consisten en 4 a 6 tipos

de aminoácidos seleccionados de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P), y en las que la secuencia de dos residuos aminoacídicos contiguos cualesquiera en un motivo cualquiera no se repite más de dos veces en el motivo de secuencia. En otros aspectos, al menos aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 % de una secuencia de XTEN consiste en motivos de secuencia no solapantes de 12 residuos aminoacídicos, en la que los motivos consisten en cuatro a seis tipos de aminoácidos seleccionados de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P), y en la que la secuencia de dos residuos aminoacídicos contiguos cualesquiera en un motivo de secuencia cualquiera no se repite más de dos veces en el motivo de secuencia. En otros aspectos, al menos aproximadamente un 90%, o aproximadamente un 91%, o aproximadamente un 92%, o aproximadamente un 93%, o aproximadamente un 94%, o aproximadamente un 95%, o aproximadamente un 96%, o aproximadamente un 97%, o aproximadamente un 98%, o aproximadamente un 99% de una secuencia de XTEN consiste en motivos de secuencia no solapantes de 12 residuos aminoacídicos, en la que los motivos consisten en glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P), y en la que la secuencia de dos residuos aminoacídicos contiguos cualesquiera en un motivo de secuencia cualquiera no se repite más de dos veces en el motivo de secuencia. En otros aspectos más, los XTEN consisten en motivos de secuencia de 12 aminoácidos en los que los aminoácidos se seleccionan de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P), y en los que la secuencia de dos residuos aminoacídicos contiguos cualesquiera en un motivo de secuencia cualquiera no se repite más de dos veces en el motivo de secuencia, y en los que el contenido de un tipo de aminoácido cualquiera en el XTEN de longitud completa no excede de un 30 %. Los aspectos anteriores son ejemplos de secuencias de XTEN sustancialmente no repetitivas. A continuación, se detallan ejemplos adicionales.

En algunos aspectos, la enseñanza proporciona composiciones de CFXTEN que comprenden una, o dos, o tres, o cuatro, cinco, seis o más secuencias de XTEN no repetitivas de aproximadamente 36 a aproximadamente 1000 residuos aminoacídicos, o de forma acumulada de aproximadamente 100 a aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos en los que al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, a aproximadamente un 100 % de la secuencia consiste en múltiples unidades de cuatro o más motivos de secuencia no solapantes seleccionados de las secuencias de aminoácidos de la tabla 3, en los que la secuencia global permanece sustancialmente no repetitiva. En algunos aspectos, el XTEN comprende motivos de secuencia no solapantes en que aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 85 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, o aproximadamente un 100 % de la secuencia consiste en múltiples unidades de secuencias no solapantes seleccionadas de una sola familia de motivos seleccionada de la tabla 3, produciendo una secuencia de la familia. Como se usa en la presente memoria, "familia" significa que el XTEN tiene motivos seleccionados únicamente de una sola categoría de motivos de la tabla 3; es decir, XTEN AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC o BD, y que cualquier otro aminoácido en el XTEN que no es de un motivo de la familia se selecciona para conseguir una propiedad necesaria, tal como para permitir la incorporación de un sitio de restricción por los nucleótidos codificantes, la incorporación de una secuencia de escisión o para conseguir una mejor unión al componente del factor de coagulación FVIII de la CFXTEN. En algunos aspectos de las familias de XTEN, una secuencia de XTEN comprende múltiples unidades de motivos de secuencia no solapantes de la familia del motivo AD, o de la familia del motivo AE, o de la familia del motivo AF, o de la familia del motivo AG, o de la familia del motivo AM, o de la familia del motivo AQ, o de la familia BC, o de la familia BD, mostrando el XTEN resultante el intervalo de homología descrito anteriormente. En otros aspectos, el XTEN comprende múltiples unidades de secuencias de motivo de dos o más de las familias de motivo de la tabla 3. Estas secuencias pueden seleccionarse para conseguir características físicas/químicas deseadas, incluyendo propiedades tales como carga neta, hidrofilia, ausencia de estructura secundaria o ausencia de repetitividad que se confieren por la composición de aminoácidos de los motivos, descritos más completamente a continuación. En los aspectos descritas anteriormente en la presente memoria en este párrafo, los motivos incorporados en el XTEN pueden seleccionarse y ensamblarse usando los métodos descritos en la presente memoria para conseguir un XTEN de aproximadamente 36 a aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos.

Tabla 3: Motivos de secuencia de XTEN de 12 aminoácidos y familias de motivo

Familia de motivo	**Secuencia del motivo**	SEQ ID NO:
AD	GESPGGSSGSES	19
AD	GSEGSSGPGESS	20
AD	GSSESGSSEGGP	21
AD	GSGGEPSESGSS	22
AE, AM	GSPAGSPTSTEE	23
AE, AM, AQ	GSEPATSGSETP	24
AE, AM, AQ	GTSESATPESGP	25

Familia de motivo	**Secuencia del motivo**	SEQ ID NO:
AE, AM, AQ	GTSTEPSEGSAP	26
AF, AM	GSTSESPSGTAP	27
AF, AM	GTSTPESGSASP	28
AF, AM	GTSPSGESSTAP	29
AF, AM	GSTSSTAESPGP	30
AG, AM	GTPGSGTASSSP	31
AG, AM	GSSTPSGATGSP	32
AG, AM	GSSPSASTGTGP	33
AG, AM	GASPGTSSTGSP	34
AQ	GEPAGSPTSTSE	35
AQ	GTGEPSSTPASE	36
AQ	GSGPSTESAPTE	37
AQ	GSETPSGPSETA	38
AQ	GPSETSTSEPGA	39
AQ	GSPSEPTEGTSA	40
BC	GSGASEPTSTEP	41
BC	GSEPATSGTEPS	42
BC	GTSEPSTSEPGA	43
BC	GTSTEPSEPGSA	44
BD	GSTAGSETSTEA	45
BD	GSETATSGSETA	46
BD	GTSESATSESGA	47
BD	GTSTEASEGSAS	48
• Indica secuencias de motivo individuales que, cuando se usan conjuntamente en diversas permutaciones, producen una "secuencia de familia"		

En algunos aspectos de las familias de XTEN, una secuencia de XTEN comprende múltiples unidades de motivos de secuencia no solapantes de la familia del motivo AD, la familia del motivo AE o la familia del motivo AF, o la familia del motivo AG, o la familia del motivo AM, o la familia del motivo AQ, o la familia BC, o la familia BD, mostrando el XTEN resultante el intervalo de homología descrito anteriormente. En otros aspectos, el XTEN comprende múltiples unidades de secuencias de motivo de dos o más de las familias de motivo de la tabla 3, seleccionadas para conseguir características físico/químicas deseadas, incluyendo propiedades tales como carga neta, ausencia de estructura secundaria o ausencia de repetitividad que pueden conferirse por la composición de aminoácidos de los motivos, descritos más completamente a continuación. En los aspectos descritos anteriormente en la presente memoria en este párrafo, los motivos o partes de los motivos incorporados en el XTEN pueden seleccionarse y ensamblarse usando los métodos descritos en la presente memoria para conseguir un XTEN de aproximadamente 36, aproximadamente 42, aproximadamente 72, aproximadamente 144, aproximadamente 288, aproximadamente 576, aproximadamente 864, aproximadamente 1000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos, o cualquier longitud intermedia. Ejemplos no limitantes de secuencias de familias de XTEN útiles para incorporación en la presente CFXTEN se presentan en la tabla 4. Se pretende que una secuencia especificada mencionada con respecto a la tabla 4 tenga esa secuencia expuesta en la tabla 4, mientras que una referencia generalizada a una secuencia AE144, por ejemplo, se pretende que abarque cualquier secuencia AE que tenga 144 residuos aminoacídicos; por ejemplo, AE144_1A. AE144_2A, etc., o una referencia generalizada a una secuencia AG144, por ejemplo, pretende abarcar cualquier secuencia AG que tenga 144 residuos aminoacídicos, por ejemplo, AG144_1, AG144_2, AG144A, AG144_B, AG144_C, etc.

Tabla 4: Polipéptidos XTEN

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE42	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS	49
AE42_1	TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS	50
AE42_2	PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG	51
AE42_3	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP	52
AG42_1	GAPSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGPSGP	53
AG42_2	GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP	54
AG42_3	SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA	55
AG42_4	SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG	56
AE48	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGS	57
AM48	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS	58
AE144	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAP	59
AE144_1A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPG	60
AE144_2A	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPTESGPG	61
AE144_2B	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPTESGPG	62
AE144_3A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPG	63
AE144_3B	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPG	64
AE144_4A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPG	65
AE144_4B	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPG	66
AE144_5A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGG	67

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE144_6B	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTTPSPEGSAPG	68
AF144	GTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGS TSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPS GESSTAPGTSPSGESSTAP	69
AG144_1	SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASP	70
AG144_2	PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS	71
AG144_A	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP	72
AG144_B	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP	73
AG144_C	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSP	74
AG144_F	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSP	75
AG144_3	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP	76
AG144_4	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSP	77
AE288_1	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	78
AE288_2	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSGPGTSTEPSPAGSPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	79

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AG288_1	PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS	80
AG288_2	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP	81
AF504	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SXPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGPGSSTPSGATGSPGSSTPS SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSXPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSP	82
AF540	GSTSSTAESPGPGTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGT STPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPS GESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGSASPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESP GPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGT STPESGSASPGSTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSE SPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGE SSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP	83
AD576	GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSGSSESESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPG SSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSGSSESGSSEGGPGESPGGSGSSESGSSEGGPGSS ESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPGG EPSESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPGG SGGSESGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPGGSS GSESGESPGPGSSGSESGESPGPGSSGSESGESPGPGSSGSESGESPGPGSSGSESGESPGPGSSGSESEG GPGSGGEPSESGSSGSGESGSSGPGESSGSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSESGSSEGGPGG PGSGGEPSESGSSGSESPGPGSSGSESGSSEGGPGSSGSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSS GSSESGSSEGGPGSGGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSESPGPGSSGSESGSSEGGPGESSGSG SSESGSSEGGPGSEGSSGPGESS	84

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE576	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSGPGTSTEPSEGSAPGTSTESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP	85
AF576	GSTSSTAESPGPGTSSTAESPGPGTSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSSTAESPGPGT STPESGSASPGTSTESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPS GESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESP GPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GTSTPESGSASPGTSTESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGT STPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSE SPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGE SSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGS ASPGTSTPESGSASP	86
AG576	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS	87

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE624	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSTEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAP	88
AD836	GSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSGSESGSGGGEPSESGSSGGESPGGSSGSESG ESPGGSSGSESGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGES PGGSSGSESGESPGGSSGSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSES GSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSGPGESPSESGSSGSESPGGSSGSESGESPGG SSGSESGSGGTPSESGSSGSESGSPGPGESSGSSTESGSSEGGPGSGGTPSESGSSGSESGSSGP GESGSSESGSSEGGPGSGPGESPSESGSSGSESGSPGPGSSGSESGSSGSESGESPGGSSGS ESGSSGSESGESPGGSSGSESGSSEGGPGESPSESGSSGSESGSSEGGPGSSESGSSEGGGP GESPGGSSGSESGSGGTEPSESGSSGSESGSSGPGESSGSESPGGSSGSESGSSGPGSSESS GSSEGGPGSGGTEPSESGSSGSESGSSGPGESSGSESGSSGPGESSGSESGSSGPGESSGSGGTEP SESGSSGSGGTEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGSSGPGESSGSESGSSGPGESSGP GESSGESPGGSSGSESGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSGGTEPSES GSSGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSGGTEPSESGSSGSESGSSEGGPGESPGGSSGS ESGSSGTEPSESGSSGTESPGGSSGSESGSGGTEPSESGSS	89

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	90
AF864	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGT STPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSPS GESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTA ESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGS ASPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPG STSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPTESGPXXXGAS ASGAPSTXXXXSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSES PSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAE SPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESST APGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGT SPSGESSTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSS TAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSP	91

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AG864_2	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPSGTASSSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASSTPSGATGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASSTPSGATGSPGASPGTSST GSP	92
AM875	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGS TSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGA SASGATSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSSTSSTAESPGPGSTSE SPSGTAPGTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESS TAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSSTSAESPGPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTSSTGSPGTSTEPSEGSAPGTSTEP PSEGSAP	93

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE912	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSDGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTSTEPSEGSAPGTSTE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	94
AM923	MATPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTEPESGSASPGSTSESPSGTAPGS TSESPSGTAPGTSTEPESGSASPGTSTEPESGSASPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASASGAPSTGGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSP SGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSSTAESPGPGTSTEPSEGSASPGSTSESPSGT APGTSTEPSTGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	95

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AM1318	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGS TSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTTPSGATGSPGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAPGP EPTGPAPSGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSST AESPGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSTEEGSTAPGTSPSGES STAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGS SPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSTGSPGASASGAPSTGGTSPSGESSTAPGSTSSSTAESPGPGTSTSPSGESSTAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSTESPSGSASPGSPAGSPTSTEE TPGTSTEPSEGSAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPTGTS STPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSTSSTSPGTPGSGTASSSPGSPAGSPTSTEEGSPAG STAESPGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAP	96
BC 864	GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGS EPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTST EPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSEPAT SGTEPSGSEPATSGTEPSGTSEPSTSEPGAGSGAGSEPTSTEPGTSEPSTSEPGAGSEPATSG TEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSGASEPTSTEPGSEPATSGTE PSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSPS GSGASEPTSTTEPGTSTTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTTEPGTSTTEPSEPGSAGS GASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTST EPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTSTEPP SEPGSAGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSE PGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSEPSTSEPGTAGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPG SAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPG GSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSEPSTSEPGTAGSEPATSGTEPSGS GASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSA	97

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
BD864	GSETATSGSETAGTSESATSDSGAGSTAGSETSTEAGTSESATSESGAGSETATSGSETA GSETATSGSETAGTSTEASEGSASGTSTEASEGSASGTSESATSESGAGSETATSGSETA GTSTEASEGSASGSTAGTSETSTEAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETA GTSESATSESGAGTSTEASEGSASGSETATSGSETAGTSETACTSTSTEASEGSASGS GSTAGSETSTEAGTSESATSEGAGTSTEASEGSASGSETATSGSETAGSTAGSETATSGSETA GSTAGSETSTEAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETAGTSTEASEGSAS GTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETAGSETATSGSETA GSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETA GSTAGSETSTEAGSETATSGSETATSESGAGSTAGSETSTEAGTSTEAGTSTEASEGSAS GSTAGSETSTTAGSETATSGSTTAGTSTEASEGSASGTSESATSTESGAGSETATSGSETA GTSESATSESGAGTSESATSTESGAGSETATSGSETTAGTSESATSTESGAGSETATSGSETA GTSTEASEGSASGTSTEASEGSASGSTAGSETSTEAGSTAGSETATSGSETATSGSETA GTSESATSESGAGSETATSGSETAGTSESATSGSETATSGSETAGTSESATSESGA GTSESATSESGAGSETATSGSETA	98
AE948	GTSTTPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTTPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTTPSEGSAPGSFPATSG SETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSE STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP	99

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE1044	GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTE SATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSTESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSI EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP GPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTST	100
AE1140	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGS SATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSE GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATTLSGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSTEPATSGSETPGTSTESATPESGPGTSTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETPGTSTESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPA	101

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE1236	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGST SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP	102
AE1332	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSTPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST	103

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE1428	GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSTSTEPSEGSAPGTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE1620	GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETTPGSTEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST	106
AE1716	GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETTPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSE	107

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE1812	GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSETPGTSESATP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSTPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEP	108
AE1908	GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSETATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPTSTEP ESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP	109

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE2004 A	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SPGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE	110
AG948	GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG TPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPG PGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGPTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	111

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AG1044	GTPGSGTASSPGTPGSGTASSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST	112
AG1140	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP ATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA TGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA GSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAST GTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSST	113

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AG1236	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTP GSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSI GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTASPGTSSTKGSPGTASP	114
AG1332	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGATG STGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG TPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GSSPSASTGTGPGTSSTGSPGASPGTSSTPSGATGSPGTPG	115

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AG1428	GTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSPSAS GTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPG TGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTA SSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT GPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSGTASSSPG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGS GTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASP GTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG GTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT	116
AG1524	GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTP GSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGATGSPGSSPSASTGTGPG SSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPS ASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPG	117

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AG1620	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS PGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTI	118
AG1716	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS PSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGT GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG GSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG	119

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AG1812	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSG SGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTSSTGSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASP	120
AG1908	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGSSPSASTGTGP TGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASTGTGP GTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSP	121

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AG2004A	GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEEGSAP PATSGSETPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPG TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSLGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGS SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS SPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSLPATSGSLETPGSEPATSGSLETPGSPAGSPTSTLLEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	122
AE72B	SPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPG	123
AE72C	TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPG	124
AE108A	TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS	125
AE108B	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP	126
AE144A	STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSLGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGS	127
AE144B	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS SPTSTEEGTSTEPSEGSAPG	128
AE180A	TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS	129
AE216A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSLPATSGSLETPGSEPATSGSLETPGSPAGSPTSTLLEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	130

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE252A	ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEP	131
AE288A	TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGTSESATPLESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTLEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA	132
AE324A	PTSGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATS	133
AE360A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	134
AE396A	PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTLPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS	135
AE432A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS	136

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE468A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSGPGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	137
AE504A	EGSAPGTSTTEPSESGSAPGTSTTEPSESGSAPGTSTTEPSESGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPS	138
AE540A	TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP	139
AE576A	TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGTSESA	140

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE612A	GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTLEGSPAGSPTSTLLGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSLPATSGSETPGSLPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	141
AE648A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSLPATSGSETPGSPAGSPTSTLEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSLPATSGSETPGTSESAT	142
AE684A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTLEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TS	143

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE720A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTE	144
AE756A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPFSGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPFSGPGSEPATSGSETPGTSFSATPFSGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSEITPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSEPA TSGSETPGTSTES	145
AE792A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPFSGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTES ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS	146

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AE828A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSTPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TFPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSFPATSGSETPGTSFSATPFSGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESAT	147
AG72A	GPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASS	148
AG72B	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSP	149
AG72C	SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGA	150
AG108A	SASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSTPSGATGSPGTSSTGSPG PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSPSASTGTGPGSGTASSSS	151 152
AG108B	PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS	153
AG144A	PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGASP	154
AG144B	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS	155
AG216A	TGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSG	156

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AG252A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPG	157
AG288A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS	158
AG324A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPG TPGSGTASSSPGSSTP	159
AG360A	TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG	160
AG396A	GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT	161
AG432A	GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP S	162

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AG468A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTKGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG	163
AG504A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTSSTKGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTKGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGS GTASSSPGSSTP	164
AG540A	TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG	165
AG576A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTKGSPGASPGTSSTGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPG	166

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AG612A	STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS	167
AG648A	GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS SIGSPGSSPSASIGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP	168
AG684A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGA SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGASPG	169

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AG720A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGA ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSSTGSPGASPGTSSTPSGATGSPGTPG SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSSTGSPGASPGTSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG	170
AG756A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTPSGATG GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPG	171
AG792A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTPSGATG GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPG	172

Nombre de XTEN	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
AG828A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTSSTGSP PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGSPGTP GTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP	173
AG288_DE	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTP PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	1699

En otros aspectos, la composición de CFXTEN comprende una o más secuencias de XTEN no repetitivas de longitudes que varían de aproximadamente 36 a aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos, en la que al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, a aproximadamente un 100 % de la secuencia consiste en motivos de secuencia de 36 aminoácidos no solapantes seleccionados de una o más de las secuencias polipeptídicas de las tablas 13-17, como una secuencia de familia, o donde los motivos se seleccionan de dos o más familias de motivos.

En esos aspectos en los que el componente de XTEN de la proteína de fusión de CFXTEN tiene menos de un 100 % de sus aminoácidos que consisten en 4, 5 o 6 tipos de aminoácidos seleccionados de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P), o menos de un 100 % de la secuencia que consiste en los motivos de secuencia de la tabla 3 o las secuencias de XTEN de las tablas 4 y 13-17, los otros residuos aminoacídicos del XTEN se seleccionan de cualquiera de los otros 14 L-aminoácidos naturales, pero se seleccionan preferentemente de aminoácidos hidrófilos de modo que la secuencia de XTEN contenga al menos aproximadamente un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de aminoácidos hidrófilos. Los aminoácidos del XTEN que no son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P) están intercalados por toda la secuencia de XTEN, están ubicados dentro o entre los motivos de secuencia o están concentrados en uno o más tramos cortos de la secuencia de XTEN, por ejemplo, para crear un conector entre el XTEN y los componentes de FVIII. En dichos casos donde el componente de XTEN de la CFXTEN comprende aminoácidos distintos de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P), se prefiere que menos de aproximadamente un 2 % o menos de aproximadamente un 1 % de los aminoácidos sean residuos hidrófobos de modo que las secuencias resultantes carezcan en general de estructura secundaria, por ejemplo, que no tengan más de un 2 % de hélices alfa o un 2 % de láminas beta, como se determina por los métodos divulgados en la presente memoria. Los residuos hidrófobos que están menos favorecidos en la construcción de XTEN incluyen triptófano, fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina, valina y metionina. Adicionalmente, se pueden diseñar las secuencias XTEN para que contengan menos de un 5% o menos de un 4 % o menos de un 3 % o menos de un 2 % o menos de un 1 % o ninguno de los siguientes aminoácidos: cisteína (para evitar la formación de disulfuro y la oxidación), metionina (para evitar la oxidación), asparagina y glutamina (para evitar la desamidación). Por tanto, en algunos aspectos, el componente de XTEN de la proteína de fusión de CFXTEN que comprende otros aminoácidos además de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P) tiene una secuencia con menos de un 5 % de los residuos que contribuyen a las hélices alfa y láminas beta, como se mide por el algoritmo de Chou-Fasman y tiene al menos un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % o más formación de enrollamiento aleatorio medido por el algoritmo de GOR.

3. Longitud de secuencia

En otro aspecto, la enseñanza proporciona XTEN de longitudes variables para la incorporación en composiciones de CFXTEN en las que la longitud de la una o más secuencias de XTEN se elige basándose en la propiedad o función a conseguir en la proteína de fusión. Dependiendo de la propiedad o función pretendida, las composiciones de CFXTEN comprenden XTEN de longitud corta o intermedia ubicados internos a la secuencia de FVIII o entre los dominios FVIII y/o secuencias de XTEN más largas que pueden servir como vehículos, ubicado en las proteínas de fusión como se divulga en la presente memoria. Aunque no se pretende ser limitante, el XTEN o fragmentos de XTEN incluye segmentos cortos de aproximadamente 6 a aproximadamente 99 residuos aminoacídicos, longitudes intermedias de aproximadamente 100 a aproximadamente 399 residuos aminoacídicos y longitudes más largas de aproximadamente 400 a aproximadamente 1000 y hasta aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos. Por tanto, el XTEN para su incorporación en la presente CFXTEN abarca XTEN o fragmentos de XTEN con longitudes de aproximadamente 6, o aproximadamente 12, o aproximadamente 36, o aproximadamente 40, o aproximadamente 42, o aproximadamente 72 o aproximadamente 96, o aproximadamente 144, o aproximadamente 288, o aproximadamente 400, o aproximadamente 500, o aproximadamente 576, o aproximadamente 600, o aproximadamente 700, o aproximadamente 800, o aproximadamente 864, o aproximadamente 900, o aproximadamente 1000, o aproximadamente 1500, o aproximadamente 2000, o aproximadamente 2500, o hasta aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos de longitud. Como alternativa, las secuencias de XTEN pueden ser de aproximadamente 6 a aproximadamente 50, de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, de aproximadamente 100 a 150, de aproximadamente 150 a 250, de aproximadamente 250 a 400, de aproximadamente 400 a aproximadamente 500, de aproximadamente 500 a aproximadamente 900, de aproximadamente 900 a 1500, de aproximadamente 1500 a 2000 o de aproximadamente 2000 a aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos de longitud. La longitud precisa de un XTEN incorporado en la presente CFXTEN puede variar sin afectar de forma adversa a la actividad de una composición de CFXTEN. En un aspecto, uno o más de los XTEN usados en la CFXTEN divulgada en la presente memoria tiene 36 aminoácidos, 42 aminoácidos, 144 aminoácidos, 288 aminoácidos, 576 aminoácidos u 864 aminoácidos de longitud y puede seleccionarse de una de las secuencias de la familia de XTEN; es decir, AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC o BD. En otro aspecto, dos o más de los XTEN usados en la CFXTEN divulgada en la presente memoria tienen 36 aminoácidos, 42 aminoácidos, 144 aminoácidos, 288 aminoácidos, 576 aminoácidos u 864 aminoácidos de longitud y pueden seleccionarse de dos de las secuencias de la familia de XTEN; es decir, AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC o BD con combinaciones de secuencias de la familia AE y AG preferidas. En algunos aspectos, la CFXTEN que comprende

uno o más de los XTEN usados en la presente memoria contiene XTEN seleccionados de una cualquiera de las secuencias de la tabla 4, que pueden unirse al componente de FVIII directamente o mediante secuencias espaciadoras divulgadas en la presente memoria.

En diseños de configuración de CFXTEN particulares, donde el XTEN sirve como conector flexible, o se inserta en bucles externos o regiones no ordenadas de la secuencia de FVIII para aumentar el volumen, la flexibilidad o la hidrofilia de la región, o se diseñan para interferir con los receptores de eliminación para FVIII para potenciar las propiedades farmacocinéticas, o para interferir con la unión de los inhibidores de FVIII u otros anticuerpos anti-FVIII, o donde se usa una longitud corta o intermedia de XTEN para facilitar la penetración tisular o para varias la fuerza de las interacciones de la proteína de fusión de CFXTEN con su diana, o donde se desea distribuir la longitud acumulada de XTEN en segmentos de longitud corta o intermedia en múltiples ubicaciones dentro de la secuencia de FVIII, la enseñanza contempla composiciones de CFXTEN con una, dos, tres, cuatro, cinco o más secuencias de XTEN cortas o intermedias insertadas entre o dentro de uno o más dominios de FVIII o dentro de bucles externos o en otros sitios en la secuencia de FVIII tales como, aunque sin limitación, ubicaciones en o próximas a los sitios de inserción identificados en la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o como se ilustra en las FIG. 8-9. En un aspecto de lo anterior, la proteína de fusión de CFXTEN contiene múltiples segmentos de XTEN, por ejemplo, al menos dos, o al menos tres, o al menos cuatro, o al menos cinco o más segmentos de XTEN en que los segmentos de XTEN pueden ser idénticos o pueden ser diferentes y en la que la CFXTEN retiene al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 % o más de la actividad procoagulante del FVIII nativo cuando se ensaya por uno de los ensayos divulgados en la presente memoria. En otros diseños de configuración de CFXTEN particulares, donde el XTEN sirve como vehículo para aumentar el volumen de la proteína de fusión, o para varias la fuerza de las interacciones de la proteína de fusión de CFXTEN con su diana, o para potenciar las propiedades farmacocinéticas de la proteína de fusión, la enseñanza contempla composiciones de CFXTEN con una o más secuencias de XTEN de longitud intermedia o más larga insertadas en el extremo C, dentro del dominio B (o el residuo de la secuencia BDD) entre o dentro de uno o más dominios de FVIII, dentro de bucles externos o en otros sitios en la secuencia de FVIII tales como, aunque sin limitación sitios de inserción identificados en la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o como se ilustra en las FIG. 8-9. Sin embargo, se cree que la incorporación de múltiples XTEN de longitudes cortas a intermedias en las composiciones de CFXTEN confiere propiedades potenciadas a las proteínas de fusión en comparación con proteínas de fusión de CFXTEN con el mismo número de aminoácidos en menos XTEN, pero de longitud más larga, aún produce composiciones con actividad procoagulante y semivida prolongada; cuyo fundamento se detalla en la presente memoria con respecto a los radios derivados de múltiples XTEN.

En los aspectos en los que las proteínas de fusión de CFXTEN comprenden múltiples secuencias de XTEN, la longitud acumulada de los residuos totales en las secuencias de XTEN es mayor de aproximadamente 100 a aproximadamente 3000, o aproximadamente 200 a aproximadamente 2000, o aproximadamente 400 a aproximadamente 1000 residuos aminoacídicos y los XTEN pueden ser idénticos o pueden ser diferentes en la secuencia, carga neta o en la longitud. En un aspecto de CFXTEN que comprende múltiples XTEN, las secuencias individuales de XTEN muestran cada una al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia o, como alternativa, un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con un motivo o un XTEN seleccionado de las tablas 3, 4 y 13-17 o un fragmento de los mismos, cuando se alinean de forma óptima con una secuencia de longitud comparable.

Como se describe más completamente a continuación, se divulgan métodos en que las CFXTEN se diseñan seleccionando la longitud del XTEN y su sitio de incorporación dentro de la CFXTEN para conferir una semivida diana, retención de la actividad procoagulante, unión reducida a inhibidores de FVIII o una propiedad fisicoquímica potenciada (por ejemplo, estabilidad o solubilidad) de una proteína de fusión de CFXTEN, se crean construcciones codificantes y se expresan y las proteínas de fusión de CFXTEN recombinantes se aíslan y recuperan. En general, longitudes acumuladas de XTEN mayores de aproximadamente 400 residuos incorporados en las composiciones de CFXTEN producen semivida más larga en comparación con longitudes acumuladas más cortas, por ejemplo, más cortas de aproximadamente 280 residuos. En un aspecto, se contemplan diseños de proteínas de fusión de CFXTEN que comprenden al menos un solo XTEN como vehículo, con una longitud de secuencia larga de al menos aproximadamente 400, o al menos aproximadamente 600, o al menos aproximadamente 800, o al menos aproximadamente 900 o al menos aproximadamente 1000 o más aminoácidos. En otro aspecto, se incorporan múltiples XTEN en la proteína de fusión para conseguir longitudes acumuladas de al menos aproximadamente 400, o al menos aproximadamente 600, o al menos aproximadamente 800, o al menos aproximadamente 900 o al menos aproximadamente 1000 o más aminoácidos, en la que los XTEN pueden ser idénticos o pueden ser diferentes en secuencia o longitud. Como se usa en la presente memoria, se pretende que "longitud acumulada" abarque la longitud total, en residuos aminoacídicos, cuando se incorpora más de un XTEN en la proteína de fusión de CFXTEN. Ambos aspectos anteriores se diseñan para conferir biodisponibilidad aumentada y/o semivida terminal aumentada después de administración a un sujeto en comparación con CFXTEN que comprende longitudes de XTEN acumuladas más cortas, que aún producen actividad procoagulante y efecto de hemostasia. Cuando se administran por vía subcutánea o intramuscular, la $C_{máx}$ se reduce, pero el área bajo la curva (ABC) se aumenta en comparación con una dosis comparable de una CFXTEN con un XTEN de longitud acumulada más corta o FVIII no unido a XTEN, contribuyendo de ese modo a la capacidad de mantener niveles eficaces de la composición de CFXTEN durante un periodo más

largo de tiempo y permitiendo periodos aumentados de 2, 4, 7, 10, 14 o 21 días entre dosificaciones, como se describe más completamente a continuación. Por tanto, el XTEN confiere la propiedad de un depósito a la CFXTEN administrada, además de las otras propiedades fisicoquímicas descritas en la presente memoria.

Cuando se usan XTEN como vehículo, la enseñanza aprovecha el descubrimiento de que aumentar la longitud de los polipéptidos no estructurados no repetitivos potencia la naturaleza no estructurada de los XTEN y por consiguiente potencia las propiedades físicas/químicas y farmacocinéticas de las proteínas de fusión que comprenden el vehículo de XTEN. Como se describe más completamente en los ejemplos, aumentos proporcionales en la longitud del XTEN, incluso si se crea mediante un orden repetido de motivos de secuencia de una sola familia (por ejemplo, los cuatro motivos AE de la tabla 3), producen una secuencia con un porcentaje mayor (por ejemplo, un 90 % o más) de formación de enrollamiento aleatorio, que se determina por el algoritmo de GOR, o contenido reducido de hélices alfa o láminas beta (por ejemplo, menos de un 2 %), que se determina por el algoritmo de Chou-Fasman, en comparación con longitudes de XTEN más cortas. Además, aumentar la longitud del compañero de fusión polipeptídico no estructurado, como se describe en los ejemplos, produce una proteína de fusión con un aumento desproporcionado en la semivida terminal (por ejemplo, como mucho 50, 100, 200 o más horas) en comparación con proteínas de fusión con compañeros polipeptídicos no estructurales con longitudes de secuencia más cortas. Las propiedades farmacocinéticas potenciadas de la CFXTEN en comparación con FVIII no unido a XTEN se describen más completamente a continuación.

En otro aspecto, la enseñanza proporciona métodos para crear XTEN de longitudes cortas o intermedias a partir de secuencias de XTEN "donadoras" más largas, en los que la secuencia de XTEN donadora más larga está truncada en el extremo N o el extremo C, o se crea un fragmento desde el interior de una secuencia donadora, produciendo de ese modo un XTEN de longitud corta o intermedia. En ejemplos no limitantes, como se representa esquemáticamente en la FIG. 16A-C, una secuencia AG de 864 residuos aminoacídicos puede truncarse para producir una secuencia AG con 144 residuos, una secuencia AG con 288 residuos, una secuencia AG con 576 residuos u otras longitudes intermedias, mientras que la secuencia AE de 864 residuos (como se representa en la FIG. 16D, E) puede truncarse para producir múltiples secuencias AE de 144 residuos, una secuencia AE con 288 o 576 residuos u otras longitudes más cortas o intermedias. Se contempla específicamente que dicha estrategia puede utilizarse con cualquiera de los aspectos de XTEN descritos en la presente memoria o con cualquiera de las secuencias enumeradas en las tablas 4 o 13-17 para producir XTEN de una longitud deseada. En aspectos preferidos, la CFXTEN que comprende múltiples XTEN tiene XTEN que muestran al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 91 %, o al menos aproximadamente un 92 %, o al menos aproximadamente un 93 %, o al menos aproximadamente un 94 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias seleccionas de AE42_1, AE42_2, AE42_3, AG42_1, AG42_2, AG42_3, AG42_4, AE144_1A, AE144_2A, AE144_2B, AE144_3A, AE144_3B, AE144_4A, AE144_4B, AE144_5A, AE144_6B, AG144_1, AG144_2, AG144_A, AG144_B, AG144_C, AG144_F, AG144_3, AG144_4, AE288_1, AE288_2, AG288_1, AG288_2 y AG288_DE.

4. Carga neta

En otros aspectos, la característica no estructurada de un polipéptido de XTEN puede potenciarse por incorporación de residuos aminoacídicos con una carga neta y/o reducción del porcentaje global (por ejemplo, menos de un 5 %, o un 4 %, o un 3 %, o un 2 % o un 1 %) de aminoácidos hidrófobos en la secuencia de XTEN. La carga neta global y la densidad de carga neta se controla modificando el contenido de aminoácidos cargados en las secuencias de XTEN, positivos o negativos, estando representada típicamente la carga neta como el porcentaje de aminoácidos en el polipéptido que contribuyen a un estado cargado más allá de aquellos residuos que se anulan por un residuo con una carga opuesta. En algunos aspectos, la densidad de carga neta de XTEN de las composiciones puede estar por encima de +0,1 o por debajo de -0,1 cargas/residuo. Por "densidad de carga neta" de una proteína o péptido en la presente memoria se entiende la carga neta dividida por el número total de aminoácidos en la proteína o polipéptido. En otros aspectos, la carga neta de un XTEN puede ser aproximadamente un 0 %, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 %, aproximadamente un 10 % aproximadamente un 11 %, aproximadamente un 12 %, aproximadamente un 13 %, aproximadamente un 14 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 16 %, aproximadamente un 17 %, aproximadamente un 18 %, aproximadamente un 19 %, o aproximadamente un 20 % o más. Basándose en la carga neta, algunos XTEN tienen un punto isoeléctrico (pI) de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 o incluso 6,5. En aspectos preferidos, el XTEN tendrá un punto isoeléctrico entre 1,5 y 4,5 y portará una carga neta negativa en condiciones fisiológicas.

Como la mayoría de tejidos y superficies en un ser humano o animal tienen una carga negativa neta, en algunos aspectos, las secuencias de XTEN se diseñan para que tengan una carga negativa neta para minimizar las interacciones no específicas entre las composiciones que contienen XTEN y diversas superficies tales como vasos sanguíneos, tejidos sanos o diversos receptores. Sin ligarse a una teoría particular, un XTEN puede adoptar conformaciones abiertas debidas a repulsión electrostática entre aminoácidos individuales del polipéptido de XTEN

que portan individualmente una carga negativa neta y que están distribuidos entre la secuencia del polipéptido de XTEN. En algunos aspectos, la secuencia de XTEN se diseña con al menos un 90 % o un 95 % de los residuos cargados separados por otros residuos tales como serina, alanina, treonina, prolina o glicina, que da lugar a una distribución más uniforme de la carga, mejor comportamiento de expresión o purificación. Dicha distribución de carga neta negativa en las longitudes de secuencia prolongadas de XTEN puede dar lugar a la conformación no estructura que, a su vez, puede provocar un aumento eficaz en el radio hidrodinámico. En aspectos preferidos, la carga negativa del presente XTEN se confiere mediante la incorporación de residuos de ácido glutámico. En general, los residuos de ácido glutámico se espacian uniformemente entre la secuencia de XTEN. En algunos casos, el XTEN puede contener aproximadamente 10-80, o aproximadamente 15-60, o aproximadamente 20-50 residuos de ácido glutámico por 20 kDa de XTEN, lo que puede producir un XTEN con residuos cargados que tendrían un pKa muy similar, que puede aumentar la homogeneidad de las cargas del producto y agudizar su punto isoeléctrico, potenciar las propiedades fisicoquímicas de la proteína de fusión de CFXTEN resultante para y, por tanto, simplificando, los procedimientos de purificación. Por ejemplo, cuando se desea un XTEN con una carga negativa, el XTEN puede seleccionarse únicamente de una secuencia de familia AE, que tiene aproximadamente un 17 % de carga neta debido al ácido glutámico incorporado, o puede incluir proporciones variables de motivos que contienen ácido glutámico de la tabla 3 para proporcionar el grado deseado de carga neta. Ejemplos no limitantes de XTEN AE incluyen, aunque sin limitación, las secuencias de la familia AE 36, 42, 144, 288, 576, 624, 864 y 912 de las tablas 4 y 14 o fragmentos de las mismas. En un aspecto, una secuencia de XTEN de las tablas 4 o 13-17 puede modificarse para incluir residuos de ácido glutámico adicionales para conseguir la carga neta negativa deseada. Por consiguiente, en un aspecto, la enseñanza proporciona un XTEN en que las secuencias de XTEN contienen aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 4 %, un 8 %, un 10 %, un 15 %, un 17 %, un 20 %, un 25 % o incluso aproximadamente un 30 % de ácido glutámico. En un aspecto, la enseñanza contempla la incorporación de hasta un 5 % de residuos de ácido aspártico en el XTEN además de ácido glutámico para conseguir una carga negativa neta.

En otros aspectos, cuando no se desea carga neta, el XTEN puede seleccionarse de, por ejemplo, componente de XTEN AG, tales como los motivos AG de la tabla 3, o aquellos motivos AM de la tabla 3 que no tienen carga neta. Ejemplos no limitantes de XTEN AG incluyen, aunque sin limitación, las secuencias de la familia AG 36, 42, 144, 288, 576 y 864 de las tablas 4 y 16, o fragmentos de las mismas. En otro aspecto, el XTEN pueden comprender proporciones variables de motivos AE y AG (para tener una carga neta que se considera óptima para un uso dado o para mantener una propiedad fisicoquímica dada.

Sin ligarse a una teoría particular, se espera que el XTEN de las composiciones de CFXTEN con la carga neta mayor tenga menos interacciones no específicas con diversas superficies cargadas negativamente tales como vasos sanguíneos, tejidos o diversos receptores, que contribuirían además a una eliminación activa reducida. A la inversa, se cree que el XTEN de las composiciones de CFXTEN con una baja carga neta (o ninguna) tendría un grado mayor de interacción con superficies que pueden potenciar la actividad del factor de coagulación asociado, dada la contribución conocida de la célula (por ejemplo, plaquetas) y las superficies vasculares al proceso de coagulación y la intensidad de activación de los factores de coagulación (Zhou, R., *et al*., Biomaterials (2005) 26(16):2965-2973; London, F., *et al*. Biochemistry (2000) 39(32):9850-9858).

El XTEN de las composiciones de la presente enseñanza en general tiene contenido nulo o bajo de aminoácidos cargados positivamente. En algunos aspectos, el XTEN puede tener menos de aproximadamente un 10 % de residuos aminoacídicos con una carga positiva, o menos de aproximadamente un 7 %, o menos de aproximadamente un 5 %, o menos de aproximadamente un 2 % o menos de aproximadamente un 1 % de residuos aminoacídicos con una carga positiva. Sin embargo, la enseñanza contempla construcciones donde un número limitado de aminoácidos con una carga positiva, tal como lisina, se incorporan en el XTEN para permitir la conjugación entre la épsilon amina de la lisina y un grupo reactivo en un péptido, un puente conector o un grupo reactivo en un fármaco o molécula pequeña a conjugar con la cadena principal de XTEN. En un aspecto de lo anterior, el XTEN de la presente CFXTEN tiene entre aproximadamente 1 a aproximadamente 100 residuos de lisina, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 70 residuos de lisina, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 residuos de lisina, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 residuos de lisina, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 residuos de lisina, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 residuos de lisina, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 residuos de lisina, o como alternativa únicamente un solo residuo de lisina. Usando el XTEN que contiene lisina anterior, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden XTEN, un factor de coagulación FVIII, más un agente quimioterápico u otro factor de coagulación o cofactor útil en el tratamiento de afecciones de coagulopatía, en el que el número máximo de moléculas del agente incorporadas en el componente de XTEN se determina por los números de lisinas u otros aminoácidos con cadenas laterales reactivas (por ejemplo, cisteína) incorporadas en el XTEN.

como los aminoácidos hidrófobos confieren estructura a un polipéptido, la enseñanza proporciona que el contenido de aminoácidos hidrófobos en el XTEN típicamente será de menos de un 5 %, o menos de un 2 %, o menos de un 1 % de contenido de aminoácidos hidrófobos. En un aspecto, el contenido de aminoácidos de metionina y triptófano en el componente de XTEN de una proteína de fusión de CFXTEN es típicamente de menos de un 5 %, o menos de un 2 % y mucho más preferiblemente menos de un 1 %. En otro aspecto, el XTEN de las presentes composiciones de CFXTEN tendrán una secuencia que tiene menos de un 10 % de residuos aminoacídicos con una carga positiva, o menos de aproximadamente un 7 %, o menos de aproximadamente un 5 %, o menos de aproximadamente un 2 % de

residuos aminoacídicos con una carga positiva, la suma de residuos de metionina y triptófano será de menos de un 2 % y la suma de residuos de asparagina y glutamina será de menos de un 5 % de la secuencia de XTEN total.

5. Baja inmunogenia

En otro aspecto, las secuencias de XTEN proporcionadas en la presente memoria tienen un bajo grado de inmunogenia o son sustancialmente no inmunógenas. Varios factores pueden contribuir a la baja inmunogenia del XTEN, por ejemplo, la secuencia no repetitiva, la conformación no estructurada, el alto grado de solubilidad, el bajo grado o ausencia de autoagregación, el bajo grado o ausencia de sitios proteolíticos dentro de la secuencia y el bajo grado o ausencia de epítopos en la secuencia de XTEN.

Se forman epítopos conformacionales mediante regiones de la superficie de la proteína que están compuestas de múltiples secuencias de aminoácidos discontinuas del antígeno proteínico. El plegamiento preciso de la proteína pone estas secuencias en una configuración espacial estable bien definida o epítopos, que pueden reconocerse como "exógenos" por el sistema inmunitario humoral del hospedador, provocando la producción de anticuerpos contra la proteína o la activación de la respuesta inmunitaria celular. En el último caso, la respuesta inmunitaria contra una proteína en un individuo está muy influida por el reconocimiento de epítopos de linfocitos T que es una función de la especificidad de unión a péptido del alotipo de HLA-DR del individuo. El acoplamiento de un complejo peptídico de MHC de clase II mediante un receptor de linfocitos T afín en la superficie de linfocito T, conjuntamente con la unión cruzada de otros determinados correceptores tales como la molécula CD4, puede inducir un estado activado dentro del linfocito T. La activación da lugar a la liberación de citocinas activando además otros linfocitos tales como linfocitos B para producir anticuerpos o activando linfocitos T citolíticos como una respuesta inmunitaria celular completa.

La capacidad de un péptido de unirse a una molécula de MHC de clase II dada para la presentación sobre la superficie de una APC (célula presentadora de antígeno) depende de varios factores; muy notablemente su secuencia primaria. En un aspecto, un menor grado de inmunogenia se consigue diseñando secuencias de XTEN que resisten el procesamiento antigénico en células presentadoras de antígeno y/o también eligiendo secuencias que no se unen a receptores de MHC. La enseñanza proporciona proteínas de fusión de CFXTEN con polipéptidos de XTEN sustancialmente no repetitivos diseñados para reducir la unión con receptores de MHC II, así como evitar la formación de epítopos para el receptor de linfocitos T o la unión del anticuerpo, provocando un bajo grado de inmunogenia. Evitar la inmunogenia puede contribuir, al menos en parte, a provocar la flexibilidad conformacional de las secuencias de XTEN; es decir, la ausencia de estructura secundaria debida a la selección y el orden de los residuos aminoacídicos. Por ejemplo, son de particular interés secuencias que tienen una baja tendencia a adaptar conformaciones plegadas de forma compacta en disolución acuosa o en condiciones fisiológicas que podrían producir epítopos conformacionales. La administración de proteínas de fusión que comprenden XTEN, usando prácticas terapéuticas convencionales y dosificación, en general no provocaría la formación de anticuerpos neutralizantes contra la secuencia de XTEN, y también reduciría la inmunogenia del compañero de fusión de FVIII en las composiciones de CFXTEN.

En un aspecto, las secuencias de XTEN utilizadas en las presentes proteínas de fusión pueden estar sustancialmente libres de epítopos reconocidos por linfocitos T humanos. La eliminación de dichos epítopos con el fin de generar proteínas menos inmunógenas se ha divulgado previamente; véase, por ejemplo, la publicación internacional WO 98/52976, la publicación internacional WO 02/079232 y la publicación internacional WO 00/3317. Se han descrito ensayos para epítopos de linfocitos T humanos (Stickler, M., *et al.* (2003) *J Immunol Methods,* 281: 95-108). Son de particular interés secuencias peptídicas que pueden oligomerizar sin generar epítopos de linfocitos T o secuencias no humanas. Esto se consigue ensayando repeticiones directas de estas secuencias para la presencia de epítopos de linfocito T y para la aparición de secuencias de 6 a 15 monómeros y, en particular, 9 monómeros que no son humanas, y después alterando el diseño de la secuencia de XTEN para eliminar o alterar la secuencia del epítopo. En algunos aspectos, las secuencias de XTEN son sustancialmente no inmunógenas por la restricción de los números de epítopos del XTEN previstos para unirse a receptores de MHC. Con una reducción en los números de epítopos que pueden unirse a receptores de MHC, hay una reducción simultánea en el potencial de activación de linfocitos T, así como la función auxiliar de linfocitos T, activación de linfocitos B reducida o regulación por aumento y producción reducida de anticuerpos. El bajo grado de epítopos de linfocitos T previstos puede determinarse por algoritmos de predicción de epítopos tales como, por ejemplo, TEPITOPE (Sturniolo, T., *et al.* (1999) Nat Biotechnol, 17: 555-61), como se muestra en el ejemplo 46. La puntuación de TEPITOPE de un tramo peptídico dado dentro de una proteína es el logaritmo de la K_d (constante de disociación, afinidad, tasa de disociación) de la unión de ese tramo peptídico a múltiples alelos de MHC humanos más comunes, como se divulga en Sturniolo, T. *et al.* (1999) *Nature Biotechnology* 17:555). La puntuación varía sobre al menos 20 logaritmos, de aproximadamente 10 a aproximadamente -10 (correspondiente a restricciones de unión de $10e^{10}$ K_d a $10e^{-10}$ K_d), y puede reducirse evitando aminoácidos hidrófobos que sirven como residuos de anclaje durante la presentación del péptido en MHC, tales como M, I, L, V, F. En algunos aspectos, un componente de XTEN incorporado en una CFXTEN no tiene un epítopo de linfocitos T previsto a una puntuación de umbral de TEPITOPE de aproximadamente -5, o -6, o -7, o -8, o -9, o a una puntuación de TEPITOPE de -10. Como se usa en la presente memoria, una puntuación de "-9" es un umbral de TEPITOPE más riguroso que una puntuación de -5.

En otro aspecto, las secuencias de XTEN de la enseñanza, incluyendo aquellas incorporadas en las presentes proteínas de fusión de CFXTEN, se vuelven sustancialmente inmunógenas por la restricción de los sitios proteolíticos conocidos de la secuencia del XTEN, reduciendo el procesamiento de XTEN en péptidos pequeños que pueden unirse a receptores de MHC II. En otro aspecto, la secuencia de XTEN se vuelve sustancialmente no inmunógena por el uso de una secuencia que está sustancialmente desprovista de estructura secundaria, confiriendo resistencia a muchas proteasas debido a la alta entropía de la estructura. Por consiguiente, la puntuación de TEPITOPE reducida y la eliminación de sitios proteolíticos conocidos del XTEN hacen que las composiciones de XTEN, incluyendo el XTEN de las composiciones de proteína de fusión de CFXTEN, no pueda unirse sustancialmente a receptores de mamífero, incluyendo aquellos del sistema inmunitario o receptores de eliminación activos dirigidos a FVIII. En un aspecto, un XTEN de una proteína de fusión de CFXTEN puede tener >100 nM K_d de unión a un receptor de mamífero, o más de 500 nM K_d, o más de 1 µM K_d hacia un receptor de superficie celular de mamífero o receptor polipeptídico en circulación.

Adicionalmente, la secuencia no repetitiva y la correspondiente ausencia de epítopos de XTEN limitan la capacidad de los linfocitos B de unirse a o activarse por XTEN. Se reconoce una secuencia repetitiva y puede formar contactos multivalentes con incluso unos pocos linfocitos B y, como consecuencia de la reticulación de múltiples receptores independientes de linfocitos T, puede estimular la proliferación de linfocitos B y la producción de anticuerpos. Por el contrario, aunque un XTEN puede hacer contactos con muchos linfocitos B diferentes sobre su secuencia prolongada, cada linfocito B individual únicamente puede hacer uno o un pequeño número de contactos con un XTEN individual debido a la ausencia de repetitividad de la secuencia. Sin limitarse a teoría alguna, los XTEN típicamente tienen una tendencia mucho menor a estimular la proliferación de linfocitos B y, por tanto, una respuesta inmunitaria. En un aspecto, la CFXTEN tiene inmunogenia reducida en comparación con el FVIII correspondiente que no está fusionado a un XTEN. En un aspecto, la administración de hasta tres dosis parenterales de una CFXTEN a un mamífero provoca IgG anti-CFXTEN detectable a una dilución de suero de 1:100, pero no a una dilución de 1:1000. En otro aspecto, la administración de hasta tres dosis parenterales de una CFXTEN a un mamífero provoca IgG anti-FVIII detectable a una dilución de suero de 1:100, pero no a una dilución de 1:1000. En otro aspecto, la administración de hasta tres dosis parenterales de una CFXTEN a un mamífero provoca IgG anti-XTEN detectable a una dilución de suero de 1:100, pero no a una dilución de 1:1000. En los aspectos anteriores, el mamífero puede ser un ratón, una rata, un conejo o un macaco.

Una característica adicional de los XTEN con secuencias no repetitivas con respecto a secuencias con un alto grado de repetitividad es que los XTEN no repetitivos forman contactos más débiles con anticuerpos. los anticuerpos son moléculas multivalentes. Por ejemplo, las IgG tienen dos sitios de unión idénticos y las IgM contienen 10 sitios de unión idénticos. Por tanto, los anticuerpos contra secuencias repetitivas pueden formar contactos multivalentes con dichas secuencias repetitivas con alta avidez, lo que puede afectar a la potencia y/o eliminación de dichas secuencias repetitivas. Por el contrario, anticuerpos contra XTEN no repetitivos pueden producir interacciones monovalentes, provocando menor probabilidad de eliminación inmunitaria de modo que las composiciones de CFXTEN pueden permanecer en circulación durante un periodo aumentado de tiempo. Además, se cree, como se retrató esquemáticamente en la FIG. 6, que la naturaleza no estructurada flexible del XTEN proporciona blindaje estérico de las regiones de FVIII proximales al sitio de inserción de XTEN y proporcionando impedancia estérica a la unión por inhibidores de FVIII.

En otro aspecto, un presente XTEN útil como un compañero de fusión tiene un radio hidrodinámico elevado; una propiedad que en algunos aspectos confiere un peso molecular aparente correspondientemente aumentado a la proteína de fusión de CFXTEN que incorpora el XTEN, mientras que en otros aspectos potencia la impedancia estérica a inhibidores de FVIII y a anticuerpos anti-FVIII, reduciendo su capacidad de unirse a CFXTEN. Como se detalla en el ejemplo 26, la unión de XTEN a secuencias proteínicas terapéuticas produce composiciones de CFXTEN que pueden tener radios hidrodinámicos aumentados, peso molecular aparente aumentado y factor de peso molecular aparente aumentado en comparación con una proteína terapéutica no unida a un XTEN. Por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas en que se desea semivida prolongada, composiciones en que se incorpora un XTEN con un radio hidrodinámico elevado en una proteína de fusión que comprende una proteína terapéutica pueden agrandar de forma eficaz el radio hidrodinámico de la composición más allá del tamaño de poro glomerular de aproximadamente 3-5 nm (correspondiente a un peso molecular aparente de aproximadamente 70 kDa) (Caliceti. 2003. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. Adv Drug Deliv Rev 55:1261-1277), provocando una eliminación renal reducida de las proteínas en circulación con un aumento correspondiente en la semivida terminal y otras propiedades farmacocinéticas potenciadas. El radio hidrodinámico de una proteína se confiere por su peso molecular, así como por su estructura, incluyendo la forma y la compactación. Sin ligarse a una teoría particular, el XTEN puede adoptar conformaciones abiertas debido a la repulsión electrostática entre las cargas individuales del péptido o la flexibilidad inherente conferida por los aminoácidos particulares en la secuencia que carece de potencial de conferir estructura secundaria. La conformación abierta, prolongada y no estructurada del polipéptido de XTEN puede tener un mayor radio hidrodinámico proporcional en comparación con polipéptidos de una longitud de secuencia y/o peso molecular comparables que tienen estructuras secundarias y/o terciaria, tales como proteínas globulares típicas. Los métodos para determinar el radio hidrodinámico son bien conocidos en la técnica, tal como mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 6406632 y 7294513. El ejemplo 26 demuestra que aumentos en la longitud de XTEN provocan un aumento proporcional en el

radio hidrodinámico, el peso molecular aparente y/o el factor de peso molecular aparente y, por tanto, permiten personalizar la CFXTEN a los valores de corte deseados de pesos moleculares aparentes o radios hidrodinámicos. Por consiguiente, en determinados aspectos, la proteína de fusión de CFXTEN puede configurarse con un XTEN de modo que la proteína de fusión pueda tener un radio hidrodinámico de al menos aproximadamente 5 nm, o al menos aproximadamente 8 nm, o al menos aproximadamente 10 nm, o aproximadamente 12 nm, o aproximadamente 15 nm, o aproximadamente 20 nm, o aproximadamente 30 nm o más. En los aspectos anteriores, el radio hidrodinámico grande conferido por la XTEN en una proteína de fusión de CFXTEN puede dar lugar a eliminación reducida de la proteína de fusión resultante, un aumento en la semivida terminal y un aumento en la media del tiempo de residencia.

En general, el peso molecular real de la forma madura del componente de FVIII es de aproximadamente 265 kDa, mientras que en el caso de un FVIII BDD, es de aproximadamente 165 kDa. El peso molecular real de una proteína de fusión de CFXTEN para que comprenda un FVIII BDD más uno o más XTEN varía de aproximadamente 200 a aproximadamente 270 kDa, dependiendo de la longitud de los componentes de XTEN. Como se describe en los ejemplos, cuando los pesos moleculares de las proteínas de fusión de CFXTEN se obtienen de análisis de cromatografía de exclusión por tamaño, la conformación abierta del XTEN debido al bajo grado de estructura secundaria provoca un aumento en el peso molecular aparente de las proteínas de fusión en que se incorporan. En algunos aspectos, la CFXTEN que comprende un FVIII y al menos uno o más XTEN muestra un peso molecular aparente de al menos aproximadamente 400 kDa, o al menos aproximadamente 500 kDa, o al menos aproximadamente 700 kDa, o al menos aproximadamente 1000 kDa, o al menos aproximadamente 1400 kDa, o al menos aproximadamente 1600 kDa, o al menos aproximadamente 1800 kDa, o al menos aproximadamente 2000 kDa. Por consiguiente, las proteínas de fusión de CFXTEN que comprenden uno o más XTEN muestran un peso molecular aparente que es aproximadamente 1,3 veces mayor, o aproximadamente 2 veces mayor, o aproximadamente 3 veces mayor o aproximadamente 4 veces mayor, o aproximadamente 8 veces mayor, o aproximadamente 10 veces mayor, o aproximadamente 12 veces mayor, o aproximadamente 15 veces mayor que el peso molecular real de la proteína de fusión. En un aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN aislada de cualquiera de los aspectos divulgados en la presente memoria muestra un factor de peso molecular aparente en condiciones fisiológicas que es mayor de aproximadamente 1,3, o aproximadamente 2, o aproximadamente 3, o aproximadamente 4, o aproximadamente 5, o aproximadamente 6, o aproximadamente 7, o aproximadamente 8, o aproximadamente 10 o mayor de aproximadamente 15. En otro aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN tiene, en condiciones fisiológicas, un factor de peso molecular aparente que es de aproximadamente 3 a aproximadamente 20, o es de aproximadamente 5 a aproximadamente 15, o es de aproximadamente 8 a aproximadamente 12, o es de aproximadamente 9 a aproximadamente 10 con respecto al peso molecular real de la proteína de fusión. Se cree que el peso molecular aparente aumentado de las presentes composiciones de CFXTEN potencia las propiedades farmacocinéticas de las proteínas de fusión por una combinación de factores, que incluyen eliminación activa reducida, unión reducida por inhibidores de FVIII y pérdida reducida en hemorragia capilar y venosa.

IV). Composiciones de CFXTEN

La presente enseñanza proporciona composiciones que comprenden proteínas de fusión que tienen factor VIII unido a una o más secuencias de XTEN, en las que la proteína de fusión actúa remplazando o aumentando la cantidad de FVIII existente en la vía de coagulación intrínseca o activada por contacto cuando se administra a un sujeto. La enseñanza aborda una antigua necesidad de aumentar la semivida terminal de factor VIII administrado de forma exógena a un sujeto que lo necesita. Una manera para aumentar la semivida en circulación de una proteína terapéutica es asegurar que la eliminación renal o metabolismo de la proteína se reduzca. Otra manera para aumentar la semivida terminal es deducir la eliminación activa de la proteína terapéutica, ya sea mediada por receptores, metabolismo activo de la proteína u otros mecanismos endógenos. Ambas pueden conseguirse conjugando la proteína a un polímero que, por un lado, puede conferir un tamaño molecular (o radio hidrodinámico) aumentado a la proteína y, por tanto, eliminación renal reducida y, por otro lado, impide la unión de la proteína a los receptores de eliminación u otras proteínas que contribuyen al metabolismo o la eliminación. Por tanto, determinados objetivos de la presente enseñanza incluyen, aunque sin limitación, proporcionar moléculas de FVIII mejoradas con una semivida en circulación o terminal más larga, disminuir el número o frecuencia de administraciones necesarias de composiciones de FVIII, retener al menos una parte de la actividad en comparación con el factor VIII de coagulación nativo y/o potenciar la capacidad de tratar las deficiencias de la coagulación y la hemorragias incontroladas de forma más eficiente, más económicamente y/o con mayor seguridad en comparación con las preparaciones de factor VIII actualmente disponibles.

Por consiguiente, la presente enseñanza proporciona composiciones de proteína de fusión de factor VIII recombinante que comprenden un FVIII unido covalentemente a uno o más polipéptidos recombinantes prolongados ("XTEN"), produciendo una composición de proteína de fusión de CFXTEN. El término "CFXTEN", como se usa en la presente memoria, pretende abarcar polipéptidos de fusión que comprenden al menos una región de carga que comprende un FVIII o una porción de un FVIII que es capaz de actividad procoagulante asociada con un factor de coagulación FVIII y al menos otra región que comprende uno o más polipéptidos XTEN que pueden estar intercalados dentro de la región de carga y/o unidos al extremo. En un aspecto, el FVIII es FVIII nativo. En otro aspecto, el FVIII es una variante de secuencia, fragmento, homólogo o mimético de una secuencia natural que retiene al menos una parte de la actividad procoagulante de FVIII nativo, como se divulga en la presente memoria. Ejemplos no limitantes de FVIII adecuados para su inclusión en las composiciones incluyen las secuencias de la tabla 1 o secuencias que tienen al menos un

80 %, o al menos un 90 %, o al menos un 91 %, o al menos un 92 %, o al menos un 93 %, o al menos un 94 %, o al menos un 95 %, o al menos un 96 %, o al menos un 97 %, o al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de la tabla 1. En un aspecto preferido, el FVIII es una variante de secuencia de FVIII con el dominio B eliminado (BDD), tal como las secuencias BDD de la tabla 1 u otras de dichas secuencias conocidas en la técnica. En otro aspecto preferido, la CFXTEN comprende una variante de secuencia de FVIII con el dominio B eliminado (BDD) expresada con la secuencia señal de 19 aminoácidos nativa, que se escinde durante la maduración de la proteína.

Las composiciones de la enseñanza incluyen proteínas de fusión que son útiles, cuando se administran a un sujeto que lo necesita, para mediar o prevenir o mejorar una afección asociada con deficiencias del factor VIII o defectos en FVIII producido de forma endógena, o trastornos hemorrágicos asociados con traumatismo, cirugía, deficiencias o defectos del factor VIII. Son de particular interés composiciones de proteína de fusión de CFXTEN para las que se busca un aumento en un parámetro farmacocinético, solubilidad aumentada, estabilidad aumentada o alguna otra propiedad farmacéutica potenciada en comparación con FVIII nativo, o para las que aumentar la semivida terminal mejoraría la eficacia, seguridad o provocaría una frecuencia de dosificación reducida y/o mejoraría el tratamiento del paciente. Las proteínas de fusión de CFXTEN de los aspectos divulgados en la presente memoria muestran una o más o cualquier combinación de las propiedades mejoradas y/o los aspectos que se detallan en la presente memoria. En algunos aspectos, las composiciones de fusión de CFXTEN permanecen a un nivel por encima de un valor umbral de al menos 0,01-0,05, o de 0,05 a 0,1, o de 0,1 a 0,4 UI/ml cuando se administra a un sujeto, durante un periodo más largo de tiempo en comparación con un FVIII no unido a XTEN y administrado a una dosis comparable a un sujeto que lo necesita (por ejemplo, un sujeto tal como un ser humano o ratón o mono con hemofilia A).

El FVIII de las presentes composiciones, particularmente las divulgadas en la tabla 1, conjuntamente con sus secuencias de ácido nucleico y aminoácidos correspondientes, están disponibles en bases de datos públicas tales como Chemical Abstracts Services Databases (por ejemplo, el Registro CAS), GenBank, la Universal Protein Resource (UniProt), bases de datos proporcionadas por suscripción tales como GenSeq (por ejemplo, Derwent), así como en la bibliografía de patentes y principal. Las secuencias polinucleotídicas aplicables para expresar las presentes secuencias de CFXTEN pueden ser una secuencia polinucleotídica de tipo silvestre que codifica un FVIII dado (por ejemplo, de longitud completa o maduro) o, en algunos casos, la secuencia puede ser una variante de la secuencia polinucleotídica de tipo silvestre (por ejemplo, un polinucleótido que codifica la proteína biológicamente activa de tipo silvestre, en el que la secuencia de ADN del polipéptido se ha optimizado, por ejemplo, para su expresión en una especie particular, o un polinucleótido que codifica una variante de la proteína de tipo silvestre, tal como un mutante dirigido al sitio o una variante alélica. Pertenece a las capacidades de los expertos en la materia el uso de una secuencia de ADNc de tipo silvestre o consenso o una variante de codones optimizados de un FVIII para crear construcciones de CFXTEN contempladas por la enseñanza usando métodos conocidos en la técnica y/o junto con las directrices y métodos proporcionados en la presente memoria, y descritos más completamente en los ejemplos.

En un aspecto, una proteína de fusión de CFXTEN comprende una sola molécula de FVIII que muestra al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de la tabla 1 unida a un solo XTEN (por ejemplo, un XTEN como describe anteriormente) incluyendo, aunque sin limitación, secuencias de la familia AE o AG con 42, 144, 288, 576 o 864 aminoácidos, como se expone en la tabla 4. En otro aspecto, la CFXTEN comprende un solo FVIII unido a dos XTEN, en la que los XTEN pueden ser idénticos o pueden ser diferentes. En otro aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN comprende una sola molécula de FVIII unida a uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más secuencias de XTEN, en que el FVIII es una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia proteínica seleccionada de la tabla 1, cuando se alinean de forma óptima, y el uno o más XTEN tienen cada uno al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con una o más secuencias seleccionadas de una cualquiera de las tablas 3, 4 y 13-17, cuando se alinean de forma óptima. En el aspecto anterior, donde la CFXTEN tiene dos o más XTEN, los XTEN pueden ser idénticos o pueden ser secuencias diferentes. En otro aspecto más, la proteína de fusión de CFXTEN comprende un solo FVIII que muestra al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con secuencias de longitud comparables seleccionadas de la tabla 1, cuando se alinean de forma óptima, con las partes intercaladas con y unidas por tres, cuatro, cinco, seis o más secuencias de XTEN que pueden ser idénticas o pueden ser diferentes y en la que cada uno tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con secuencias seleccionadas de una cualquiera de

las tablas 3, 4 y 13-17, o fragmentos de las mismas, cuando se alinean de forma óptima. En otro aspecto más, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de CFXTEN que comprende una secuencia con al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de la tabla 21 cuando se alinean de forma óptima.

1. Configuraciones de proteína de fusión de CFXTEN

La enseñanza proporciona composiciones de proteína de fusión de CFXTEN con los componentes de CF y XTEN unidos en configuraciones de extremo N a C.

En un aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de fórmula I:

$$(XTEN)_x\text{-}CF\text{-}(XTEN)_y \qquad I$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, CF es un factor VIII como se define en la presente memoria, incluyendo secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias de la tabla 1; x es 0 o 1 e y es 0 o 1, en la que x+y ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4. Por consiguiente, la composición de fusión CFXTEN puede tener las configuraciones XTEN-CF, XTEN-CF-XTEN o CF-XTEN.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de fórmula II:

$$(XTEN)_x\text{-}(S)_x\text{-}(CF)\text{-}(XTEN)_y \qquad II$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, CF es un factor VIII como se define en la presente memoria, incluyendo secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 1; S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que opcionalmente pueden incluir una secuencia de escisión o aminoácidos compatibles con sitios de restricción; x es 0 o 1 e y es 0 o 1, en la que x+y ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante, en la que la proteína de fusión es de fórmula III:

$$(XTEN)_x\text{-}(S)_x\text{-}(CF)\text{-}(S)_y\text{-}(XTEN)_y \qquad III$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, CF es un factor VIII como se define en la presente memoria, incluyendo secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 1; S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que opcionalmente pueden incluir una secuencia de escisión o aminoácidos compatibles con sitios de restricción; x es 0 o 1 e y es 0 o 1, en la que x+y ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula IV:

$$(A1)\text{-}(XTEN)_u\text{-}(A2)\text{-}(XTEN)_v\text{-}(B)\text{-}(XTEN)_w\text{-}(A3)\text{-}(XTEN)_x\text{-}(C1)\text{-}(XTEN)_y\text{-}(C2)\text{-}(XTEN)_z \qquad IV$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, A1 es un dominio A1 de FVIII; A2 es un dominio A2 de FVIII; A3 es un dominio A3 de FVIII; B es un dominio B de FVIII que puede ser un fragmento o una variante de corte y empalme del dominio B; C1 es un dominio C1 de FVIII; C2 es un dominio C2 de FVIII; v es 0 o 1; w es 0 o 1; x es 0 o 1; y es 0 o 1; y es 0 o 1; con la condición de que u + v + x + y + z ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula V:

$$(XTEN)_t\text{-}(S)_a\text{-}(A1)\text{-}(S)_b\text{-}(XTEN)_u\text{-}(S)_b\text{-}(A2)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_c\text{-}(B)\text{-}(S)_d\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_d\text{-}(A3)\text{-}(S)_e\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_e\text{-}(C1)\text{-}(S)_f\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_f\text{-}(C2)\text{-}(S)_g\text{-}(XTEN)_z \quad \text{V}$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, A1 es un dominio A1 de FVIII; A2 es un dominio A2 de FVIII; A3 es un dominio A3 de FVIII; B es un dominio B de FVIII que puede ser un fragmento o una variante de corte y empalme del dominio B; C1 es un dominio C1 de FVIII; C2 es un dominio C2 de FVIII; S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que opcionalmente pueden incluir una secuencia de escisión o aminoácidos compatibles con sitios de restricción; a es 0 o 1; b es 0 o 1; c es 0 o 1; d es 0 o 1; e es 0 o 1; f es 0 o 1; g es 0 o 1; t es 0 o 1; u es 0 o 1; v es 0 o 1; w es 0 o 1; x es 0 o 1; y es 0 o 1; z es 0 o 1; con la condición de que t + u + v + w+ x + y + z ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4. En otro caso de fórmula V, la secuencia espaciadora es glicina o una secuencia seleccionada de las tablas 11 y 12.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula VI:

$$(XTEN)_u\text{-}(S)_a\text{-}(A1)\text{-}(S)_b\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_b\text{-}(A2)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_c\text{-}(A3)\text{-}(S)_d\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_d\text{-}(C1)\text{-}(S)_e\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_e\text{-}(C2)\text{-}(S)_f\text{-}(XTEN)_z \quad \text{VI}$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, A1 es un dominio A1 de FVIII; A2 es un dominio A2 de FVIII; A3 es un dominio A3 de FVIII; C1 es un dominio C1 de FVIII; C2 es un dominio C2 de FVIII; S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que opcionalmente pueden incluir una secuencia de escisión o aminoácidos compatibles con sitios de restricción; a es 0 o 1; b es 0 o 1; c es 0 o 1; d es 0 o 1; e es 0 o 1; f es 0 o 1; u es 0 o 1; v es 0 o 1; w es 0 o 1; x es 0 o 1; y es 0 o 1; z es 0 o 1; con la condición de que u + v + w+ x + y + z ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4. En otro aspecto de fórmula V, la secuencia espaciadora es glicina o una secuencia seleccionada de las tablas 11 y 12.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula VII:

$$(SP)\text{-}(XTEN)_x\text{-}(CS)_x\text{-}(S)_x\text{-}(FVIII_1\text{-}745)\text{-}(S)_y\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_y\text{-}(FVIII_1635\text{-}2332)\text{-}(S)_z\text{-}(CS)_z\text{-}(XTEN)_z \quad \text{VII}$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, SP es un péptido señal, preferiblemente con la secuencia MQIELSTCFFLCLLRFCFS (SEQ ID NO: 1611), CS es una secuencia de escisión enumerada en la tabla 12, S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que pueden incluir opcionalmente aminoácidos compatibles con sitios de restricción, "FVIII_1-745" es los residuos 1-745 del factor FVIII y "FVIII_1635-2332" es los residuos 1635-2332 de FVIII, x es 0 o 1, y es 0 o 1 y z es 0 o 1, en la que x+y+z >2; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4. En un aspecto de fórmula VII la secuencia espaciadora es GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). En otro aspecto de fórmula V, la secuencia espaciadora es glicina o una secuencia seleccionada de las tablas 11 y 12.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula VIII:

$$(A1)\text{-}(S)_a\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_a\text{-}(A2)\text{-}(B1)\text{-}(S)_b\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_b\text{-}(B2)\text{-}(A3)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_c\text{-}(C1)\text{-}(S)_d\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_d\text{-}(C2)\text{-}(S)_e\text{-}(XTEN)_z \quad \text{VIII}$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, A1 es un dominio A1 de FVIII; A2 es un dominio A2 de FVIII; B1 es un fragmento del dominio B que puede tener del residuo 741 a 743-750 de FVIII o como alternativa de aproximadamente el residuo 741 a aproximadamente el residuo 745 de FVIII; B2 es un fragmento del dominio B que puede tener de los residuos 1635-1686 a 1689 de FVIII o como alternativa de aproximadamente el residuo 1640 a aproximadamente el residuo 1689 de FVIII; A3 es un dominio A3 de FVIII; C1 es un dominio C1 de FVIII; C2 es un dominio C2 de FVIII; S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que opcionalmente pueden incluir una secuencia de escisión o aminoácidos compatibles con sitios de restricción; a es 0 o 1; b es 0 o 1; c es 0 o 1; d es 0 o 1; e es 0 o 1; f es 0 o 1; u es 0 o 1; v es 0 o 1; w es 0 o 1; x es 0 o 1; y es 0 o 1; z es 0 o 1; con la condición de que u + v + w+ x + y + z ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con secuencias expuestas en la tabla 4. En un aspecto de fórmula VIII la secuencia espaciadora es GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). En otro aspecto de fórmula V, la secuencia espaciadora es glicina o una secuencia seleccionada de las tablas 11 y 12.

En otro aspecto de la composición de CFXTEN, la enseñanza proporciona una proteína de fusión de factor VIII recombinante de fórmula IX:

$$(A1_N)\text{-}(S)_a\text{-}(XTEN)_t\text{-}(S)_b\text{-}(AI_C)\text{-}(A2_N)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_u\text{-}(S)_d\text{-}(A2_C)\text{-}(B_N)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_f\text{-}(B_C)\text{-}(A3_N)\text{-}(S)_g\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_h\text{-}(A3_C)\text{-}(C1_N)\text{-}(S)_i\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_j\text{-}(C1_C)\text{-}(C2_N)\text{-}(S)_k\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_l\text{-}(C2_C)\text{-}(S)_m\text{-}(XTEN)_z \quad \text{IX}$$

en la que independientemente para cada vez que aparece, $A1_N$ es un fragmento del dominio A1 desde al menos el residuo número 1 (numerado con respecto a FVIII maduro nativo) a no más del residuo número 371, $A1_c$ es un fragmento del dominio A1 desde al menos el residuo número 2 a no más del residuo número 372; $A2_N$ es un fragmento del dominio A2 desde al menos el residuo número 373 a no más del residuo número 739, $A2_c$ es un fragmento del dominio A2 desde al menos el residuo número 374 a no más del residuo número 740; B_N es un fragmento del dominio B de al menos el residuo número 741 a no más del residuo número 1647, B_c es un fragmento del dominio B desde al menos el residuo número 742 a no más del residuo número 1648; $A3_N$ es un fragmento del dominio A3 desde al menos el residuo número 1649 a no más del residuo número 2019, $A3_c$ es un fragmento del dominio A3 desde al menos el residuo número 1650 a no más del residuo número 2019; $C1_N$ es un fragmento del dominio C1 desde al menos el residuo número 2020 a no más del residuo número 2171, $C1_c$ es un fragmento del dominio C1 desde al menos el residuo número 2021 a no más del residuo número 2172; $C2_N$ es un fragmento del dominio C2 desde al menos el residuo número 2173 a no más del residuo número 2331, $C2_c$ es un fragmento del dominio C2 desde al menos el residuo 2174 a no más del residuo número 2332; S es una secuencia espaciadora que tiene entre 1 y aproximadamente 50 residuos aminoacídicos que opcionalmente pueden incluir una secuencia de escisión o aminoácidos compatibles con sitios de restricción; a es 0 o 1; b es 0 o 1; c es 0 o 1; d es 0 o 1; e es 0 o 1; f es 0 o 1; g es 0 o 1; h es 0 o 1; i es 0 o 1; j es 0 o 1; k es 0 o 1; l es 0 o 1; m es 0 o 1; t es 0 o 1; u es 0 o 1; v es 0 o 1; w es 0 o 1; x es 0 o 1; y es 0 o 1; z es 0 o 1 con la condición de que t + u + v + w+ x + y + z ≥1; y XTEN es un polipéptido recombinante prolongado como se describe en la presente memoria incluyendo, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos un 90% de identidad con secuencias expuestas en la tabla 4. En un aspecto de fórmula IX la secuencia espaciadora es GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). En otro aspecto de fórmula IX, la secuencia espaciadora es glicina o una secuencia seleccionada de las tablas 11 y 12.

Los aspectos de fórmulas IV-VIII abarcan configuraciones de CFXTEN en las que uno o más XTEN de longitudes que varían de aproximadamente 6 aminoácidos a ≥ 1000 aminoácidos (por ejemplo, secuencias seleccionadas de una cualquiera de las tablas 3, 4 y 13-17 o fragmentos de las mismas, o secuencias que muestran al menos aproximadamente un 90-99 % o más de identidad de secuencia con las mismas) se insertan y unen entre dominios limítrofes de factor VIII y se unen al extremo N o C del FVIII. En otros aspectos de fórmulas V-VIII, la enseñanza proporciona además configuraciones en las que el XTEN se une a dominios de FVIII mediante secuencias espaciadoras que pueden comprender opcionalmente aminoácidos compatibles con sitios de restricción o pueden incluir secuencias de escisión (por ejemplo, las secuencias de las tablas 11 y 12, descritas más completamente a continuación) de modo que la secuencia codificante del XTEN puede integrarse, en el caso de un sitio de restricción, en una construcción de CFXTEN y, en el caso de una secuencia de escisión, el XTEN puede liberarse de la proteína de fusión mediante la acción de una proteasa apropiada para la secuencia de escisión.

Los aspectos de fórmulas IV-VIII difieren de los de fórmula V por que el componente de FVIII de fórmulas VI-VIII es únicamente las formas con el dominio B eliminado ("FVIII BDD") del factor VIII que retiene secuencias residuales

cortas del dominio B, cuyos ejemplos no limitantes de secuencias se proporcionan en la tabla 1, en las que uno o más XTEN o fragmentos de XTEN de longitudes que varían de aproximadamente 6 aminoácidos a ≥ 1000 aminoácidos (por ejemplos secuencias seleccionadas de una cualquiera de las tablas 3, 4 y 13-17) se insertan y unen entre dominios limítrofes del factor VIII y/o entre los remanentes de los residuos del domino B, tales como los de la tabla 8. El aspecto de fórmula IX en general difiere de los de las otras fórmulas por que el uno o más XTEN se insertan cada uno dentro de dominios de FVIII en lugar de entre dominios, y/o tiene un XTEN unido al extremo C del FVIII (o se une mediante una secuencia espaciadora al extremo C del FVIII).

En algunos aspectos de una CFXTEN, la proteína de fusión comprende una forma de dominio B eliminado de FVIII, en la que la eliminación del dominio B empieza en una primera posición en aproximadamente el residuo aminoacídico número 745 y finaliza en una segunda posición en el residuo aminoacídico número 1635 a aproximadamente 1690 con referencia a la secuencia de factor VIII humano de longitud completa y un XTEN une la primera posición y la segunda posición de la eliminación del dominio B. En un aspecto de lo anterior, la primera posición y la segunda posición de la eliminación del dominio B se seleccionan de las posiciones de la tabla 8. En otro aspecto de lo anterior, al menos un XTEN une la primera y segunda posición en el que el al menos un XTEN une el residuo aminoacídico del factor VIII 745 y el residuo aminoacídico 1640, o el residuo aminoacídico 741 y el residuo aminoacídico 1640, o el residuo aminoacídico 741 y el residuo aminoacídico 1690, o el residuo aminoacídico 745 y el residuo aminoacídico 1667, o el residuo aminoacídico 745 y el residuo aminoacídico 1657, o el residuo aminoacídico 745 y el residuo aminoacídico 1657, o el residuo aminoacídico 747 y el residuo aminoacídico 1642, o el residuo aminoacídico 751 y el residuo aminoacídico 1667. En un aspecto de la CFXTEN, en el que el factor VIII comprende un XTEN que une una primera posición y una segunda posición en una eliminación de dominio B descrita en los aspectos de este párrafo, el XTEN es una secuencia que tiene al menos un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de longitud comparable seleccionada de una cualquiera de la tabla 4, tabla 13, tabla 14, tabla 15, tabla 16 y tabla 17, cuando se alinean de forma óptima, en la que la CFXTEN retiene al menos aproximadamente un 30 %, o al menos aproximadamente un 40 %, o al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % de la actividad procoagulante de FVIII nativo.

La enseñanza contempla todas las permutaciones posibles de inserciones de XTEN entre o dentro de los dominios de FVIII o en o proximales a los puntos de inserción de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o las ilustradas en las FIG. 8-9, con unión opcional de un XTEN adicional al extremo N o C del FVIII, opcionalmente unido mediante una secuencia de escisión adicional seleccionada de la tabla 12, que produce una composición de CFXTEN; cuyos ejemplos no limitantes se retratan en las FIG. 5 y 12. En un aspecto, la CFXTEN comprende una secuencia de FVIII BDD de la tabla 1 en que uno o más XTEN que tienen cada uno al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % o más de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de una cualquiera de las tablas 3, 4 y 13-17 o fragmentos de los mismas se insertan entre dos cualesquiera de los aminoácidos del dominio B residual de la secuencia de FVIII BDD, produciendo una proteína de fusión de FVIII monocatenaria, en la que la CFXTEN retiene al menos aproximadamente un 30 %, o al menos aproximadamente un 40 %, o al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % de la actividad procoagulante de FVIII nativo. En el aspecto anterior, la CFXTEN puede tener una secuencia de XTEN adicional de una cualquiera de las tablas 4 y 13-17 unida al extremo N o C de la proteína de fusión. En otro aspecto, una CFXTEN comprende al menos un primer XTEN insertado en un sitio expuesto en la tabla 8, en la que la CFXTEN retiene al menos aproximadamente un 30 %, o al menos aproximadamente un 40 %, o al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % de la actividad procoagulante de FVIII nativo. En un aspecto de una proteína de fusión de fórmula VII, la CFXTEN comprende una secuencia de FVIII BDD de la tabla 1 en que dos o más XTEN que tienen cada uno al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de una cualquiera de las tablas 3, 4 y 13-17 o fragmentos de los mismas están unidos a una secuencia de FVIII BDD en que al menos un XTEN está insertado de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 residuos aminoacídicos en el lado del extremo C del aminoácido R740 del sitio de escisión de FVIII y de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 residuos aminoacídicos en el lado del extremo N del aminoácido R1689 del sitio de escisión de FVIII de los aminoácidos del dominio B residual de la secuencia de FVIII BDD, produciendo una proteína de fusión de FVIII monocatenaria, y uno o dos XTEN están unidos mediante una secuencia de escisión al extremo N y/o C de la secuencia de FVIII BDD, en la que la CFXTEN muestra al menos aproximadamente un 40 %, o al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % de la actividad procoagulante de FVIII nativo después de la liberación del XTEN por escisión de las secuencias de escisión.

En un aspecto, el dominio A3 comprende una región ácida a3 o una parte de la misma. En otro aspecto, al menos un XTEN se inserta dentro de la región ácida a3 o la parte de la misma, el extremo N de la región ácida a3 o la parte de la misma, el extremo C de la región ácida a3 o la parte de la misma o una combinación de las mismas. En determinados aspectos, al menos un XTEN se inserta dentro del dominio C2, el extremo N del dominio C2, el extremo C del dominio C2 o una combinación de los mismos. En otros aspectos más, el factor VIII comprende todo o parte del dominio B. En otros aspectos más, al menos un XTEN se inserta dentro de la totalidad o una parte del dominio B, el extremo N del dominio B, el extremo C del dominio B o una combinación de los mismos.

2. Configuraciones de proteína de fusión de CFXTEN con XTEN interno

En otro aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN configurada con una o más secuencias de XTEN ubicadas internas a la secuencia de FVIII. En un aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN configurada con una o más secuencias de XTEN ubicadas internas a la secuencia de FVIII para conferir propiedades tales como, aunque sin limitación, estabilidad aumentada, resistencia aumentada a proteasas, resistencia aumentada a mecanismos de eliminación incluyendo, aunque sin limitación, interacción con receptores de eliminación o inhibidores de FVIII e hidrofilia aumentada, en comparación con FVIII sin el XTEN incorporado.

La enseñanza contempla que pueden utilizarse diferentes configuraciones o variantes de secuencia de FVIII como la plataforma en la que se inserta uno o más XTEN. Estas configuraciones incluyen, aunque sin limitación, FVIII nativo, FVIII BDD y FVIII monocatenario (scFVIII) y variantes de esas configuraciones. En el caso de scFVIII, la enseñanza proporciona CFXTEN que puede construirse remplazando uno o múltiples aminoácidos del sitio de procesamiento de FVIII. En un aspecto, el scFVIII utilizado en la CFXTEN se crea remplazando el R1648 en la secuencia de FVIII RHQREITR (SEQ ID NO: 1698) con glicina o alanina para evitar el procesamiento proteolítico en la forma heterodimérica. Se contempla específicamente que cualquiera de los aspectos de CFXTEN divulgados en la presente memoria con un residuo de FVIII 1648 puede tener una sustitución de glicina o alanina en el lugar de la arginina en la posición 1648. En algunos aspectos, la enseñanza proporciona CFXTEN que comprende scFVIII en la que partes de la secuencia que rodea el sitio de procesamiento R1648 se remplazan con XTEN, como se ilustra en las FIG. 10A y 10B. En un aspecto, al menos aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 97 % o más del dominio B se remplaza con una secuencia de XTEN divulgada en la presente memoria, incluyendo uno o más de los sitios de escisión R740, R1648 o R1689. En otro aspecto, la CFXTEN tiene la secuencia de FVIII del dominio B entre los sitios de escisión de FXIa en R740 y R1689 (con al menos 1-5 aminoácidos del dominio B adyacentes también retenidos entre el sitio de corte y el inicio del XTEN para permitir que la proteasa acceda al sitio de corte) remplazados con XTEN. En otro aspecto, la CFXTEN tiene la secuencia de FVIII del dominio B entre el sitio de escisión de FXIa en N745 y P1640 remplazada con XTEN. En otros aspectos, la enseñanza proporciona variantes de secuencia de FVIII BDD de CFXTEN en que partes del dominio B se eliminan, pero únicamente uno de los sitios de activación R740 o R1689 de FXI (y 1-5 aminoácidos adyacentes del dominio B) se dejan dentro de la construcción, en los que el XTEN permanece adherido en un extremo a la cadena ligera o pesada después de la escisión por FXIa, como se ilustra en la FIG. 5B y 5D. En un aspecto de lo anterior, la CFXTEN comprende una secuencia de FVIII BDD en que los aminoácidos entre N745 y P1640 o entre S743 y Q1638 o entre P747 y V1642 o entre N745 and Q1656 o entre N745 y S1657 o entre N745 y T1667 o entre N745 y Q1686 o entre R747 y V1642 o entre T751 y T1667 están eliminados y una secuencia de XTEN está unida entre estos aminoácidos, conectando las cadenas pesada y ligera, y puede comprender además un XTEN adicional insertado en bucles superficiales externos, entre los dominios FVIII o en los extremos N o C de la secuencia de FVIII BDD, tal como uno o más sitios de inserción de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o los ilustrados en las FIG. 8-9. En otro aspecto de lo anterior, la CFXTEN comprende una secuencia de FVIII BDD en que los aminoácidos entre K713 y Q1686 o entre los residuos 741 y 1648 se eliminan y se une un XTEN entre los dos aminoácidos, y puede insertarse un XTEN adicional en bucles superficiales, entre los dominios FVIII o en los extremos N o C de la secuencia de FVIII BDD, incluyendo, aunque sin limitación, uno o más sitios de inserción de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o los ilustrados en las FIG. 8-9. En algunos aspectos, dichas secuencias de CFXTEN pueden tener uno o más XTEN que muestran al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de XTEN de una cualquiera de la tablas 4 y 13-17.

La enseñanza contempla otra CFXTEN con XTEN interno en diversas configuraciones; esquemas de configuraciones ejemplares se ilustran en las FIG. 5 y 10. Las regiones adecuadas para sitios de inserciones de XTEN incluyen los límites de dominios conocidos de FVIII, límites de exones, bucles superficiales (externos) conocidos y sitios de zonas superficiales accesibles al disolvente identificados por análisis de cristalografía de rayos X y modelos estructurales derivados de simulaciones dinámicas moleculares de FVIII, regiones con un bajo grado de orden (evaluadas por programas descritos en la leyenda de las FIG. 7), regiones de baja homología/ausencia de conservación entre diferentes especies y regiones hidrófilas. En otro aspecto, los sitios de inserción de XTEN se seleccionaron basándose en sitios de unión del supuesto receptor de eliminación de FVIII. En otro aspecto, la CFXTEN comprende XTEN insertado en ubicaciones que no están dentro de una cercana proximidad a mutaciones implicadas en hemofilia A enumeradas en la base de datos Haemophilia A Mutation, Search, Test and Resource Site (HAMSTeRS) que se eliminaron (Kemball-Cook G, *et al.* The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS versión 4. Nucleic

Acids Res. (1998) 26(1):216-219). En otro aspecto, sitios potenciales para inserción de XTEN incluyen residuos dentro de epítopos de FVIII que pueden unirse por anticuerpos anti-FVIII que se producen en hemofílicos sensibilizados y que no sirven por lo demás como sitios de interacción de proteínas. Las regiones y/o sitios que se consideran para la exclusión como sitios de inserción de XTEN incluyen residuos/regiones de factor VIII que son importantes en diversas interacciones que incluyen otras proteínas de coagulación, residuos que rodean cada sitio de escisión activador/inactivador de arginina sobre el que actúa las proteasas trombina, factor Xa, proteínas C activada, residuos que rodean el sitio de procesamiento del péptido señal (residuo 1) si la construcción contiene el péptido señal, regiones que se sabe que interactúan con otras proteínas tales como FIXa, FX/FXa, trombina, proteína C activada, proteína S cofactor de proteína C, factor de Von Willebrand, sitios que se sabe que interactúan con cofactores fosfolipídicos en la coagulación, residuos implicados en las interacciones de dominios, residuos que coordinan iones Ca^{++} o Cu^{++}, residuos de cisteína implicados en enlaces intramoleculares S-S, sitios documentados de inserción de aminoácidos y mutaciones puntuales en FVIII producidos en sujetos con hemofilia A que afectan a la actividad procoagulante y sitios de mutación en FVIII producidos en un laboratorio de investigación que afectan a la actividad procoagulante. Los sitios considerados para la inserción (para prolongar la semivida) y para la exclusión (necesarios para eliminar el FVIIIa usado o FXa) incluyen regiones que se sabe que interactúan con el proteoglucano sulfato de heparina (HSPG) o proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LPR).

Mediante el análisis de los criterios anteriores, como se describe en el ejemplo 34, se han identificado diferentes sitios de inserción o intervalos de sitios de inserción entre la secuencia de FVIII BDD y/o se han confirmado como candidatos para inserción de XTEN, cuyos ejemplos no limitantes se enumeran en la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 y se muestran esquemáticamente en las FIG. 8 y 9. En un aspecto, la CFXTEN comprende inserciones de XTEN entre los dominios individuales de FVIII, es decir, entre el A1 y A2, o entre el A2 y B, o entre el B y el A3, o entre el A3 y el C1, o entre los dominios C1 y C2. En otro aspecto, la CFXTEN comprende XTEN insertado dentro del dominio B o entre los residuos remanentes de la secuencia de BDD. En otro aspecto, la CFXTEN comprende XTEN insertado en límites de exones conocidos del gen de FVIII codificante ya que los exones representan módulos de secuencia conservados evolutivamente que tienen una alta probabilidad de funcionar en el contexto de otras secuencias proteínicas. En otro aspecto, la CFXTEN comprende XTEN insertado dentro de bucles superficiales identificados por la estructura de rayos X de FVIII. En otro aspecto, la CFXTEN comprende XTEN insertado dentro de regiones de bajo orden identificadas por tener baja o ninguna densidad electrónica detectada por análisis de estructura de rayos X. En otro aspecto, la CFXTEN comprende XTEN insertado dentro de regiones de bajo orden, predichas por algoritmos de predicción de estructura tales como, aunque sin limitación, los algoritmos FoldIndex, RONN, y de Kyte & Doolitlle. En otro aspecto, la CFXTEN comprende XTEN insertado dentro de zonas de secuencia de alta frecuencia de aminoácidos hidrófilos. en otro aspecto, la CFXTEN comprende XTEN insertado dentro de epítopos que pueden unirse por anticuerpos anti-FVIII de origen natural en hemofílicos sensibilizados. En otro aspecto, la CFXTEN comprende XTEN insertado dentro de zonas de secuencia de baja conservación de secuencia y/o diferencias en la longitud de los segmentos de secuencia entre secuencias de FVIII de diferentes especies. En otro aspecto, la CFXTEN comprende XTEN unido al extremo N y/o extremo C. En otro aspecto, la enseñanza proporciona configuraciones de CFXTEN con XTEN insertado seleccionado de dos o más de los criterios de los aspectos enumerados anteriormente. En otro aspecto, la enseñanza proporciona configuraciones de CFXTEN con al menos uno, como alternativa al menos dos, como alternativa al menos tres, como alternativa al menos cuatro, como alternativa al menos cinco o más XTEN insertados en una secuencia de factor VIII en la que los puntos de inserción están en o proximales al lado del extremo N o C de los al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco o seis o más aminoácidos seleccionados de los residuos aminoacídicos de inserción de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o los ilustrados en las FIG. 8-9, o como alternativa dentro de uno, o dentro de dos, o dentro de tres, o dentro de cuatro, o dentro de cinco, o dentro de seis aminoácidos de los residuos aminoacídicos de inserción de tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o dentro de los diversos tramos de los residuos aminoácidos de inserción retratados esquemáticamente para una secuencia de FVIII BDD ejemplar en la FIG. 9.

Como se describe anteriormente, el uno o más XTEN ubicados de forma interna o un fragmento de XTEN pueden tener una longitud de secuencia de 6 a 1000 o más residuos aminoacídicos. En algunos aspectos, en los que la CFXTEN tiene uno o dos o tres o cuatro o cinco o más secuencias de XTEN internas al FVIII, las secuencias de XTEN pueden ser idénticas o pueden ser diferentes. En un aspecto, cada XTEN ubicado de forma interna tiene la menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con longitudes comparables o fragmentos de XTEN o motivos seleccionados de una cualquiera de las tablas 2, 4 y 13-17, cuando se alinean de forma óptima. En otro aspecto, la enseñanza proporciona una CFXTEN configurada con uno o más XTEN insertados internos a una secuencia de FVIII BDD con al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de la tabla 1, en la que las inserciones están ubicadas en los puntos de inserción o intervalo de puntos de inserción indicados en la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9, FIG. 8 o dentro del intervalo de inserciones que se ilustra en la FIG. 9. Los expertos en la materia entenderán que un XTEN insertado dentro de la secuencia de FVIII en un punto de inserción de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 está unido mediante sus extremos N y C a aminoácidos de FVIII flanqueantes (o mediante un espaciador de unión o secuencias de escisión,

como se describe anteriormente), mientras que un XTEN unido al extremo N o C de FVIII estaría unido únicamente a un único aminoácido de FVIII (o a un espaciador de unión o aminoácido de secuencia de escisión, como se describe anteriormente). A modo de ejemplo únicamente, variaciones de CFXTEN con tres XTEN internos podrían tener: XTEN (como se describe en la presente memoria) incorporado entre los residuos 741 y 1640 de FVIII BDD, los residuos 18 y 19 y los residuos 1656 y 1657; o XTEN incorporado entre los residuos 741 y 1640 de FVIII BDD, los residuos 1900 y 1901 y en el extremo C en el residuo 2332; o XTEN incorporado entre los residuos 26 y 27 de FVIII BDD, los residuos 1656 y 1657 y los residuos 1900 y 1901; o XTEN incorporado entre los residuos 741 y 1640 de FVIII BDD, los residuos 1900 y 1901 y en el extremo C en el residuo 2332.

En la evaluación de las proteínas de fusión de CFXTEN con XTEN insertado en las ubicaciones de la tabla 5, se descubrió que inserciones en determinadas regiones de la secuencia de FVIII producían CFXTEN con buena expresión y retención de la actividad procoagulante. Por consiguiente, en aspectos preferidos, la enseñanza proporciona proteínas de fusión de CFXTEN configuradas con uno, o dos, o tres, o cuatro, o cinco, o seis o más XTEN, teniendo cada uno al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con un XTEN seleccionado de una cualquiera de las tablas 4 y 13-17 insertado interno o unido a una secuencia de FVIII BDD con al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de la tabla 1, en la que las inserciones están ubicadas en un punto de inserción dentro uno, o dos, o tres, o cuatro, o cinco, o seis o más intervalos expuestos en la tabla 7. En los aspectos anteriores, las proteínas de fusión de CFXTEN con las inserciones de XTEN retienen al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % o más de la actividad procoagulante en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN.

En la evaluación de las proteínas de fusión de CFXTEN con XTEN insertado en una o más ubicaciones de la tabla 5, se descubrió sorprendentemente que un alto porcentaje de proteínas de fusión con las inserciones de XTEN retenían actividad procoagulante, como se describe en el ejemplo 25. Por consiguiente, la enseñanza proporciona proteínas de fusión de CFXTEN configuradas con uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más XTEN, en las que la proteína de fusión resultante muestra al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % o más de la actividad procoagulante en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN cuando se ensaya mediante un ensayo de coagulación descrito en la presente memoria. En un aspecto preferido, la enseñanza proporciona proteínas de fusión de CFXTEN que comprenden uno, o dos, o tres, o cuatro, o cinco, o seis o más XTEN, teniendo cada uno al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con un XTEN seleccionado de una cualquiera de las tablas 4 y 13-17 unido a una secuencia de FVIII BDD con al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de la tabla 1, en la que las inserciones están ubicadas en uno o más puntos de inserción seleccionados de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 y en la que la proteína de fusión resultante muestra al menos aproximadamente un 30 %, o al menos aproximadamente un 40 %, o al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 70 % o más actividad procoagulante en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN, cuando se ensaya *in vitro* por un ensayo descrito en la presente memoria (por ejemplo, un ensayo cromogénico). Como las presentes proteínas de fusión de CFXTEN típicamente muestran semivida terminal aumentada en comparación con FVIII nativo, un experto en la materia apreciará que una CFXTEN con menor actividad procoagulante con respecto a una cantidad equimolar de FVIII nativo, no obstante, sería aceptable cuando se administre como composición terapéutica a un sujeto que lo necesita. En otro aspecto, las proteínas de fusión de CFXTEN que compren uno, o dos, o tres, o cuatro, o cinco, o más XTEN, teniendo cada uno al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con un XTEN seleccionado de una cualquiera de las tablas 4 y 13-17 unido a una secuencia de FVIII BDD con al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o como alternativa un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de la tabla 1, en la que las inserciones están ubicadas en uno o más puntos de inserción o el intervalo de puntos de inserción seleccionado de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9, en la que la proteína de fusión resultante muestra al menos aproximadamente 0,5 UI/ml, o al menos aproximadamente 0,75 UI/ml, o al menos aproximadamente 1,0 UI/ml, o al menos aproximadamente 1,5 UI/ml, o al menos aproximadamente 2,0 UI/ml, o al menos aproximadamente 2,5 UI/ml, o al menos aproximadamente 3 UI/ml, o al menos aproximadamente 4 UI/ml, o al menos aproximadamente 5 UI/ml, o al menos aproximadamente 7 UI/ml, o al menos aproximadamente 10 UI/ml, o al menos aproximadamente 20 UI/ml, o al menos aproximadamente 30 UI/ml de actividad de FVIII cuando se expresa en medio de cultivo celular y se ensaya en un ensayo cromogénico, en la que el

cultivo y la expresión son de acuerdo con métodos descritos en la presente memoria; por ejemplo, los métodos del ejemplo 25.

Se cree que el descubrimiento de los sitios de inserción en los que el FVIII retiene al menos una parte de su actividad procoagulante también permitiría la inserción de otros péptidos y polipéptidos con características no estructuradas o estructuradas que están asociadas con la prolongación de la semivida cuando se fusionan a una proteína de FVIII en uno o más de esos mismos sitios. Ejemplos no limitantes incluyen albúmina, fragmentos de albúmina, fragmentos de Fc inmunoglobulinas, la subunidad β del péptido C terminal (CTP) de gonadotropina coriónica humana, una secuencia de HAP, una transferrina, los polipéptidos PAS de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20100292130, conectores de poliglicina, conectores de poliserina, péptidos y polipéptidos cortos de 6-40 aminoácidos de dos tipos de aminoácidos seleccionados de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P) con grados variables de estructura secundaria de menos un 50 % a más de un 50 %, entre otros, serían adecuados para la inserción en los sitios de inserción activos identificados de FVIII.

En los aspectos de proteína de fusión descritos en la presente memoria, la proteína de fusión de CFXTEN puede comprender además una o más secuencias de escisión de la tabla 12 u otras secuencias conocidas en la técnica, estando ubicada la secuencia de escisión entre o dentro de 6 residuos aminoacídicos de la intersección de las secuencias de FVIII y XTEN, que pueden incluir dos secuencias de escisión en una secuencia de XTEN interna dada. En un aspecto, la CFXTEN que comprende secuencias de escisión tiene dos secuencias de escisión idénticas, cada una ubicada en o cerca de los extremos respectivos de uno o más XTEN internos de modo que el XTEN se libra de la proteína de fusión cuando se escinde por la proteasa que se une a y escinde esa secuencia. Las secuencias que pueden escindirse se describen más completamente a continuación y se proporcionan secuencias ejemplares en la tabla 12.

Tabla 5: Ubicaciones de inserción para XTEN unido a la secuencia de FVIII BDD

N.º	**Punto de inserción de XTEN**	**Residuo de inserción**	**Secuencia posterior de FVIII BDD**	**Dominio de FVIII**
1	0	(Extremo N)	ATR	A1
2	3	R	RYY	A1
3	17	M	QSD	A1
4	18	C	SDL	A1
5	22	G	ELP	A1
6	24	L	PVD	A1
7	26	V	DAR	A1
8	28	A	RFP	A1
9	32	P	RVP	A1
10	38	F	PFN	A1
11	40	F	NTS	A1
12	41	N	TSV	A1
13	60	N	IAK	A1
14	61	I	AKP	A1
15	65	R	PPW	A1
16	81	Y	DTV	A1
17	111	G	AEY	A1
18	116	D	QTS	A1
19	119	S	QRE	A1
20	120	C	REK	A1
21	128	V	FPG	A1
22	129	F	PGG	A1
23	130	P	GGS	A1
24	182	G	SLA	A1
25	185	A	KEK	A1
26	188	K	TQT	A1
27	205	G	KSW	A1
28	210	S	ETK	A1
29	211	E	TKN	A1
30	216	L	MQD	A1
31	220	R	DAA	A1
32	222	A	ASA	A1
33	223	A	SAR	A1
34	224	S	ARA	A1
35	230	K	MHT	A1
36	243	P	GLI	A1

N.º	Punto de inserción de XTEN	Residuo de inserción	Secuencia posterior de FVIII BDD	Dominio de FVIII
37	244	G	LIG	A1
38	250	R	KSV	A1
39	318	D	GME	A1
40	333	P	QLR	A1
42	334	C	LRM	A1
43	336	R	MKN	a1
44	339	N	NEE	a1
45	345	D	YDD	a1
46	357	V	VRF	a1
47	367	S	FIQ	a1
48	370	S	RPY	a1
49	375	A	KKH	A2
50	376	K	KHP	A2
51	378	H	PKT	A2
52	399	V	LAP	A2
53	403	D	DRS	A2
54	405	R	SYK	A2
55	409	S	QYL	A2
56	416	P	QRI	A2
57	434	E	TFK	A2
58	438	T	REA	A2
59	441	A	IQH	A2
60	442	I	QHE	A2
61	463	I	IFK	A2
62	487	Y	SRR	A2
63	490	R	LPK	A2
64	492	P	KGV	A2
65	493	K	GVK	A2
66	494	G	VKH	A2
67	500	D	FPI	A2
68	506	G	EIF	A2
69	518	E	DGP	A2
70	556	K	ESV	A2
71	565	C	IMS	A2
72	566	I	MSD	A2
73	598	P	AGV	A2
74	599	A	GVQ	A2
75	603	L	EDP	A2
76	616	S	ING	A2
77	686	G	LWI	A2
78	713	K	NTG	A2
79	719	Y	EDS	A2
80	730	L	LSK	A2
81	733	K	NNA	A2
82	745	N	PPV	B
83	1640	P	PVL	B
84	1652	R	TTL	B
85	1656	C	SDQ	A3
86	1685	N	QSP	A3
87	1711	M	SSS	A3
88	1713	S	SPH	A3
89	1720	N	RAQ	A3
90	1724	S	GSV	A3
91	1725	G	SVP	A3
92	1726	S	VPQ	A3
93	1741	G	SFT	A3
94	1744	T	QPL	A3
95	1749	R	GEL	A3
96	1773	V	TFR	A3
97	1792	Y	EED	A3

N.º	Punto de inserción de XTEN	Residuo de inserción	Secuencia posterior de FVIII BDD	Dominio de FVIII
98	1793	E	EDQ	A3
99	1796	C	RQG	A3
100	1798	C	GAE	A3
101	1799	G	AEP	A3
102	1802	P	RKN	A3
103	1803	R	KNF	A3
104	1807	V	KPN	A3
105	1808	K	PNE	A3
106	1827	K	DEF	A3
107	1844	E	KDV	A3
108	1861	N	TLN	A3
109	1863	L	NPA	A3
110	1896	E	RNC	A3
111	1900	R	APC	A3
112	1904	N	IQM	A3
113	1905	I	QME	A3
114	1910	P	TFK	A3
115	1920	A	ING	A3
116	1937	D	QRI	A3
117	1981	G	VFE	A3
118	2019	N	KCQ	A3
119	2020	K	CQT	C1
120	2044	G	QWA	C1
121	2068	F	SWI	C1
122	2073	V	DLL	C1
123	2090	R	QKF	C1
124	2092	K	FSS	C1
125	2093	F	SSL	C1
126	2111	K	WQT	C1
127	2115	Y	RGN	C1
128	2120	T	GTL	C1
129	2125	V	FFG	C1
130	2171	L	NSC	C1
131	2173	S	CSM	C2
132	2188	A	QIT	C2
133	2223	V	NNP	C2
134	2224	N	NPK	C2
135	2227	K	EWL	C2
136	2268	G	HQW	C2
137	2277	N	GKV	C2
138	2278	G	KVK	C2
139	2290	F	TPV	C2
140	2332	Y	Extremo C de FVIII	CT

Indica un punto de inserción para XTEN basado en el número de aminoácidos de FVIII humano de longitud completa maduro, en el que la inserción podría estar en el lado N terminal o C terminal de la secuencia posterior de aminoácidos indicada en FVIII BDD con eliminación de 746-1639

Tabla 6. Ubicaciones de inserción ejemplares para XTEN unido a un polipéptido de FVIII

N.º	Punto de inserción de XTEN	Residuo de inserción	Secuencia posterior de FVIII BDD	Dominio de FVIII	Distancia desde el residuo de inserción
9	32	P	RVP	A1	-3, +6
31	220	R	DAA	A1	-
34	224	S	ARA	A1	+5
43	336	R	MKN	a1	-1, +6
44	339	N	NEE	a1	-4, +5
52	399	V	LAP	A2	-6, +3
56	416	P	QRI	A2	+6
75	603	L	EDP	A2	-6, +6
85	1656	C	SDQ	B	-3, +6
87	1711	M	SSS	A3	-6, +1
91	1725	G	SVP	A3	+6
113	1905	I	QME	A3	+6
114	1910	P	TFK	A3	-5, +6

La distancia desde el residuo de inserción se refiere al número relativo de aminoácidos desde el extremo N (números negativos) o el extremo C (números positivos) del residuo de inserción indicado (residuo "0") donde puede hacerse una inserción. La denominación "-x" se refiere aún sitio de inserción que está a x aminoácidos en el lado N terminal del residuo de inserción denominado. Asimismo, la denominación "+x" se refiere a un sitio de inserción que está a x aminoácidos en el lado C terminal del residuo de inserción denominado.

Por ejemplo, "-1, +2" indica que la inserción se hace en el extremo N o extremo C de los residuos aminoacídicos indicados -1, 0, +1 o +2.

Tabla 7. Ubicaciones de inserción ejemplares adicionales para XTEN unido a un polipéptido de FVIII

N.º	Intervalo del punto de inserción de XTEN	Primer residuo de inserción	Dominio de FVIII
3	18-32	C	A1
8	40	F	A1
18	211-224	E	A1
27	336-403	R	A1, A2
43	599	A	A2
47	745-1640	N	B
50	1656-1728	C	B, A3
57	1796-1804	R	A3
65	1900-1912	R	A3
81	2171-2332	L	C1, C2
indica el intervalo de sitios de inserción numerados con respecto al número de aminoácidos de FVIII humano maduro			

Tabla 8. Ubicaciones de inserción de XTEN ejemplares dentro de variantes con el dominio B eliminado de un polipéptido de FVIII

Intervalo del punto de inserción de XTEN	Primer residuo de inserción	Segundo residuo de inserción
740-1640	R	P
740-1690	R	S
741-1648	S	R
743-1638	S	C
745-1638	N	C
745-1640	N	P
745-1656	N	C
745-1657	N	S
745-1667	N	T
745-1686	N	C
747-1642	R	V
751-1667	T	T
indica los aminoácidos unidos dentro de la variante de dominio B eliminado y dominio A3 adyacente, con los aminoácidos numerados con respecto al número de aminoácidos de FVIII humano maduro indica los aminoácidos unidos por un XTEN insertado en el BDD-FVIII		

Tabla 9. Ubicaciones de inserción ejemplares para XTEN unido a un polipéptido de FVIII que produce actividad procoagulante

N.º	Punto de inserción de XTETN	Residuo de inserción	Secuencia posterior de FVIII BDD	Dominio de FVIII
2	3	R	RYY	A1
4	18	C	SDL	A1
5	22	G	ELP	A1
7	26	V	DAR	A1
9	32	P	RVP	A1
11	40	F	NTS	A1
18	116	D	QTS	A1
19	119	S	QRE	A1
26	188	K	TQT	A1
29	211	E	TKN	A1
30	216	L	MQD	A1
31	220	R	DAA	A1
34	224	S	ARA	A1
35	230	K	MHT	A1
40	333	P	QLR	A1
43	336	R	MKN	a1
44	339	N	NEE	a1
52	399	V	LAP	A2
53	403	D	DRS	A2
55	409	S	QYL	A2
56	416	P	QRI	A2
60	442	I	QHE	A2
62	487	Y	SRR	A2
63	490	R	LPK	A2
66	494	G	VKH	A2
69	518	E	DGP	A2
74	599	A	GVQ	A2
75	603	L	EDP	A2
78	713	K	NTG	A2
82	745	N	PPV	B
85	1656	C	SDQ	A3
87	1711	M	SSS	A3
89	1720	N	RAQ	A3
91	1725	G	SVP	A3
99	1796	C	RQG	A3
102	1802	P	RKN	A3
110	1896	E	RNC	A3
111	1900	R	APC	A3
112	1904	N	IQM	A3
113	1905	I	QME	A3
114	1910	P	TFK	A3
121	2068	F	SWI	C1
130	2171	L	NSC	C1
135	2227	K	EWL	C2
137	2277	N	GKV	C2
140	2332	Y	Extremo C de FVIII	C2
La secuencia posterior en FVIII BDD con eliminación de 746-1639				

En otro aspecto, la enseñanza proporciona colecciones de componentes y métodos para crear las colecciones derivadas de nucleótidos que codifican segmentos de FVIII, XTEN y segmentos de FVIII unidos a XTEN que son útiles en la preparación de genes que codifican la presente CFXTEN. En una primera etapa, se crea una colección de genes que codifican FVIII y XTEN insertado en los diversos sitios individuales en o dentro de los 1-6 aminoácidos de un sitio de inserción identificado en la tabla 5 o ilustrado en las FIG. 8-9, se expresa y se recupera la CFXTEN y se evalúa para su actividad y farmacocinética como se ilustra en la FIG. 15. Aquellas CFXTEN que muestran propiedades potenciadas se usan entonces para crear genes que codifican un segmento de FVIII y el sitio de inserción más un XTEN, con los componentes de cada inserción potenciada representada en la colección, como se ilustra en la FIG. 11. En un aspecto, los componentes de la colección se ensamblan usando técnicas recombinantes convencionales de un modo combinatorio, como se ilustra en la FIG. 11, produciendo permutaciones de CFXTEN con múltiples XTEN

internos y en el extremo N y C, que pueden incluir los sitios de inserción de o proximales a los de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o como se ilustra en las FIG. 8-9. Las construcciones resultantes entonces se evaluarían para la actividad y farmacocinética potenciada, y aquellos candidatos que producen CFXTEN con propiedades potenciadas, por ejemplo, eliminación activa reducida, resistencia a proteasas, inmunogenia reducida y farmacocinética potenciada, en comparación con FVIII no unida a XTEN, se evalúan adicionalmente.

3. Bucles permisivos de XTEN

Como se describe en detalle en otra parte en la presente memoria y como se ilustra en las FIG. 33-36, los autores de la enseñanza han reconocido que cada dominio "A" de FVIII comprende al menos dos "bucles permisivos de XTEN" en que pueden insertarse secuencias de XTEN sin eliminar la actividad procoagulante de la proteína recombinante, o la capacidad de las proteínas recombinante de expresarse *in vivo* o *in vitro* en una célula hospedadora. Los autores de la enseñanza han identificado los bucles permisivos de XTEN como regiones con, entre otros atributos, alta exposición superficial o a disolvente y alta flexibilidad conformacional. El dominio A1 comprende una región de bucle 1 permisivo de XTEN (A1-1) y una región de bucle 2 permisivo de XTEN (A1-2); el dominio A2 comprende una región de bucle 1 permisivo de XTEN (A2-1) y una región de bucle 2 permisivo de XTEN (A2-2); el dominio A3 comprende una región de bucle 1 permisivo de XTEN (A3-1) y una región de bucle 2 permisivo de XTEN (A3-2)...

En determinados aspectos, una proteína de FVIII recombinante como se describe anteriormente comprende al menos una secuencia de XTEN insertada en al menos uno de bucles permisivos de XTEN A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 o A3-2, en la que la proteína de FVIII recombinante tiene actividad procoagulante y puede expresarse *in vivo* o *in vitro* en una célula hospedadora. En determinados aspectos una proteína de FVIII recombinante como se describe anteriormente comprende al menos dos secuencias de XTEN insertadas en FVIII, por ejemplo, en dos bucles permisivos de XTEN diferentes A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 o A3-2, en la que la proteína de FVIII recombinante tiene actividad procoagulante y puede expresarse *in vivo* o *in vitro* en una célula hospedadora. Como alternativa, una proteína de FVIII recombinante como se describe anteriormente puede comprender dos o más secuencias de XTEN insertadas en un solo bucle permisivo de XTEN con o sin secuencias de XTEN insertadas en otros bucles permisivos de XTEN, en la que la proteína de FVIII recombinante tiene actividad procoagulante y puede expresarse *in vivo* o *in vitro* en una célula hospedadora. En determinados aspectos, una proteína FVIII recombinante como se describe anteriormente puede comprender al menos una secuencia de XTEN insertada en al menos uno de los bucles permisivos de XTEN como se describe anteriormente, y puede comprender además una o más secuencias de XTEN insertadas en a3, en la que la proteína de FVIII recombinante tiene actividad procoagulante y puede expresarse *in vivo* o *in vitro* en una célula hospedadora. En determinados aspectos, una proteína de FVIII recombinante de la enseñanza puede comprender tres, cuatro, cinco, seis o más secuencias de XTEN insertadas en uno o más bucles permisivos de XTEN o en a3, en la que la proteína de FVIII recombinante tiene actividad procoagulante y puede expresarse *in vivo* o *in vitro* en una célula hospedadora.

En determinados aspectos, una proteína de FVIII recombinante como se describe anteriormente comprende al menos una secuencia de XTEN insertada en a3, en la que la proteína de FVIII recombinante tiene actividad procoagulante y puede expresarse *in vivo* o *in vitro* en una célula hospedadora. En determinados aspectos, una proteína de FVIII recombinante de la enseñanza comprende al menos una secuencia de XTEN insertada en a3, y comprende además una o más secuencias de XTEN insertadas en uno o más bucles permisivos de XTEN como se describe anteriormente, en la que la proteína de FVIII recombinante tiene actividad procoagulante y puede expresarse *in vivo* o *in vitro* en una célula hospedadora.

Los autores de la enseñanza han reconocido que una proteína de FVIII recombinante de la enseñanza comprende al menos dos bucles permisivos de XTEN en cada una de las regiones de dominio A de FVIII que permite la inserción de una secuencia de XTEN mientras tiene actividad procoagulante y aún puede expresarse *in vivo* o *in vitro* por una célula hospedadora. Se han determinado diversas estructuras cristalinas de FVIII, de grados variables de resolución. Estas estructuras de FVIII y FVIIIa, determinadas por cristalografía de rayos X y simulación dinámica molecular, se usaron para generar modelos de área superficial accesible y flexibilidad conformacional para FVIII. Por ejemplo, la estructura cristalina de FVIII humano se ha determinado por Shen *et al.* Blood 111: 1240-1247 (2008) y Ngo *et al.* Structure 16: 597-606 (2008). Los datos para estas estructuras están disponibles del Protein Data Bank (pdb.org) con los números de acceso 2R7E y 3CDZ, respectivamente.

La estructura secundaria predicha de las cadenas pesada y ligera de FVIII humano de acuerdo con la estructura cristalina de Shen *et al*. se reproduce en las FIG. 37A y 37B. Las diversas hebras beta predichas por la estructura cristalina de Shen *et al*. Se enumeran consecutivamente en las FIG. 8A y 8B. En determinados aspectos, los bucles permisivos de XTEN A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 y A3-2 están contenidos dentro de estructuras de bucle flexible expuestas en superficie en los dominios A de FVIII. A1-1 está ubicado entre la hebra beta 1 y la hebra beta 2, A1-2 está ubicado entre la hebra beta 11 y la hebra beta 12, A2-1 está ubicado entre la hebra beta 22 y la hebra beta 23, A2-2 está ubicado entre la hebra beta 32 y la hebra beta 33, A3-1 está ubicado entre la hebra beta 38 y la hebra beta 39 y A3-2 está ubicado entre la hebra beta 45 y la hebra beta 46, de acuerdo con la estructura secundaria de FVIII maduro almacenado como el número de acceso 2R7E de la base de datos PDB (PDB:2R7E) y como se muestra en las FIG. 8A y 8B. La estructura secundaria del número de acceso a PDB 2R7E mostrada en las FIG. 8A y 8B

corresponde a la asignación de estructura secundaria normalizada de acuerdo con el programa DSSP (Kabsch y Sander, Biopolymers, 22:2577-2637 (1983)). La estructura secundaria de DSSP del FVIII maduro almacenado como número de acceso a PDB 2R7E tiene acceso en la base de datos DSSP disponible en el sitio web swift.cmbi.ru.nl/gv/dssp/ (último acceso el 9 de febrero de 2012) (Joosten *et al*., 39 (Supl. 1): D411-D419 (2010)).

En determinados aspectos, una estructura de bucle flexible expuesta en superficie que comprende A1-1 corresponde a una región en FVIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 15 a aproximadamente el aminoácido 45 de la FIG. 30. En determinados aspectos, A1-1 corresponde a una región en FVIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 18 a aproximadamente el aminoácido 41 de la FIG. 30. En determinados aspectos, la estructura de bucle flexible expuesta en superficie que comprende A1-2 corresponde a una región en FVIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 201 a aproximadamente el aminoácido 232 de la FIG. 30. En determinados aspectos, A1-2 corresponde a una región en FVIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 218 a aproximadamente el aminoácido 229 de la FIG. 30. En determinados aspectos, la estructura de bucle flexible expuesta en superficie que comprende A2-1 corresponde a una región en FVIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 395 a aproximadamente el aminoácido 421 de la FIG. 30. En determinados aspectos, A2-1 corresponde a una región en FVIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 397 a aproximadamente el aminoácido 418 de la FIG. 30. En determinados aspectos, la estructura de bucle flexible expuesta en superficie que comprende A2-2 corresponde a una región en FVIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 577 a aproximadamente el aminoácido 635 de la FIG. 30. En determinados aspectos, A2-2 corresponde a una región en FVIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 595 a aproximadamente el aminoácido 607 de la FIG. 30. En determinados aspectos, la estructura de bucle flexible expuesta en superficie que comprende A3-1 corresponde a una región en FVIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 1705 a aproximadamente el aminoácido 1732 de la FIG. 30. En determinados aspectos, A3-1 corresponde a una región en FVIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 1711 a aproximadamente el aminoácido 1725 de la FIG. 30. En determinados aspectos, la estructura de bucle flexible expuesta en superficie que comprende A3-2 corresponde a una región en FVIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 1884 a aproximadamente el aminoácido 1917 de la FIG. 3. En determinados aspectos, A3-2 corresponde a una región en FVIII humano maduro nativo de aproximadamente el aminoácido 1899 a aproximadamente el aminoácido 1911 de la FIG. 30.

En determinados aspectos, una proteína de FVIII recombinante de la enseñanza comprende una o más secuencias de XTEN insertadas en uno o más bucles permisivos de XTEN de FVIII, o en la región a3, en la que la proteína de FVIII recombinante tiene actividad procoagulante y puede expresarse *in vivo* o *in vitro* en una célula hospedadora. Las secuencias de XTEN a insertarse incluyen aquellas que aumentan la semivida *in vivo* o la estabilidad *in vivo* o*in vitro* de FVIII.

En determinados aspectos, una proteína de FVIII recombinante de la enseñanza comprende una secuencia de XTEN insertada inmediatamente posterior a uno o más aminoácidos correspondientes a uno o más aminoácidos en FVIII humano nativo maduro incluyendo, aunque sin limitación: el aminoácido 18 de la FIG. 30, el aminoácido 26 de la FIG. 30, el aminoácido 40 de la FIG. 30. El aminoácido 220 de la FIG. 30, el aminoácido 224 de la FIG. 30, el aminoácido 399 de la FIG. 30, el aminoácido 403 de la FIG. 30, el aminoácido 599 de la FIG. 30, el aminoácido 603 de la FIG. 30, el aminoácido 1711 de la FIG. 30, el aminoácido 1720 de la FIG. 30, el aminoácido 1725 de la FIG. 30, el aminoácido 1900 de la FIG. 30, el aminoácido 1905 de la FIG. 30, el aminoácido 1910 de la FIG. 30 o cualquier combinación de los mismos, incluyendo inserciones correspondientes en variantes BDD de FVIII descritas en la presente memoria.

En determinados aspectos, una proteína de FVIII recombinante de la enseñanza comprende al menos una secuencia de XTEN insertada en la región a3 de FVIII, en solitario o en combinación con una o más secuencias de XTEN que se insertan en los bucles permisivos de XTEN de los dominios A (por ejemplo, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 o A3-2 como se describe anteriormente), en la que la proteína de FVIII recombinante tiene actividad procoagulante y puede expresarse *in vivo* o *in vitro* en una célula hospedadora. En determinados aspectos, al menos una secuencia de XTEN se inserta en la región a3 inmediatamente posterior a un aminoácido que corresponde al aminoácido 1656 de la FIG. 30. En determinados aspectos, una proteína de FVIII recombinante de la enseñanza comprende una secuencia de XTEN insertada en la región a3 como se describe, e incluye además una o más secuencias de XTEN insertadas inmediatamente posteriores a uno o más aminoácidos correspondientes a uno o más aminoácidos en FVIII humano nativo maduro incluyendo, aunque sin limitación: el aminoácido 18 de la FIG. 30, el aminoácido 26 de la FIG. 30, el aminoácido 40 de la FIG. 30, el aminoácido 220 de la FIG. 30, el aminoácido 224 de la FIG. 30, el aminoácido 399 de la FIG. 30, el aminoácido 403 de la FIG. 30, el aminoácido 599 de la FIG. 30, el aminoácido 603 de la FIG. 30, el aminoácido 1711 de la FIG. 30, el aminoácido 1720 de la FIG. 30, el aminoácido 1725 de la FIG. 30, el aminoácido 1900 de la FIG. 30, el aminoácido 1905 de la FIG. 30, el aminoácido 1910 de la FIG. 30 o cualquier combinación de los mismos.

Un experto en la materia entenderá que los aspectos anteriores de bucles permisivos de una proteína de FVIII nativa en que puede insertarse una proteína heteróloga también son aplicables a las variantes de FVIII con el dominio B eliminado descritas en la presente memoria; por ejemplo, secuencias expuestas en la tabla 1. En la práctica de la presente enseñanza, se entenderá que una secuencia de BDD-FVIII de la tabla 1 puede sustituirse en el lugar de la

proteína de FVIII recombinante de los diversos aspectos descritos anteriormente, y se cree que las construcciones resultantes retendrán de forma similar la actividad procoagulante.

4. Interferencia con agentes de unión a FVIII

Un objeto de la presente enseñanza es proporcionar composiciones de proteína de fusión de CFXTEN procoagulantes para su uso en paciente humanos que padecen coagulopatías, tales como hemofilia A, que tienen anticuerpos nativos o adquiridos, inhibidores u otras proteínas o moléculas que se unen a FVIII que afectan a la actividad o semivida de las proteínas de fusión de CFXTEN, en las que la CFXTEN retiene una mayor cantidad de actividad procoagulante en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN. Como se usa en la presente memoria, "agente de unión a FVIII" significa cualquier molécula que pueda unirse a FVIII nativo o a una proteína de fusión de factor VIII recombinante de la enseñanza, que comprende el factor VIII o un fragmento del mismo, ya sea nativo, derivado o producido de forma recombinante. Se contempla específicamente que el agente de unión a FVIII incluye anticuerpos anti-FVIII e inhibidores de FVIII, entre otras proteínas que pueden unirse específicamente a FVIII. En un aspecto, la enseñanza proporciona proteínas de fusión de CFXTEN procoagulantes que muestran unión reducida a un anticuerpo anti-FVIII o inhibidor de FVIII que interfiere con la actividad procoagulante de FVIII. Como se usa en la presente memoria, "anticuerpo anti-FVIII" o "anticuerpo antifactor VIII" significa un anticuerpo que puede unirse a FVIII o un componente de FVIII de una CFXTEN de la enseñanza, incluyendo dicho anticuerpo, aunque sin limitación, los anticuerpos de la tabla 10 o anticuerpo policlonal de un paciente con hemofilia A con inhibidores de FVIII. El término anticuerpo incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo y clones de fragmentos de anticuerpo. Como se usa en la presente memoria, "inhibidor de FVIII" o "anticuerpo inhibidor anti-FVIII" significa un anticuerpo que puede unirse a FVIII o un componente de FVIII de una CFXTEN de la enseñanza y que reduce por cualquier medio la actividad procoagulante de FVIII o el componente de FVIII de una CFXTEN. En otro aspecto, la enseñanza proporciona proteínas de fusión de CFXTEN que retienen actividad procoagulante en presencia de un inhibidor de FVIII. En otro aspecto, la enseñanza proporciona proteínas de fusión de CFXTEN que comprenden FVIII que muestra semivida terminal aumentada en presencia de un agente de unión a FVIII en comparación con el FVIII no unido a XTEN.

La mayoría de los anticuerpos inhibidores contra el factor VIII humano actúan uniéndose a epítopos ubicados en el dominio A2 o el dominio C2 del factor VIII, alterando las funciones específicas asociadas con estos dominios (patente de Estados Unidos n.º 6770744; Fulcher *et al.* Localization of human factor FVIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:7728-7732; Scandella *et al.* Epitope mapping of human factor VIII inhibitor antibodies by deletion analysis of fVIII fragments expressed in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85:6152-6156). Aunque se ha informado de que un 68 % de los anticuerpos inhibidores están dirigidos contra el dominio A2 y/o C2, un 3 % actúan contra el dominio A1 y un 46 % contra la región ácida a3 (Lavigne-Lissalde, G., *et al.* Characteristics, mechanisms of action, and epitope mapping of anti-factor VIII antibodies. Clin Rev Allergy Immunol (2009) 37:67-79). Por ejemplo, determinados inhibidores específicos de cadena pesada reaccionan con el segmento aminoterminal de 18,3 kDa del dominio A2 (Scandella D, *et al.* 1988); Lollar P *et al.* Inhibition of human factor VIIIa by anti-A2 subunit antibodies. J Clin Invest 1994; 93:2497). FVIII contiene un sitio de unión a fosfolípido en el dominio C2 entre los aminoácidos 2302 y 2332, y también hay un sitio de unión al factor de Von Willebrand en el dominio C2 que actúa junto con los aminoácidos 1649-1689 en el dominio A3. El dominio C2 también tiene epítopos que, cuando se unen por los inhibidores, bloquean la activación de FVIII por trombina o factor Xa. Los inhibidores que se unen específicamente a la cadena ligera reconocen epítopos en el dominio A3 o una región antigénica principal en el dominio C2 y pueden provocar actividad procoagulante reducida evitando la unión de FVIII a fosfolípido o reduciendo la velocidad de disociación de FVIII del factor de Von Willebrand (Gilles JG, *et al.* Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. Blood (1993) 82:2452; Shima M, *et al.* A factor VIII neutralizing monoclonal antibody and a human inhibitor alloantibody recognizing epitopes in the C2 domain inhibit factor VIII binding to von Willebrand factor and to phosphatidylserine. Thromb Haemost (1993) 69:240). Ejemplos no limitantes de inhibidores monoclonales de FVIII se enumeran en la tabla 9. En pacientes con inhibidor de alta concentración, hay un riesgo aumentado de desarrollar hemorragia recidivante en articulaciones particulares, que finalmente pueden provocar calidad de vida disminuida, discapacidad o muerte por pérdida excesiva de sangre (solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20120065077; Zhang *et al.*, Clinic. Rev. Allerg. Immunol., 37:114-124 (2009); Gouw y van den Berg, Semin. Thromb. Hemost., 35:723-734 (2009))

Aunque sin la intención de limitarse a teoría particular alguna, se cree que la característica no estructurada del XTEN incorporado en las proteínas de fusión de CFXTEN permite que el XTEN adopte conformaciones que provocan impedancia estérica a los inhibidores que de lo contrario se unirían a los epítopos de FVIII. Como se ilustra en la FIG. 6, como el XTEN incorporado asume diversas conformaciones de enrollamiento aleatorio, cubre espacialmente regiones de componente de FVIII de la proteína de fusión e interfiere estéricamente con la capacidad de un inhibidor de unirse a un epítopo de FVIII.

En un aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN que muestra actividad procoagulante y unión reducida en presencia de un anticuerpo que se une al dominio C2 del factor VIII en comparación con el factor VIII correspondiente no unido a XTEN y/o a FVIII nativo. En otro aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN que muestra actividad procoagulante y unión reducida en presencia de un anticuerpo que se une al dominio A2 del factor VIII en comparación

con el factor VIII correspondiente no unido a XTEN o a FVIII nativo. En otro aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN que muestra actividad procoagulante y unión reducida en presencia de anticuerpos que se unen al dominio A2 y el C2 del factor VIII, en comparación con el factor VIII correspondiente no unido a XTEN o a FVIII nativo. En un aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN que muestra actividad procoagulante y unión reducida, en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN, en presencia de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos de la tabla 10. En un aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN muestra unión reducida al anticuerpo GMA8021. En otro aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN muestra unión reducida al anticuerpo GMA8008. En otro aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN muestra unión reducida al anticuerpo ESH4. En otro aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN muestra unión reducida al anticuerpo ESH8. En otro aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN muestra unión reducida al anticuerpo B02C11. En otro aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN muestra unión reducida y un grado mayor de actividad procoagulante, en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN, en presencia de plasma de un sujeto con hemofilia A con anticuerpos policlonales inhibidores de FVIII, en los que el mayor grado de actividad procoagulante se determina mediante un ensayo *in vitro* tal como un ensayo de Bethesda u otro ensayo descrito en la presente memoria.

La CFXTEN que muestra unión reducida por inhibidores de FVIII puede tener uno, o dos, o tres, o cuatro, o cinco, o seis o más XTEN individuales, cuyos aspectos se divulgan en la presente memoria. En los aspectos anteriores de este párrafo, una CFXTEN muestra al menos un 5 %, o un 10 %, o un 15 %, o un 20 %, o un 30 %, o un 40 %, o un 50 %, o un 60 %, o un 70 % o menos unión al anticuerpo cuando se ensaya *in vitro* en un ensayo que puede ensayar la unión de un anticuerpo a FVIII, tales como ensayos descritos en la presente memoria a continuación o los conocidos en la técnica. Como alternativa, la unión reducida de la presente CFXTEN a los anticuerpos de unión a FVIII puede evaluarse por retención de un grado mayor de actividad procoagulante en presencia del anticuerpo en comparación con FVIII no unido a XTEN, como se describe en los ejemplos. Por tanto, en los aspectos que se refieren a la unión reducida por inhibidores de FVIII descritas en la presente memoria, una CFXTEN muestra, cuando se hace reaccionar con el anticuerpo anti-FVIII, al menos un 5 %, o un 10 %, o un 15 %, o un 20 %, o un 30 %, o un 40 %, o un 50 %, o un 60 %, o un 70 %, o un 80 %, o un 100 %, o un 200 %, o un 300 %, o un 400 %, o un 500 % o más actividad en un ensayo de coagulación (tal como se describe en la presente memoria a continuación) en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN y que ha reaccionado con el anticuerpo. En lo anterior, el anticuerpo anti-FVIII puede ser un anticuerpo de la tabla 9 o un anticuerpo anti-FVIII en circulación de un sujeto con hemofilia A. En otro aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN en que la proteína de fusión ensayada, cuando se ensaya utilizando el ensayo de Bethesda y un anticuerpo anti-FVIII seleccionado de la tabla 10 o una preparación de anticuerpo policlonal anti-FVIII tal como, aunque sin limitación, plasma de un sujeto con hemofilia A con inhibidores de FVIII, produce un valor de Bethesda con al menos aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 o 200 menos unidades Bethesda en comparación con un FVIII no unido a XTEN y ensayado en condiciones comparables. En otro aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN en que la proteína de fusión ensayada produce menos de un 50 %, o menos de un 40 %, o menos de un 30 %, o menos de un 25 %, o menos de un 20 %, o menos de un 15 %, o menos de un 14 %, o menos de un 13 %, o menos de un 12 %, o menos de un 11 %, o menos de un 10 % de las unidades Bethesda en comparación con un FVIII no unido a XTEN cuando se ensaya en condiciones comparables utilizando el ensayo de Bethesda y una preparación de anticuerpo policlonal anti-FVIII tal como, aunque sin limitación, plasma de un sujeto con hemofilia A con inhibidores de FVIII.

Tabla 10: Anticuerpos antifactor VIII

Denominación del anticuerpo	**Epítopo**	**Concentración de inhibidor UB/mg**	**Referencia**
BO2C11	Dominio C2 Met2199/Phe2200	20000	Documento US 6770744 Blood (2007) 110:4234-4242
NMC VIII-5	Dominio C2 Glu2181-Va12243		Documento US 6770744
ESH2	Cadena ligera		ADI
ESH4	Cadena ligera 2303-2332	39	Documento US 6770744 Blood (2007) 110:4234-4242
ESH8	Dominio C2 2248-2285	10000	Documento US 6770744 Blood (2007) 110:4234-4242
RHD5 (LMBP 6165CB)	Dominio C1		Publicación internacional WO 2005/016455
			Solicitud de patente de Estados Unidos 20090263380
LE2E9	Dominio C1		Solicitud de patente de Estados Unidos 20090263380 Blood (2000) 95:156-163
154	Dominio C2	1300	Blood (2007) 110:4234-4242
F85	Dominio C2	6	Blood (2007) 110:4234-4242
F100	Dominio C2	5	Blood (2007) 110:4234-4242
F137	Dominio C2	6	Blood (2007) 110:4234-4242

Denominación del anticuerpo	Epítopo	Concentración de inhibidor UB/mg	Referencia
189	Dominio C2	1900	Blood (2007) 110:4234-4242
I117	Dominio C2	1800	Blood (2007) 110:4234-4242
I109	Dominio C2 Met2199/Phe2200	1500	Blood (2007) 110:4234-4242
1B5	Dominio C2	930	Blood (2007) 110:4234-4242
3C6	Dominio C2	71	Blood (2007) 110:4234-4242
3D12	Dominio C2 Phe2196	2600	Blood (2007) 110:4234-4242
D102	Dominio C2	3800	Blood (2007) 110:4234-4242
3G6	Dominio C2	25000	Blood (2007) 110:4234-4242
2-77	Dominio C2	25000	Blood (2007) 110:4234-4242
B45	Dominio C2	21000	Blood (2007) 110:4234-4242
B9	Dominio C2	31000	Blood (2007) 110:4234-4242
B11	Dominio C2	3300	Blood (2007) 110:4234-4242
B75	Dominio C2	Indeterminado	Blood (2007) 110:4234-4242
D105	Dominio C2 Va12223/Lys2227	0,8	Blood (2007) 110:4234-4242
F77	Dominio C2	26000	Blood (2007) 110:4234-4242
F178	Dominio C2	18000	Blood (2007) 110:4234-4242
F67	Dominio C2	21000	Blood (2007) 110:4234-4242
G99	Dominio C2 Val2223/Lys2227	15000	Blood (2007) 110:4234-4242
G86	Dominio C2	4300	Blood (2007) 110:4234-4242
I14	Dominio C2	44000	Blood (2007) 110:4234-4242
I55	Dominio C2	10000	Blood (2007) 110:4234-4242
2-117	Dominio C2	>0,4	Blood (2007) 110:4234-4242
GMA012	Dominio A2 497-510; 584-593		GMA
GMA8001	Dominio A3	156	GMA
GMA8002	Dominio A1	<1	GMA
GMA8003	Dominio C2		GMA
GMA8004	Dominio A1		GMA
GMA8005	Dominio A1A3/A1		GMA
GMA8006	Dominio C2		GMA
GMA8008	Dominio C2	1047	GMA
GMA8009	Dominio A2	7923	GMA
GMA8010	Dominio LC		GMA
GMA8011	Dominio C1	97	GMA
GMA8012	Dominio A1A3	204	GMA
GMA8013	Dominio A3C2	30	GMA
GMA8014	Dominio C2	7799	GMA
GMA8015	Dominio A2	17079	GMA
GMA8016	Dominio A2	<1	GMA
GMA8017	Dominio A2	334	GMA
GMA8018	Dominio LC	242	GMA
GMA8019	Dominio CR-LC		GMA
GMA8020	Dominio A1A3	196	GMA
GMA8021	Dominio A2	33928	GMA
4A4	Dominio A2	40000	J Thromb Haemost (2009) 7:658-664
3E6	Dominio C2	41	Blood (2007) 110:4234-4242

Sitio de internet de American Diagnostica Inc., URL ubicada en internet en mericandiagnostica.com/html/Product_Detail.asp?idCategory=5&idSubCategory=104&idpro=ESH-8 como existía el 12 de enero de 2012

Sitio de internet de Green Mountain Antibodies, URL ubicada en internet en greenmoab.com/product_details/16316/21582.html como existía el 12 de enero de 2012

Ensayos para la unión de inhibidor y anticuerpo

Las proteínas de fusión de la enseñanza pueden ensayarse para confirmar la unión reducida por inhibidores de FVIII usando métodos conocidos en la técnica. Los ensayos que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos "emparedados", ensayo de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, ensayos de coagulación, ensayos de inhibidor de factor VIII por nombrar unos pocos. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al,* eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). A continuación, se describen ejemplos resumidamente, pero no se pretenden a modo de limitación.

El ensayo de Bethesda y la modificación de Nijmegen del ensayo de Bethesda son ensayos de inhibidor de factor VIII bien conocidos como métodos para detectar inhibidores de FVIII (Kasper CK, *et al.* Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. Thromb Diath Haemorrh. (1975) 34(2):612). Sin embargo, los ensayos pueden modificarse para ensayar la unión de inhibidores a composiciones de FVIII usando inhibidores tales como anticuerpos policlonales o monoclonales anti-FVIII, incluyendo los anticuerpos de la tabla 10, y métodos tales como los descritos en el ejemplo 52. En resumen, el ensayo de Bethesda modificado implica mezclar volúmenes valorados de la muestra de ensayo con un volumen igual de un inhibidor a una concentración establecida. Las mezclas se incuban durante 2 horas a 37 °C antes del análisis de la concentración del factor mediante un ensayo de coagulación tal como un ensayo cromogénico. Asimismo, se incuba un plasma de referencia con un nivel de factor VIII nativo que entonces se ensaya como control positivo. El criterio de valoración es la concentración que provoca un 50 % de la actividad de FVIII del control positivo, presentada como unidades Bethesda. En la modificación de Nijimegen del ensayo de Bethesda, las muestras de ensayo se estabilizan con tampón imidazol y la muestra de control se mezcla con plasma deficiente en lugar de tampón (Verbruggen B, *et al.* The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. Thromb Haemost. (1995) 73(2):247-251).

El análisis de transferencia de Western en general comprende la preparación de muestras proteínicas, electroforesis de las muestras proteínica en un gel de poliacrilamida (por ejemplo, SDS-PAGE al 8 %-20 % dependiendo del peso molecular del antígeno), transferencia de la muestra proteínica del gel de poliacrilamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, bloqueo de la membrana en disolución de bloqueo (por ejemplo, PBS con BSA al 3 % o leche desnatada), lavado de la membrana en tampón de lavado (por ejemplo, PBS-Tween 20), bloqueo de la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavado de la membrana en tampón de lavado, bloqueo de la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, por ejemplo, un anticuerpo antihumano) conjugado con un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano o fosfatasa alcalina) o molécula radioactiva (por ejemplo, 32 P o 125 I) diluida en tampón de bloqueo, lavado de la membran en tampón de lavado y detección de la presencia del antígeno. Un experto en la materia sería conocedor de los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada y para reducir el ruido de fondo. Para un análisis adicional con respecto a protocolos de transferencia de Western véase, por ejemplo, Ausubel *et al,* eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.8.1.

Los ensayos de ELISA pueden detectar anticuerpos contra FVIII independientemente de su capacidad de bloquear la actividad procoagulante de FVIII, y se han utilizado para la detección de anticuerpos anti-FVIII que se desarrollan en pacientes con hemofilia A. En una población de 131 pacientes con hemofilia A con inhibidores, la técnica de ELISA produjo una sensibilidad de un 97,7 % y una especificidad de un 78,8 %, y tuvo un alto valor predictivo negativo (98,6 %) [Martin, P. G., *et al.* Evaluation of a novel ELISA screening test for detection of factor VIII inhibitory antibodies in haemophiliacs. Clin Lab Haematol (1999) 21:125-128]. Otros investigadores han descubierto una correlación altamente significativa entre el valor de Bethesda y los valores de absorbancia en un ensayo de ELISA para detectar Ab anti-FVIII (Towfighi, F., *et al.* Comparative measurement of anti-factor VIII antibody by Bethesda assay and ELISA reveals restricted isotype profile and epitope specificity. Acta Haematol (2005) 114:84-90), con la ventaja añadida de la capacidad de detectar anticuerpos anti-FVIII no inhibidores. Los protocolos de ensayo comprenden preparar el ligando de unión, que puede incluir una muestra que comprende polipéptido de factor VIII o la proteína de fusión de CFXTEN, recubrir el pocillo de una placa de microvaloración de 96 pocillos con el anticuerpo, añadir la muestra de ensayo de ligando e incubarla, después añadir un anticuerpo de detección e incubarlo antes del lavado y añadir un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina o peroxidasa e incubarlo durante un periodo adicional antes de la adición del sustrato TMB y procesarlo para su lectura mediante espectrofotómetro a 450 nm. En los ELISA, el anticuerpo o inhibidor de interés no tiene que conjugarse a un compuesto detectable; en su lugar, puede añadirse al pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo o inhibidor de interés) conjugado con un compuesto detectable. Además, en lugar de recubrir el pocillo con el anticuerpo, el ligando puede recubrirse en el pocillo. Un experto en la materia sería conocedor de los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones de los ELISA conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al,* eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1).

Se usan ensayos de coagulación convencionales o modificados para medir la unión reducida de agentes de unión a FVIII. En un método ejemplar (descrito adicionalmente en el ejemplo 28), la concentración óptima de un inhibidor de FVIII dado para utilizar en los ensayos se determina en primer lugar mediante un experimento de valoración usando

cantidades variables del anticuerpo inhibidor incubado a 37 °C durante 2 h con el vector fundamental que expresa FVIII de tipo silvestre que contiene una doble marca de His/Myc. La actividad de FVIII se mide mediante el procedimiento de ensayo de Coatest descrito en la presente memoria. La concentración más baja que provoca una inhibición óptima de la actividad de FVIII se emplea en el ensayo. En el ensayo, el anticuerpo inhibidor de FVIII a la concentración óptima se mezcla con muestras de ensayo individuales y se incuba a 37 °C durante 2 h. Las muestras de ensayo resultantes se recogen entonces y se utilizan en el ensayo de actividad de Coatest, junto con alícuotas no tratadas de la CFXTEN y el control positivo para evaluar la actividad de FVIII residual y basal para cada muestra de ensayo.

La enseñanza proporciona métodos de preparación de CFXTEN que muestran unión reducida a agentes de unión a FVIII, incluyendo inhibidores de FVIII y la retención de la actividad procoagulante. En un aspecto, el método para preparar una CFXTEN con unión reducida a inhibidores de FVIII comprende las etapas de seleccionar una secuencia de FVIII con al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de la tabla 1, seleccionar uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis o más XTEN cada uno con al menos un 70 %, o al menos un 80 %, o al menos un 90 % o al menos un 95-99 % de identidad de secuencia con secuencias de XTEN de longitud comparable de la tabla 4, crear construcciones de expresión diseñadas para ubicar dicho XTEN en o proximal a ubicaciones seleccionadas de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9, expresar y recuperar la CFXTEN resultante y ensayar las proteínas de fusión resultantes en un ensayo descrito en la presente memoria para confirmar la unión reducida de la proteína de fusión de CFXTEN. Mediante el método de la enseñanza, una CFXTEN muestra una unión al menos un 5 % reducida, o al menos un 10 % reducida, o al menos un 15 % reducida, o al menos un 20 % reducida, o al menos un 25 % reducida, o al menos un 40 % reducida, o al menos un 50 % reducida, o al menos un 60 % reducida, o al menos un 70 % reducida, o al menos un 80 % reducida a un agente de unión a FVIII incluyendo, aunque sin limitación, los anticuerpos de la tabla 10 o anticuerpos anti-FVIII de un sujeto con hemofilia A, y retiene al menos aproximadamente un 10 %, o al menos aproximadamente un 20 %, o al menos aproximadamente un 30 %, o al menos aproximadamente un 40 %, o al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 70 % de actividad procoagulante en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN.

Hasta un 8-10 % de los pacientes con hemofilia A tienen anticuerpos que se unen a FVIII sin activar sus propiedades procoagulantes; por lo tanto, no se clasifican como inhibidores de FVIII. Sin embargo, se cree que la unión de anticuerpos a FVIII da lugar a inmunocomplejos que se eliminan mediante la respuesta inmunitaria innata y son más susceptibles a degradación proteolítica (Kazatchkine MD. Circulating immune complexes containing anti-VIII antibodies in multi-transfused patients with haemophilia A. Clin Exp Immunol. (1980) 39(2):315-320). Por consiguiente, un objeto de la enseñanza es proporcionar proteínas de fusión de CFXTEN que comprenden uno o más XTEN que muestran unión reducida de anticuerpos a FVIII que no son inhibidores, en las que la degradación o eliminación de la CFXTEN se reduce al menos un 5 %, o un 10 %, o un 15 %, o un 20 %, o un 30 %, o un 40 %, o un 50 %, o un 60 %, o un 70 % o menos comparación con un FVIII correspondiente no unido a XTEN o a FVIII nativo unido por dichos anticuerpos. La unión reducida de anticuerpos a CFXTEN en comparación con FVIII no unido a XTEN o a FVIII nativo puede ensayarse por métodos *in vitro* e *in vivo.* Los métodos *in vitro* incluyen los métodos de ELISA y de transferencia de Western mencionados anteriormente. La degradación o eliminación reducida de CFXTEN puede evaluarse *in vitro* mediante el uso de modelos animales o en ensayos clínicos humanos. En un tipo de ensayo, el factor VIII o CFXTEN se administra por separado, preferiblemente por infusión intravenosa, a cohortes de pacientes que tienen deficiencia de factor VIII que tienen anticuerpos que promueven la degradación o eliminación del factor VIII humano terapéutico. La dosificación del artículo de ensayo administrado está un intervalo entre 5 y 50 UI/kg de peso corporal, preferiblemente 10-45 UI/kg y mucho más preferiblemente 40 UI/kg de peso corporal. Aproximadamente 1 hora después de cada administración, la recuperación del factor VIII o CFXTEN de muestras de sangre se mide en un ensayo de coagulación funcional de una etapa o cromogénico para evaluar la actividad y por ELISA, HPLC o ensayo similar para calificar la cantidad de equivalente de factor VIII intacto. Se toman muestras de nuevo aproximadamente 5-10 horas después de la infusión y se mide la recuperación. La recuperación total y la velocidad de desaparición de factor VIII de las muestras son predictivas de la concentración de anticuerpo, y la comparación de los resultados del factor VIII y CFXTEN indica el grado de eliminación y/o degradación reducida de la CFXTEN. En un aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN muestra una unión al menos un 5 % reducida, o al menos un 10 % reducida, o al menos un 15 % reducida, o al menos un 20 % reducida, o al menos un 25 % reducida, o al menos un 40 % reducida, o al menos un 50 % reducida, o al menos un 60 % reducida, o al menos un 70 % reducida, o al menos un 80 % reducida a un anticuerpo anti-FVIII que promueve la eliminación, pero no inhibe de otro modo la actividad procoagulante de FVIII nativo intacto. En otro aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN muestra una unión al menos un 5 % reducida, o al menos un 10 % reducida, o al menos un 15 % reducida, o al menos un 20 % reducida, o al menos un 25 % reducida, o al menos un 40 % reducida, o al menos un 50 % reducida, o al menos un 60 % reducida, o al menos un 70 % reducida, o al menos un 80 % reducida a un anticuerpo anti-FVIII que promueve la degradación de FVIII. En los aspectos anteriores de este párrafo, la unión reducida del anticuerpo anti-FVIII se caracteriza de forma alternativa por un valor de K_D aumentado del anticuerpo de FVIII contra la proteína de fusión en comparación con el FVIII de al menos dos veces, o tres veces, o cuatro veces, o cinco veces, o 10 veces, o 33 veces, o 100 veces, o 330 veces, o al menos 1000 veces en comparación con la unión al FVIII correspondiente no unido a XTEN. En un aspecto, las proteínas de fusión de CFXTEN que comprenden uno o más XTEN que muestran reactividad reducida respecto a un anticuerpo anti-FVIII muestran una semivida terminal aumentada cuando se administran a un sujeto con anticuerpos anti-FVIII de al menos 48 h, o al menos 72 h, o al menos 96 h, o al menos 120 h, o al menos 144 h, o al menos 14 días, o al menos

21 días en comparación con FVIII no unido a XTEN. En el aspecto anterior, el sujeto puede ser un sujeto humano con hemofilia A o puede ser un ratón con hemofilia A con anticuerpos anti-FVIII en circulación.

Otro aspecto de la presente enseñanza es el uso de proteína de fusión de CFXTEN para un tratamiento específico de una coagulopatía en un sujeto con un inhibidor de FVIII. La enseñanza proporciona un método de tratamiento de un sujeto con uno o más inhibidores de FVIII en circulación, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz coagulante de una proteína de fusión de CFXTEN al sujeto, en el que la proteína de fusión muestra mayor actividad procoagulante y/o concentraciones eficaces coagulantes de mayor duración en comparación con un factor VIII correspondiente no unido a XTEN o en comparación con factor VIII nativo administrado al sujeto usando una cantidad y vía de administración comparables. En un aspecto del método, el inhibidor de FVIII en el sujeto es un anticuerpo anti-FVIII. En otro aspecto, el inhibidor de FVIII es un anticuerpo anti-FVIII neutralizante. En un aspecto, el inhibidor de FVIII es un anticuerpo anti-FVIII que se une al dominio A1 de FVIII. En otro aspecto, el inhibidor de FVIII es un anticuerpo anti-FVIII que se une al dominio A2 de FVIII. En otro aspecto, el inhibidor de FVIII es un anticuerpo anti-FVIII que se une al dominio A3 de FVIII. En otro aspecto, el inhibidor de FVIII es un anticuerpo anti-FVIII que se une al dominio C1 de FVIII. En otro aspecto, el inhibidor de FVIII es un anticuerpo anti-FVIII que se une al dominio C2 de FVIII. En otro aspecto, el inhibidor de FVIII es un anticuerpo anti-FVIII que se une tanto al dominio C2 como al dominio A2 de FVIII. En otro aspecto, el inhibidor de FVIII se une a un epítopo de FVIII que puede unirse a uno o más anticuerpos de la tabla 10. En otro aspecto, el inhibidor de FVIII es un anticuerpo policlonal de un sujeto con hemofilia A con anticuerpos inhibidores de FVIII.

Un objeto de la presente enseñanza es la creación de CFXTEN con XTEN insertado para maximizar la interferencia estérica de agentes de unión a FVIII que de lo contrario se unirían a FVIII y neutralizarían la actividad procoagulante o provocarían la eliminación o degradación de FVIII. Por consiguiente, en una estrategia, la enseñanza proporciona CFXTEN que comprende uno o más XTEN, en la que los XTEN se insertan proximales a un sitio de unión de un inhibidor de FVIII o anticuerpo anti-FVIII. En un aspecto, un XTEN se une al FVIII en una ubicación seleccionada de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 que está dentro de aproximadamente 50, o aproximadamente 100, o aproximadamente 150, o aproximadamente 200, o aproximadamente 250, o aproximadamente 300 aminoácidos de un epítopo de FVIII que se une por un anticuerpo de la tabla 10. En otro aspecto, el XTEN se une al FVIII dentro de aproximadamente 50, o aproximadamente 100, o aproximadamente 150, o aproximadamente 200, o aproximadamente 250, o aproximadamente 300 aminoácidos de un epítopo de FVIII en el dominio A2 o C2 que se une por un anticuerpo de la tabla 10. Por consiguiente, la enseñanza proporciona proteínas de fusión de CFXTEN que comprenden uno o más XTEN, en las que la unión por inhibidores de FVIII al componente de FVIII de la proteína de fusión se reduce en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN o a FVIII nativo y la CFXTEN retiene la actividad procoagulante. En los aspectos anteriores, descritos anteriormente en la presente memoria en este párrafo, las proteínas de fusión pueden ensayarse por los ensayos descritos en la presente memoria a continuación, los ensayos de los ejemplos u otros ensayos conocidos en la técnica, y los inhibidores pueden ser un anticuerpo de la tabla 10, pueden ser anticuerpos policlonales anti-FVIII o pueden ser sangre o plasma de un sujeto con hemofilia A con inhibidores de FVIII.

En otro aspecto, la CFXTEN se diseña para maximizar las regiones sobre las que el XTEN puede adoptar conformaciones de enrollamiento aleatorio que cubren la proteína de fusión, produciendo de ese modo impedancia estérica para anticuerpos anti-FVIII que de lo contrario se unirían a epítopos en el componente de FVIII de la proteína de fusión. Se cree que la incorporación de múltiples XTEN en una CFXTEN proporciona un radio hidrodinámico total mayor del componente de XTEN en comparación con CFXTEN con menos XTEN, teniendo aún, aproximadamente el mismo total de aminoácidos de XTEN. Empíricamente, el radio hidrodinámico para una proteína puede calcularse basándose en cromatografía de exclusión por tamaño y los resultados de varias proteínas de fusión usando dichos métodos se describen en los ejemplos. Como alternativa, el radio para polipéptidos de XTEN, tales como los incorporados en los aspectos divulgados en la presente memoria, puede calcularse de forma aproximada por fórmulas matemáticas, porque los tipos limitados de aminoácidos utilizados tienen características conocidas que pueden cuantificarse. En un aspecto, el radio máximo de un solo polipéptido de XTEN se calcula (a partir de ahora en la presente memoria "radio de XTEN") de acuerdo con la fórmula dada por la ecuación II:

$$\text{Radio de XTEN} = (\text{longitud de } \sqrt{\text{XTEN } 0{,}2037}) + 3{,}4627 \qquad \text{II}$$

En otro aspecto, la suma del máximo de los radios de XTEN para todos los segmentos de XTEN en una CFXTEN se calcula (a partir de ahora en la presente memoria "suma de radios de XTEN") de acuerdo con la fórmula dada por la ecuación III:

$$\text{Suma de radios de XTEN} = \sum_{i=1}^{n} Radio\ de\ XTEN_i \qquad \text{III}$$

en la que: n = el número de segmentos de XTEN

e i es un iterador

En otro aspecto, la relación de la suma de radios de XTEN de una CFXTEN que comprende múltiples XTEN respecto al radio de XTEN para un solo XTEN de una longitud equivalente (en residuos aminoacídicos totales respecto a la CFXTEN) se calcula (a partir de ahora en la presente memoria "relación de radios de XTEN") de acuerdo con la fórmula dada por la ecuación IV:

$$\text{Relación de radios de XTEN} = \frac{\sum_{i=1}^{n} Radio\ de\ XTEN_i}{(\sqrt{\sum_{i=1}^{n} Longitud\ de\ XTEN_i} * 0{,}2037) + 3{,}4627} \qquad \text{IV}$$

en la que: n = el número de segmentos de XTEN

e i es un iterador

En la aplicación de las ecuaciones al XTEN, un experto en la materia entenderá que los valores calculados representan valores máximos que podrían variar o reducirse dependiendo de la célula hospedadora utilizada para la expresión del polipéptido de XTEN. Se cree que, aunque la expresión en *E. coli* produciría XTEN que consiguen los valores calculados, la expresión en células hospedadoras eucarióticas en que los XTEN pueden glucosilarse podría producir un radio del polipéptido menor que el valor calculado máximo. Dichas diferencias pueden cuantificarse por métodos tales como cromatografía de exclusión por tamaño, cuyos métodos se detallan en los ejemplos.

Para diseñar una CFTEN que maximice la zona sobre la que el XTEN puede adoptar conformaciones de enrollamiento aleatorio, se descubrió que diseños de CFXTEN con una relación de radios de XTEN por encima de 2 proporcionan mayor cobertura sobre la proteína de fusión que diseños con valores <2. Por consiguiente, en un aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0, o 2,1, o 2,2, o 2,3, o 2,4, o 2,5, o 2,6, o 2,7, o 2,8, o 2,9, o 3,0, o 3,1, o 3,2, o 3,3, o 3,4, o 3,5 o mayor. En algunos aspectos, la enseñanza proporciona CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0-3,5 o mayor y comprende al menos tres XTEN teniendo cada XTEN al menos 42 a aproximadamente 288 aminoácidos y en la que al menos dos de los XTEN están unidos a la proteína de fusión con no menos de 100, o aproximadamente 200, o aproximadamente 300, o aproximadamente 400, o aproximadamente 500 aminoácidos de separación entre los dos XTEN. En otros aspectos, la enseñanza proporciona CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0-3,5 o mayor y comprende al menos cuatro XTEN teniendo cada XTEN al menos 42 a aproximadamente 288 aminoácidos y en la que al menos tres de los XTEN están unidos a la proteína de fusión con no menos de aproximadamente 100, o aproximadamente 200, o aproximadamente 300, o aproximadamente 400 aminoácidos de separación entre dos cualesquiera de los tres XTEN.

En otro aspecto, la enseñanza proporciona una CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0-3,5 o mayor, la CFXTEN comprende al menos tres XTEN teniendo cada XTEN al menos 42 a aproximadamente 288 aminoácidos y en la que al menos dos de los tres XTEN unidos a la proteína de fusión están separados por una secuencia de aminoácidos de al menos 100, o aproximadamente 200, o aproximadamente 300, a aproximadamente 400 aminoácidos, y el tercer XTEN está unido dentro del domino B (o fragmento del mismo) o dentro del dominio C (o el extremo del mismo). En otro aspecto, la enseñanza proporciona una CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0-3,5 o mayor, la CFXTEN comprende al menos cuatro XTEN teniendo cada XTEN al menos 42 a aproximadamente 288 aminoácidos y en la que al menos tres de los cuatro XTEN unidos a la proteína de fusión están separados por una secuencia de aminoácidos de al menos 300, a aproximadamente 400 aminoácidos, y el cuarto XTEN está unido dentro del domino B (o fragmento del mismo) o dentro del dominio C (o el extremo del mismo).

En otros aspectos más, la enseñanza proporciona CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0-3,5 o mayor, la CFXTEN comprende al menos cinco XTEN teniendo cuatro XTEN al menos 42 a aproximadamente 144 aminoácidos, en la que al menos cuatro de los XTEN están unidos a la proteína de fusión con no menos de aproximadamente 100, 200, o aproximadamente 300 o aproximadamente 400 aminoácidos de separación entre dos cualesquiera de los cuatro XTEN y un quinto XTEN está unido dentro del dominio B (o fragmento del mismo) o dentro del dominio C (o el extremo del mismo). En un aspecto, la enseñanza proporciona una CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0-3,5 o mayor, la CFXTEN comprende al menos cinco XTEN teniendo cuatro XTEN al menos 42 a aproximadamente 144 aminoácidos, en la que al menos tres de los XTEN unidos a la proteína de fusión están separados por una secuencia de aminoácidos de al menos 300, a aproximadamente 400 aminoácidos, el cuarto XTEN está unido dentro del domino B (o fragmento del mismo) y un quinto XTEN está unido dentro del dominio C (o el extremo del mismo).

En un aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0, o 2,1, o 2,2, o 2,3, o 2,4, o 2,5, o 2,6, o 2,7, o 2,8, o 2,9, o 3,0, o 3,1, o 3,2, o 3,3, o 3,4, o 3,5 o mayor, y la composición no comprende determinadas secuencias. En un aspecto de lo anterior, la enseñanza proporciona CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0-3,5 o mayor con la condición de que la proteína de fusión no comprenda una secuencia de una cualquiera de la tabla 50 o tabla 51. En otro aspecto de lo anterior, la enseñanza proporciona CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0-3,5 o mayor con la condición de que la proteína de fusión no comprenda una secuencia que tenga una secuencia de XTEN de la familia AG. En otro aspecto de lo anterior, la enseñanza proporciona CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0-3,5 o mayor con la

condición de que la proteína de fusión no comprenda una secuencia selecciona de GTPGSGTASSSP (SEQ ID NO: 31), GSSTPSGATGSP (SEQ ID NO: 32), GSSPSASTGTGP (SEQ ID NO: 33), GASPGTSSTGSP (SEQ ID NO: 34). En otro aspecto de lo anterior, la enseñanza proporciona CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0-3,5 o mayor con la condición de que la proteína de fusión no comprenda ninguna cualquiera de las secuencias seleccionas de GTPGSGTASSSP (SEQ ID NO: 31), GSSTPSGATGSP (SEQ ID NO: 32), GSSPSASTGTGP (SEQ ID NO: 33), GASPGTSSTGSP (SEQ ID NO: 34 y GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP (SEQ ID NO: 59). En otro aspecto de lo anterior, la enseñanza proporciona CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0-3,5 o mayor con la condición de que la proteína de fusión no comprenda una secuencia selecciona de

GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSG
SETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST
EPSEGSAP (SEQ ID NO: 59),

PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS
STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP
GSGTASSS (SEQ ID NO: 71), o

PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG
ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGA
SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG
SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG
TASSSPGSSTPSGATGS (SEQ ID NO: 80).

En otro aspecto de lo anterior, la enseñanza proporciona CFXTEN en que la relación de radios de XTEN es de al menos 2,0-3,5 o mayor con la condición de que la proteína de fusión no comprenda una secuencia de XTEN que consiste en

GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSG
SETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST
EPSEGSAP (SEQ ID NO: 59).

PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS
STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP
GSGTASSS (SEQ ID NO: 71), o

PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG
ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGA
SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG
SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG
TASSSPGSSTPSGATGS (SEQ ID NO: 80).

En un aspecto, la presente enseñanza proporciona métodos para crear CFXTEN con XTEN insertado para maximizar la interferencia estérica de agentes de unión a FVIII que de lo contrario se unirían a FVIII y neutralizarían la actividad procoagulante o provocarían la eliminación o degradación de FVIII. Por consiguiente, en un aspecto, la enseñanza proporciona un método que comprende las etapas de seleccionar una secuencia de FVIII con al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de la tabla 1, seleccionar tres o más XTEN de la tabla 4 en que la relación de radios de XTEN sea de al menos 2,0, o 2,1, o 2,2, o 2,3, o 2,4, o 2,5, o 2,6, o 2,7, o 2,8, o 2,9, o 3,0, o 3,1, o 3,2, o 3,3, o 3,4, o 3,5 o mayor, crear construcciones de expresión diseñadas para ubicar dicho XTEN en o proximal a ubicaciones seleccionadas de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9, en las que los tres o más XTEN sean de al menos 300 a 400 aminoácidos, expresar y recuperar la CFXTEN resultante y ensayar las proteínas de fusión resultantes en un ensayo descrito en la presente memoria para confirmar la unión reducida de la proteína de fusión de CFXTEN. Mediante el método de la enseñanza, una CFXTEN muestra una unión al menos un 5 % reducida, o al menos un 10 % reducida, o al menos un 15 % reducida, o al menos un 20 % reducida, o al menos un 25 % reducida,

o al menos un 40 % reducida, o al menos un 50 % reducida, o al menos un 60 % reducida, o al menos un 70 % reducida, o al menos un 80 % reducida a un agente de unión a FVIII incluyendo, aunque sin limitación, los anticuerpo de la tabla 10, y muestra actividad procoagulante.

5. Configuraciones de proteína de fusión de CFXTEN con secuencias espaciadoras y de escisión

En otro aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN configurada con una o más secuencias espaciadoras incorporadas en o adyacentes al XTEN que se diseñan para que incorporen o potencien una funcionalidad o propiedad de la composición, o como un auxiliar en el ensamblaje o fabricación de las composiciones de proteína de fusión. Dichas propiedades incluyen, aunque sin limitación, la inclusión de una o más secuencias de escisión para permitir la liberación de componentes, de inclusión de aminoácidos compatibles con sitios de restricción de nucleótidos para permitir la unión de nucleótidos codificantes de XTEN a nucleótidos codificantes de FVIII o que faciliten la construcción de vectores de expresión, y conectores diseñados para reducir la impedancia estérica en regiones de proteínas de fusión de CFXTEN.

En un aspecto, una secuencia espaciadora puede introducirse entre una secuencia de XTEN y un componente de FVIII para disminuir la impedancia estérica de modo que el componente de FVIII pueda asumir su estructura terciaria deseada y/o interactúe apropiadamente con su sustrato diana o enzima de procesamiento. Para espaciadores y métodos de identificación de espaciadores deseables, véase, por ejemplo, George, *et al.* (2003) Protein Engineering 15:871-879. En un aspecto, el espaciador comprende una o más secuencias peptídicas que son entre 1-50 residuos aminoacídicos de longitud, o aproximadamente 1-25 residuos, o aproximadamente 1-10 residuos de longitud. Las secuencias espaciadoras, exclusivas de sitios de escisión, pueden comprender cualquiera de los 20 L-aminoácidos naturales, y preferiblemente tendrán propiedades de tipo XTEN por que la mayoría de residuos serán aminoácidos hidrófilos que no están impedidos estéricamente tales como, aunque sin limitación, glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E), prolina (P) y aspartato (D). El espaciador puede ser un único residuo de glicina, poliglicinas o polialaninas, o es predominantemente una mezcla de combinaciones de residuos de glicina, serina y alanina. En un aspecto, una secuencia espaciadora, exclusiva de aminoácidos de sitio de escisión, tiene de aproximadamente 1 a 10 aminoácidos que consisten en aminoácidos seleccionados de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P) y están sustancialmente desprovistos de estructura secundaria; por ejemplo, menos de aproximadamente un 10 %, o menos de aproximadamente un 5 % como se determina por los algoritmos de Chou-Fasman y/o de GOR. En un aspecto, la secuencia espaciadora es GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). En otro aspecto, la secuencia espaciadora es GPEGPS (SEQ ID NO: 1612) unida a una secuencia de escisión de la tabla 12. Además, las secuencias espaciadoras se diseñan para evitar la introducción de epítopos de linfocitos T que pueden conseguirse, en parte, evitando o limitando el número de aminoácidos hidrófobos utilizados en el espaciador; la determinación de epítopos se describe anteriormente y en los ejemplos.

En un aspecto particular, la proteína de fusión de CFXTEN comprende una o más secuencias espaciadoras unida en la una o más uniones entre la secuencia de FVIII de carga y el uno o más XTEN incorporados en la proteína de fusión, en la que las secuencias espaciadoras comprenden aminoácidos que son compatibles con nucleótidos que codifican sitios de restricción. En otro aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN comprende una o más secuencias espaciadoras unidas a la una o más uniones entre la secuencia de FVIII de carga y el uno o más XTEN incorporados en la proteína de fusión, en la que las secuencias espaciadoras comprenden aminoácidos que son compatibles con nucleótidos que codifican sitios de restricción y los aminoácidos y el uno o más aminoácidos de las secuencias espaciadoras se eligen de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P). En otro aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN comprende una o más secuencias espaciadoras unidas en la una o más uniones entre la secuencia de FVIII de carga y uno o más XTEN incorporados en la proteína de fusión, en la que las secuencias espaciadoras comprenden aminoácidos que son compatibles con nucleótidos que codifican sitios de restricción y la una o más secuencias espaciadoras se eligen de las secuencias de la tabla 11. La secuencia exacta de cada secuencia espaciadora se elige para que sea compatible con sitios de clonación en vectores de expresión que se usan para una construcción de CFXTEN particular. En un aspecto, la secuencia espaciadora tiene propiedades compatibles con XTEN. En un aspecto, la secuencia espaciadora es GAGSPGAETA (SEQ ID NO: 178). Para secuencias de XTEN que se incorporan internas a la secuencia de FVIII, cada XTEN en general estaría flanqueado por dos secuencias espaciadoras que comprenden aminoácidos compatibles con sitios de restricción, mientras que el XTEN adherido al extremo N o C requeriría únicamente una única secuencia espaciadora en la unión de los dos componentes y otra en el extremo opuesto para la incorporación en el vector. Como seria evidente para un experto en la materia, las secuencias espaciadoras que comprenden aminoácidos compatibles con sitios de restricción que son internos a FVIII podrían omitirse de la construcción cuando se genera sintéticamente un gen de CFXTEN completo.

Tabla 11: Secuencias espaciadoras compatibles con sitios de restricción

Secuencia espaciadora	**Enzima de restricción**
GSPG (SEQ ID NO: 174)	BsaI
ETET (SEQ ID NO: 175)	BsaI
PGSSS (SEQ ID NO: 176)	BbsI
GAP	AscI

GPA	FseI
GPSGP (SEQ ID NO: 177)	SfiI
AAA	SacII
TG	AgeI
GT	KpnI
GAGSPGAETA (SEQ ID NO: 178)	SfiI
ASS	XhoI

En otro aspecto, la presente enseñanza proporciona configuraciones de CFXTEN con secuencias de escisión incorporadas en las secuencias espaciadoras. En algunos aspectos, las secuencias espaciadoras en una composición de proteína de fusión de CFXTEN comprenden una o más secuencias de escisión, que son idénticas o diferentes, en la que la secuencia de escisión puede verse afectada por una proteasa, como se muestra en la FIG. 12, para liberar FVIII, un componente de FVIII (por ejemplo, el dominio B) o una o más secuencias de XTEN de la proteína de fusión. En un aspecto, la incorporación de la secuencia de escisión en la CFXTEN se diseña para permitir la liberación del componente de FVIII que llega a ser activo o más activo (con respecto a su capacidad sirve como sitio de unión a membrana para los factores IXa y X) tras su liberación del XTEN. En el aspecto anterior, la actividad procoagulante del componente de FVIII de la CFXTEN se aumenta después de la escisión en al menos un 30 %, o al menos un 40 %, o al menos un 50 %, o al menos un 60 %, o al menos un 70 %, o al menos un 80 %, o al menos un 90 % en comparación con la CFXTEN intacta. Las secuencias de escisión están ubicadas suficientemente cerca de las secuencias de FVIII, en general en 18, o en 12, o en 6, o en 2 aminoácidos de la secuencia de FVIII, de modo que cualquier residuo remanente adherido al FVIII después de la escisión no interfiera de forma apreciable con la actividad (por ejemplo, tal como unión a una proteína de coagulación) del FVIII, aunque proporciona suficiente acceso a la proteasa para poder lograr la escisión de la secuencia de escisión. En algunos casos, la CFXTEN que comprende las secuencias de escisión también tendrá uno o más aminoácidos de secuencia espaciadora entre el FVIII y la secuencia de escisión y el XTEN y la secuencia de escisión para facilitar el acceso de la proteasa; comprendiendo los aminoácidos espaciadores cualquier aminoácido natural, incluyendo glicina, serina y alanina como aminoácidos preferidos. En un aspecto, el sitio de escisión es una secuencia que puede escindirse por una proteasa endógena al sujeto mamífero de modo que la CFXTEN pueda escindirse después de la administración a un sujeto. En dicho caso, la CFXTEN puede servir como profármaco o un depósito en circulación para el FVIII. En una construcción particular de lo anterior, la CFXTEN tendría uno o más XTEN unidos al extremo N y/o C de un FVIII-BDD mediante una secuencia de escisión que puede verse afectada por un factor de coagulación activado, y tendría un XTEN adicional ubicado entre los aminoácidos de procesamiento en la posición R740 y R1689 de modo que el XTEN pudiera liberarse, dejando una forma de FVIII similar a FVIII activado nativo. En un aspecto de la construcción anterior, el FVIII que se libera de la proteína de fusión por escisión de la secuencia de escisión muestra un aumento de al menos aproximadamente dos veces, o al menos aproximadamente tres veces, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente seis veces, o al menos aproximadamente ocho veces, o al menos aproximadamente diez veces, o al menos aproximadamente 20 veces en la actividad en comparación con la proteína de fusión de CFXTEN intacta.

Ejemplos de sitios de escisión contemplados por la enseñanza incluyen, aunque sin limitación, una secuencia polipeptídica escindible por una proteasa endógena de mamífero seleccionada de FXIa, FXIIa, calicreína, FVIIIa, FVIIIa, FXa, FIIa (trombina), elastasa-2, granzima B, MMP-12, MMP-13, MMP-17 o MMP-20, o por proteasas que no son de mamífero tales como TEV enterocinasa, proteasa PreScission™ (proteasa de rinovirus 3C) y sortasa A. Secuencias que se sabe que se escinden por las proteasas anteriores y otras son conocida en la técnica. Secuencias de escisión ejemplares contempladas por la enseñanza y los sitios de corte respectivos dentro de las secuencias se presentan en la tabla 12, así como variantes de secuencia de las mismas. Para CFXTEN que comprende una o más secuencias de escisión incorporadas, en general se prefiere que la una o más secuencias de escisión sean sustratos para proteínas de coagulación activadas. Por ejemplo, la trombina (factor de coagulación II activado) actúa sobre la secuencia LTPRSLLV (SEQ ID NO: 1618) [Rawlings N.D., *et al.* (2008) *Nucleic Acids Res.*, 36: D320], que se corta después de la arginina en la posición 4 en la secuencia. FIIa activo se produce por escisión de FII por FXa en presencia de fosfolípidos y calcio y es posterior al factor VIII en la vía de coagulación. Una vez activado, su función natural en la coagulación es escindir el fibrinógeno, que entonces, a su vez, empieza la formación del coágulo. La actividad de FIIa está muy controlada y se produce únicamente cuando es necesaria la coagulación para la hemostasia apropiada. Mediante la incorporación de la secuencia LTPRSLLV (SEQ ID NO: 1618) en la CFXTEN entre y uniendo los componentes de FVIII y XTEN, el XTEN se elimina de la unión de FVIII simultáneamente con la activación de las vías de coagulación extrínseca o intrínseca cuando e requiere la coagulación fisiológicamente, liberando selectivamente de ese modo FVIII. En otro aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN con secuencias de escisión por FXIa incorporadas entre el uno o más componentes de FVIII y XTEN que se ven afectados únicamente por el inicio del sistema de coagulación intrínseco, en la que una forma procoagulante de FVIII se libera de XTEN por FXIa para que participe en la cascada de coagulación. Aunque sin pretender limitarse a teoría particular alguna, se cree que la CFXTEN del aspecto anterior secuestraría el FVIII de los otros factores de coagulación excepto en el sito de coagulación activa, permitiendo, por tanto, dosis más grandes (y, por lo tanto, intervalos de dosificación más largos) con problemas mínimos de seguridad.

Por tanto, las secuencias de escisión, particularmente la susceptibles a proteínas de coagulación activadas procoagulantes enumeradas en la tabla 12, proporcionarían liberación mantenida de FVIII que, en determinados aspectos de la CFXTEN, pueden proporcionar un mayor grado de actividad para el componente de FVIII liberado de la forma intacta de la CFXTEN, así como un margen de seguridad adicional para dosis altas de CFXTEN administradas a un sujeto. En un aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN que comprende una o más secuencias de escisión colocadas de forma funcional para liberar el FVIII de la proteína de fusión tras la escisión, en la que la una o más secuencias de escisión tienen al menos aproximadamente un 86 %, o al menos aproximadamente un 92 %, o un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de la tabla 12.

En algunos aspectos, únicamente los dos o tres aminoácidos que flanquean ambos lados del sitio de corte (de cuatro a seis aminoácidos en total) se incorporan en la secuencia de escisión que, a su vez se incorpora en la CFXTEN de los aspectos, proporcionando, por ejemplo, sitios de liberación de XTEN. En otros aspectos la secuencia de escisión incorporada de la tabla 12 puede tener una o más eliminaciones o inserciones o una o dos o tres sustituciones de aminoácido en el lugar de uno o dos o tres aminoácidos cualesquiera en la secuencia conocida, en la que las eliminaciones, inserciones o sustituciones provocan susceptibilidad reducida o potenciada, pero no una ausencia de susceptibilidad a la proteasa, produciendo una capacidad de adaptar la tasa de liberación del FVIII desde el XTEN. Sustituciones ejemplares dentro de las secuencias de escisión que se utilizan en la CFXTEN de la enseñanza se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Secuencias de escisión por proteasa

Proteasa que actúa sobre la secuencia	Secuencia de escisión ejemplar	SEQ ID NO:	Sitio de corte mínimo	SEQ ID NO:
FXIa	KLTR↓AET	179	KD/FL/T/R↓VA/VE/GT/GV	
FXIa	DFTR↓VVG	180	KD/FL/T/R↓VA/VE/GT/GV	
FXIIa	TMTR↓IVGG	181	NA	
Calicreína	SPFR↓STGG	182	-/-/FL/RY↓SR/RT/-/-	
FVIIa	LQVR↓IVGG	183	NA	
FIXa	PLGR↓IVGG	184	-/-/G/R↓-/-/-/-	
FXa	IEGR↓TVGG	185	IA/E/GFP/R↓STI/VFS/-/G	
FIIa (trombina)	LTPR↓SLLV	186	-/-/PLA/R↓SAG/-/-/-	
Elastasa-2	LGPV↓SGVP	187	-/-/-/VIAT↓-/-/-/-	
Granzima- B	VAGD↓SLEE	188	V/-/-/D↓-/-/-/-	
MMP-12	GPAG↓LGGA	189	G/PA/-/G↓L/-/G/-	190
MMP-13	GPAG↓LRGA	191	G/P/-/G↓L/-/GA/-	192
MMP-17	APLG↓LRLR	193	-/PS/-/↓LQ/-/LT/-	
MMP-20	PALP↓LVAQ	194	NA	
TEV	ENLYFQ↓G	195	ENLYFQ↓G/S	196
Enterocinasa	DDDK↓IVGG	197	DDDK↓IVGG	198
Proteasa 3C (PreScission™)	LEVLFQ↓GP	199	LEVLFQ↓GP	200
Sortasa A	LPKT↓GSES	201	L/P/KEAD/T↓G/-/EKS/S	202

↓indica el sitio de escisión NA: no aplicable

la lista de múltiples aminoácidos antes, entre o después de una barra oblicua indica aminoácidos alternativos que pueden sustituirse en la posición; "-" indica que cualquier aminoácido puede sustituirse en el lugar del aminoácido correspondiente indicado en la columna central

6. Secuencias de proteína de fusión de CFXTEN ejemplares

Ejemplos no limitantes de secuencias de proteínas de fusión que contienen un solo FVIII unido a uno o más XTEN se presentan en la tabla 21. Las secuencias de aminoácidos ejemplares de la tabla 21 (y las secuencias de ADN que las codifican) contienen sus marcas con fines de purificación que, como sería evidente para un experto en la materia, pueden eliminarse de la secuencia sin tener un efecto sobre la actividad procoagulante de la proteína de fusión de CFXTEN. En un aspecto, la CFXTEN de la tabla 21 comprende además aminoácidos en el extremo N correspondientes a los de FVIII humano nativo (concretamente, la secuencia MQIELSTCFFLCLLRFCFS (SEQ ID NO: 1611)) para ayudar en la expresión y secreción de la proteína de fusión de CFXTEN. En un aspecto, una composición de CFXTEN comprende una proteína de fusión que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia en comparación con una CFXTEN de la tabla 21, como alternativa al menos aproximadamente un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia en comparación con una CFXTEN de la tabla 21, cuando se alinean de forma óptima. En otro aspecto, una composición de CFXTEN comprende una proteína de fusión de la tabla 21 en que la secuencia C terminal his-his-his-his-his-his (SEQ ID NO: 1700) está eliminada. Sin embargo, la enseñanza también contempla la sustitución de cualquiera de las secuencias de FVIII de la tabla 1 en el lugar de un componente de FVIII de la CFXTEN de la tabla 21, y/o sustitución de cualquier

secuencia de una cualquiera de las tablas 3, 4 y 13-17 en el lugar de un componente de XTEN de la CFXTEN de la tabla 21. En general, la CFXTEN resultante de los ejemplos anteriores retiene al menos una parte de la actividad procoagulante del FVIII correspondiente no unido al XTEN. En las proteínas de fusión anteriores descritas anteriormente en la presente memoria en este párrafo, la proteína de fusión de CFXTEN puede comprender además una o más secuencias de escisión; por ejemplo, una secuencia de la tabla 12, estando ubicada la secuencia de escisión entre las secuencias de FVIII y XTEN o entre dominios de FVIII adyacentes unidos por XTEN. En algunos aspectos que comprenden una o más secuencias de escisión, la composición de CFXTEN intacta tiene menos actividad, pero una semivida más larga en su forma intacta en comparación con un FVIII correspondiente no unido al XTEN, pero se diseña de modo que, tras la administración a un sujeto, el componente de FVIII se libere gradualmente de la proteína de fusión por escisión en la una o más secuencia de escisión por proteasas endógenas, tras lo que el componente de FVIII muestra actividad procoagulante.

Las composiciones de CFXTEN de los aspectos pueden evaluarse para la actividad usando ensayos o parámetros *in vivo* como se describe en la presente memoria (por ejemplo, ensayos de coagulación *in vitro,* ensayos de la tabla 49 o un efecto farmacodinámico en un modelo preclínico de hemofilia o en ensayos clínicos en seres humanos, usando métodos como se describe en los ejemplos u otros métodos conocidos en la técnica para evaluar la actividad de FVIII) para determinar la idoneidad de la configuración o la variante de secuencia de FVIII, y esas composiciones de CFXTEN (incluyendo después de la escisión de cualquier sitio de escisión de liberación de XTEN incorporado) que retinen al menos al menos aproximadamente un 30 %, o aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 55 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 95 % o más de actividad en comparación con la secuencia de FVIII nativo se consideran adecuadas para su uso en el tratamiento de afecciones relacionadas con FVIII.

V). Propiedades de las composiciones de la CFXTEN de la enseñanza

(a) Propiedades farmacocinéticas de CFXTEN

Un objeto de la presente enseñanza es proporcionar proteínas de fusión de CFXTEN y composiciones farmacéuticas que comprende CFXTEN con farmacocinética potencia en comparación con FVIII no unido a XTEN. Las propiedades farmacocinéticas de un FVIII potenciado por unión a un XTEN dado al FVIII incluyen, aunque sin limitación, semivida terminal, área bajo la curva, (ABC), $C_{máx}$, volumen de distribución, mantenimiento de la CFXTEN biológicamente activa por encima de una concentración de unidades de sangre eficaz mínima durante un periodo de tiempo más largo en comparación con el FVIII no unido a XTEN. Las propiedades potenciadas permiten dosificación menos frecuente y/o un efecto procoagulante más largo en comparación con una dosis comparable de FVIII no unido a XTEN. La potenciación de una o más de estas propiedades puede producir beneficios en el tratamiento de afecciones relacionadas con el factor VIII.

Se ha informado de que el factor VIII administrado de forma exógena tiene una semivida terminal en seres humanos de aproximadamente 12-14 horas cuando está en complejo con proteína de factor de Von Willebrand normal, mientras que en ausencia de factor de Von Willebrand, la semivida del factor VIII se reduce a 2 horas (Tuddenham EG, *et al.,* Br J Haematol. (1982) 52(2):259-267; Bjorkman, S., *et al.* Clin Pharmacokinet. (2001) 40:815). Como resultado de las propiedades potenciadas conferidas por XTEN, la CFXTEN, cuando se usa a la dosis y pauta posológica determinadas como apropiadas para el sujeto y su afección subyacente, puede conseguir una concentración en circulación que produce un efecto procoagulante o clínico deseado durante un periodo prolongado de tiempo en comparación con una dosis comparable del FVIII correspondiente no unido a XTEN. Como se usa en la presente memoria, una "dosis comparable" significa una dosis con moles/kilogramo o unidades internacionales/kilogramo (UI/kg) equivalentes para la composición que se administra a un sujeto. Se entenderá en la técnica que una "dosis comparable" de FVIII no unido a XTEN representaría un peso menor de fármaco, pero tendría esencialmente las mismas UI o equivalentes molares de CFXTEN en la dosis.

Una unidad internacional ("UI") de factor VIII se define en la técnica como la actividad coagulante presente en 1 ml de plasma humano normal. Se espera que un ser humano individual no hemofílico normal tenga aproximadamente 100 UI/dl de actividad de factor VIII. En hemofilia A, las dosis requeridas para el tratamiento dependen de la afección. Para hemorragias mínimas, dosis de factor VIII nativo o recombinante de 20 a 40 UI/kg se administran típicamente, según lo necesario. Para hemorragia moderada, se administran dosis de 30 a 60 UI/kg según lo necesario, y para hemorragias graves, pueden requerirse dosis de 80 a 100 UI/kg, con dosis repetidas de 20 a 25 UI/kg dadas cada 8 a 12 horas hasta que se resuelve la hemorragia. Para profilaxis contra hemorragia en pacientes con hemofilia A grave, las dosis habituales de preparaciones de FVIII nativo o recombinante son de 20 a 40 UI/kg de peso corporal a intervalos de aproximadamente 2 a 3 días. Una ecuación convencional para estimar una dosis apropiada de una composición que comprende FVIII es:

Unidades requeridas = peso corporal (kg) x elevación deseada de factor VIII (UI/dl o % del normal) x 0,5 (UI/kg por UI/dl)

En muchos casos los niveles terapéuticos de FVIII en sujetos de diferentes edades o grado de enfermedad se han establecido y están disponibles en la bibliografía publicada o se indican en la etiqueta del fármaco para productos aprobados que contienen el FVIII. Por ejemplo, el Subcomité sobre factor VIII y factor IX del Comité Científico y de Normalización de la International Society on Thrombosis and Haemostasis indicó, en el sitio web ISTH el 29 de noviembre de 2000, que la medida más ampliamente usada de hemofilia A se establece determinando las concentraciones en circulación de niveles procoagulantes de FVIII en plasma, con personas con <1 % (<0,01 UI/ml) de factor VIII definidos como graves; 1-5 % (0,01-0,05 UI/ml) como moderadamente grave; y >5-40 % (0,05-<0,40 UI/ml) como leve, donde normal es 1 UI/ml de factor VIIIC (100 %). Los niveles terapéuticos pueden establecerse para nuevas composiciones, incluyendo las CFXTEN y composiciones farmacéuticas que comprenden CFXTEN de la divulgación, usando métodos convencionales. En la práctica de la presente enseñanza, se entenderá que cualquier dosificación de CFXTEN que sea eficaz puede usarse para tratar episodios hemorrágicos o mantener la hemostasia. Los métodos para establecer los niveles terapéuticos y pautas posológicas para una composición dada son conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Goodman y Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11.ª edición, McGraw-Hill (2005)). Por ejemplo, usando estudios de aumento de dosis en sujetos con la afección diana para determinar la eficacia o un efecto farmacológico deseable, la aparición de acontecimientos adversos y la determinación de los niveles sanguíneos en circulación, los niveles sanguíneos terapéuticos para un sujeto dado o población de sujetos pueden determinarse para un fármaco o producto biológico dado. Los estudios de aumento de dosis evaluarían la actividad de una CFXTEN a través de estudios en un sujeto o grupo de sujetos con hemofilia A. Los estudios controlarían los niveles sanguíneos de procoagulante, así como los parámetros fisiológicos o clínicos que se conocen en la técnica o como se describe en la presente memoria para uno o más parámetros asociados con la afección relacionada con factor VIII, o parámetros clínicos asociados con un resultado beneficioso, junto con observaciones y/o parámetros medidos para determinar la dosis sin efecto, los acontecimientos adversos, la dosis eficaz mínima y similares, junto con la medición de parámetros farmacocinéticos que establecen los niveles sanguíneos en circulación determinados o derivados. Los resultados entonces pueden correlacionarse con la dosis administrada y las concentraciones sanguíneas del agente terapéutico que son coincidente con los parámetros o niveles de efectos determinados anteriormente. Mediante estos métodos, un intervalo de dosis y concentraciones sanguíneas puede correlacionarse con la dosis eficaz mínima, así como la dosis máxima y la concentración sanguínea a la que se produce un efecto deseado o se mantiene y el periodo durante el que puede mantenerse, estableciendo de ese modo los niveles sanguíneos terapéuticos y la pauta posológica para la composición. Por tanto, mediante los métodos anteriores, se establece el nivel sanguíneo $C_{mín}$, por debajo del que la proteína de fusión de CFXTEN no tendría el efecto farmacológico deseado y un nivel sanguíneo $C_{máx}$, por encima del que pueden producirse efectos secundarios tales como trombosis (Brobrow, RS, JABFP (2005) 18(2):147-149), estableciendo la ventana terapéutica para la composición.

Un experto en la materia puede confirmar, por los medios divulgados en la presente memoria o mediante otros métodos conocidos en la técnica, que la CFXTEN administrada permanece a los niveles sanguíneos terapéuticos para mantener la hemostasia para el intervalo deseado o requiere ajuste en la dosis o longitud o secuencia de XTEN. Además, la determinación de la dosis apropiada y la frecuencia de la dosis para mantener la CFXTEN dentro de la ventana terapéutica establece la pauta posológica terapéuticamente eficaz; el cronograma para la administración de múltiples dosis consecutivas usando una dosis terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión a un sujeto que lo necesita produciendo picos de $C_{máx}$ consecutivos y/o mínimos de $C_{mín}$ que permanecen por encima de las concentraciones terapéuticamente eficaces y producen una mejora en al menos un parámetro medido pertinente para la afección diana. En un aspecto, la CFXTEN o una composición farmacéutica que comprende CFXTEN administrada a una dosis apropiada a un sujeto produce concentraciones sanguíneas de la proteína de fusión de CFXTEN que permanece por encima de la concentración eficaz mínima para mantener la hemostasia durante un periodo al menos aproximadamente dos veces más largo en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN y administrado a una dosis comparable; como alternativa al menos aproximadamente tres veces más largo; como alternativa al menos aproximadamente cuatro veces más largo; como alternativa al menos aproximadamente cinco veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente seis veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente siete veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente ocho veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente nueve veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente diez veces más largo o al menos aproximadamente veinte veces más largo o mayor en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN y administrado a una dosis comparable. Como se usa en la presente memoria, una "dosis apropiada" significa una dosis de un fármaco o producto biológico que, cuando se administra a un sujeto, produciría un efecto terapéutico farmacológico deseable (por ejemplo, hemostasia) y/o una concentración sanguínea dentro de la ventana terapéutica.

En la práctica de la enseñanza, en general se prefieren CFXTEN con semivida terminal más larga, para mejorar la comodidad del paciente, para aumentar el intervalo entre las dosis y para reducir la cantidad de fármaco requerida para conseguir un efecto mantenido. Los parámetros PK potenciados permiten una dosificación reducida de las presentes composiciones en comparación con FVIII no unido a XTEN, particularmente para aquellos sujetos con hemofilia A que reciben profilaxis rutinaria.

Como se describe más completamente en los ejemplos que se refieren a las características farmacocinéticas de las proteínas de fusión que comprenden XTEN, se observó que aumentar la longitud total del XTEN, individualmente o en combinación, confiere un aumento desproporcionado en la semivida terminal de una proteína de fusión que comprende

el XTEN. Por consiguiente, la enseñanza proporciona proteínas de fusión de CFXTEN y composiciones farmacéuticas que comprenden CFXTEN, en las que la CFXTEN muestra una semivida potenciada cuando se administra a un sujeto. En algunos aspectos, la enseñanza proporciona proteínas de fusión de CFXTEN monoméricas que comprenden uno o más XTEN, en las que el número y ubicación del XTEN se seleccionan para conferir un aumento en la semivida terminal para la CFXTEN administrada a un sujeto en comparación con el FVIII correspondiente no unido al XTEN y administrado a una dosis comparable, en las que el aumento es al menos aproximadamente dos veces más largo, o al menos aproximadamente tres veces, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente seis veces, o al menos aproximadamente siete veces, o al menos aproximadamente ocho veces, o al menos aproximadamente nueve veces, o al menos aproximadamente diez veces, o al menos aproximadamente 15 veces, o al menos 20 veces, o al menos 40 veces o de mayor aumento en la semivida terminal en comparación con el FVIII no unido al XTEN. En otros aspectos, la enseñanza proporciona composiciones de CXTEN y composiciones farmacéuticas que comprenden CFXTEN, en las que la administración de una composición a un sujeto que lo necesita produce una semivida terminal que es al menos 12 h mayor, o al menos aproximadamente 24 h mayor, o al menos aproximadamente 48 h mayor, o al menos aproximadamente 96 h mayor, o al menos aproximadamente 144 h mayor, o al menos aproximadamente 7 días mayor, o al menos aproximadamente 14 días mayor, o al menos aproximadamente 21 días mayor en comparación con una dosis comparable de FVIII no unido a XTEN. En otro aspecto, la administración de una dosis eficaz de coagulación de una proteína de fusión de CFXTEN a un sujeto que lo necesita puede producir un aumento en el tiempo entre las dosis consecutivas necesarias para mantener los niveles sanguíneos de aproximadamente 0,1 UI/ml de al menos 48 h, o al menos 72 h, o al menos aproximadamente 96 h, o al menos aproximadamente 120 h, o al menos aproximadamente 7 días, o al menos aproximadamente 14 días, o al menos aproximadamente 21 días entre dosis consecutivas en comparación con un FVIII no unido a XTEN y administrado a una dosis comparable.

En un aspecto, la presente enseñanza proporciona proteínas de fusión de CFXTEN y composiciones farmacéuticas que comprenden CFXTEN que muestran, cuando se administran a un sujeto que lo necesita, un aumento en la ABC de al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 100 %, o al menos aproximadamente un 150 %, o al menos aproximadamente un 200 %, o al menos aproximadamente un 300 %, o al menos aproximadamente un 500 %, o al menos aproximadamente un 1000 %, o al menos aproximadamente un 2000 % en comparación con el FVIII correspondiente no unido al XTEN y administrado a un sujeto a una dosis comparable. Los parámetros farmacocinéticos de una CFXTEN pueden determinarse por métodos convencionales que implican dosificación, la recogida de muestras de sangre a intervalos cronometrados y el ensayo de la proteína usando ELISA, HPLC, radioensayo, ensayos de coagulación, los ensayos de la tabla 49 u otros métodos conocidos en la técnica o como se describe en la presente memoria, seguidos por cálculos convencionales de los datos para derivar la semivida y otros parámetros PK.

En un aspecto, una cantidad de UI más pequeña de aproximadamente dos veces menos, o aproximadamente tres veces menos, o aproximadamente cuatro veces menos, o aproximadamente cinco veces menos, o aproximadamente seis veces menos, o aproximadamente ocho veces menos, o aproximadamente 10 veces menos o mayor de la proteína de fusión se administra en comparación con el FVIII correspondiente no unido al XTEN en una pauta posológica necesaria para mantener la hemostasia y la proteína de fusión consigue un área bajo la curva comparable a la cantidad de UI correspondiente del FVIII no unido al XTEN necesaria para mantener la hemostasia. En otro aspecto, la proteína de fusión de CFXTEN o una composición farmacéutica que comprende CFXTEN requiere administración menos frecuente para profilaxis rutinaria de un sujeto con hemofilia A, en la que la dosis de la proteína de fusión se administra aproximadamente cada cuatro días, aproximadamente cada siete días, aproximadamente cada 10 días, aproximadamente cada 14 días, aproximadamente cada 21 días, o aproximadamente de forma mensual al sujeto, y la proteína de fusión consigue un área bajo la curva comparable al FVIII correspondiente no unido al XTEN y administrado al sujeto. En otros aspectos más, una cantidad de UI más pequeña acumulada de aproximadamente un 5 %, o aproximadamente un 10 %, o aproximadamente un 20 %, o aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 % menos de la proteína de fusión se administra a un sujeto en comparación con la cantidad de UI correspondiente del FVIII no unido al XTEN en una pauta posológica necesaria para mantener una concentración de sanguínea de 0,1 UI/ml, aunque la proteína de fusión consigue al menos un área bajo la curva comparable al FVIII correspondiente no unido al XTEN. La cantidad de UI más pequeña acumulada se mide durante un periodo de al menos aproximadamente una semana, o aproximadamente 14 días, o aproximadamente 21 días, o aproximadamente un mes.

En un aspecto, la enseñanza proporciona composiciones de CFXTEN diseñadas para reducir la unión por agentes de unión a FVIII, aumentando de ese modo la semivida terminal de CFXTEN administrada a un sujeto, mientras se retiene aún la actividad procoagulante. Se cree que la CFXTEN de la presente enseñanza ha conseguido actividad comparativamente mayor y/o mantenida mediante eliminación activa reducida de la molécula mediante la adición de XTEN no estructurado al factor de coagulación FVIII. Los mecanismos de eliminación para eliminar FVIII de la circulación aún no se han dilucidado completamente. La captación, eliminación e inactivación de las proteínas de coagulación puede producirse en el sistema circulatorio, así como en el espacio extravascular. Los factores de coagulación son proteínas complejas que interactúan con una gran cantidad de otras proteínas, lípidos y receptores,

y muchas de estas interacciones pueden contribuir a la eliminación de CF de la circulación. La proteína factor de Von Willebrand es un ejemplo de un agente de unión a FVIII que se une a FVIII. El factor VIII y el factor de Von Willebrand (VWF) circulan en la sangre como un complejo unido no covalentemente compacto en que VWF sirve como vehículo que contribuye probablemente a la protección de FVIII de los mecanismos de escisión activa, aunque, no obstante, provoca una limitación en la semivida terminal de FVIII. Por ejemplo: (i) VWF estabiliza la estructura heterodimérica de FVIII; (ii) VWF protege a FVIII de la degradación proteolítica por proteasas de unión a fosfolípidos como la proteína C activada y FX activado (FXa); (iii) VWF interfiere con la unión a FVIII a superficies fosfolipídicas cargadas negativamente expuestas dentro de plaquetas activadas; (iv) VWF inhibe la unión de FVIII a FIX activado (FIXa), impidiendo de ese modo que FVIII acceda al complejo activador de FX; y (v) VWF evita la captación celular de FVIII (Lenting, P.J., *et al*., J Thrombosis and Haemostasis (2007) 5(7):1353-1360). Además, la proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP1 también conocido como receptor de α2 macroglobulina o CD91) se ha identificado como un receptor de eliminación candidato para FVIII, con los sitios de unión a LRP1 identificados en ambas cadenas de la forma heterodimérica de FVIII (Lenting PJ, *et al.* J Biol Chem (1999) 274: 23734-23739; Saenko EL, *et al*., J Biol Chem (1999) 274: 37685-37692). Los LRP están implicados en la eliminación de una diversidad de ligandos incluyendo proteasas, inhibidores del tipo Kunitz, complejos de proteasa serpina, lipasas y lipoproteínas (Narita, *et al*., Blood (1998) 2:555-560). Se ha demostrado que la cadena ligera, pero no la cadena pesada, de factor VIII se une a proteína receptora LRP1 expuesta en superficie (Lentig *et al.* (J Biol Chem (1999) 274(34):23734-23739; y patente de Estados Unidos n.º 6919311), lo que sugiere que el LRP1 puede desempeñar una función esencial en la eliminación activa de proteínas de tipo FVIII. Aunque la interacción de VWF-FVIII es de alta afinidad (<1 nM), el complejo, no obstante, está en un equilibrio dinámico, de modo que una parte pequeña, pero importante de las moléculas de FVIII (5-8 %) circulan como proteína libre (Leyte A, *et al*., Biochem J (1989) 257: 679-683; Noe DA. Haemostasis (1996) 26: 289-303). Por tanto, una parte de FVIII nativo está sin proteger por VWF, lo que permite mecanismo de eliminación activa para eliminar el FVIII no protegido de la circulación.

En un aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN que se asocia con VWF, pero tiene protección potenciada de receptores de eliminación activos conferida por la incorporación de dos XTEN más en una o más ubicaciones dentro de la molécula FVIII (por ejemplo, ubicaciones seleccionadas de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o las FIG. 8-9), en la que el XTEN interfiere con la interacción de la CFXTEN resultante con esos receptores de eliminación con el resultado de que las propiedades farmacocinéticas de la CFXTEN se potencian en comparación en el FVIII correspondiente no unido a XTEN. En otro aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN que tiene afinidad de unión reducida con VWF de al menos un 5 % menos, o aproximadamente un 10 %, o aproximadamente un 20 %, o aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 % menos, pero no obstante, está configurada para tener protección potenciada contra receptores de eliminación activos conferida por la incorporación de XTEN en una o más ubicaciones dentro de la molécula de FVIII, en la que el XTEN interfiere con la interacción del factor VIII con esos receptores. En los aspectos anteriores, las CFXTEN tienen una semivida terminal aumentada de al menos aproximadamente 12 h, o 24 h, o 48 h, o 72 h, o 96 h, o 120 h, o 144 h o 7 días, o 10 días, o 14 días, o 21 días en comparación con el FVIII no unido a XTEN. La enseñanza proporciona un método para crear CFXTEN con eliminación reducida en el que las proteínas de fusión de CFXTEN creadas con las múltiple inserciones se evalúan para la inhibición de unión a receptores de eliminación, en comparación con FVIII no unido a XTEN, usando ensayos de unión *in vitro* o modelos farmacocinéticos *in vivo* descritos en la presente memoria u otros ensayos conocidos en la técnica, y seleccionando aquellos que demuestran unión reducida pero retienen actividad de FVIII procoagulante. Además, las proteínas de fusión anteriores pueden optimizarse para que tengan una relación de radios de XTEN aumentada de al menos 2,0-3,5 para conseguir propiedades farmacocinéticas que estén más potenciadas. La tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 y las FIG. 8-9 proporcionan ejemplos no limitantes de puntos de inserción de XTEN dentro de la secuencia del factor VIII. Usando dichos puntos de inserción, la enseñanza contempla composiciones de CFXTEN que tienen configuraciones con múltiples XTEN insertados con aproximadamente 100, o aproximadamente 200, o aproximadamente 300, o aproximadamente 400, o aproximadamente 500 aminoácidos separando al menos tres XTEN para aumentar más la protección contra los mecanismos de eliminación activa y, por tanto, aumentar la semivida terminal de la CFXTEN. Sin ligarse a una teoría particular, se espera que el XTEN de las composiciones de CFXTEN con alta carga neta (por ejemplo, CFXTEN que comprende XTEN de la familia AE) como se describe anteriormente, tenga menos interacciones no específicas con diversas superficies cargadas negativamente tales como vasos sanguíneos, tejidos o diversos receptores, que contribuirían además a una eliminación activa reducida. A la inversas, se espera que el XTEN de las composiciones de CFXTEN con una baja (o nula) carga neta (por ejemplo, CFXTEN que comprende XTEN de la familia AG) tenga un grado mayor de interacción con superficies que, aunque contribuyen a la eliminación activa, pueden potenciar la actividad del factor de coagulación asociado, dada la contribución conocida de la célula (por ejemplo, plaquetas) y las superficies vasculares al proceso de coagulación y la intensidad de activación de los factores de coagulación (Zhou, R., *et al*., Biomaterials (2005) 26(16):2965-2973; London, F., *et al.* Biochemistry (2000) 39(32):9850-9858). La enseñanza, en parte, aprovecha el hecho de que determinados ligandos, en los que puede lograrse unión reducida a un receptor de eliminación, como resultado de una velocidad de asociación disminuida o una velocidad de disociación aumentada, mediante la obstrucción de un sitio de receptor por un XTEN insertado que forma enrollamiento aleatorio, produciendo unión reducida. La elección de la configuración particular de la proteína de fusión de CFXTEN puede ensayarse por métodos divulgados en la presente memoria para confirmar esas configuraciones que reducen el grado de unión a un receptor de eliminación, de modo que se consiga una tasa reducida de eliminación activa. En un aspecto, la CFXTEN comprende una secuencia de FVIII-XTEN que tiene uno o más XTEN insertados en ubicaciones

seleccionadas de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o FIG. 8-9, en la que la semivida terminal de la CFXTEN se aumenta al menos aproximadamente dos veces, o al menos aproximadamente tres veces, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente seis veces, o al menos aproximadamente ocho veces, o al menos aproximadamente diez veces, o al menos aproximadamente veinte veces en comparación con un FVIII no unido a un XTEN. En un aspecto, la CFXTEN comprende una secuencia de FVIII-XTEN que tiene un primero y al menos un segundo XTEN insertado en una primera y segunda ubicación seleccionada de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o FIG. 8-9, en la que la semivida terminal de la CFXTEN se aumenta al menos aproximadamente dos veces, o al menos aproximadamente tres veces, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente seis veces, o al menos aproximadamente ocho veces, o al menos aproximadamente diez veces, o al menos aproximadamente veinte veces en comparación con un FVIII no unido a un XTEN. En otro aspecto más, la CFXTEN comprende una secuencia de FVIII-XTEN que incorpora múltiples secuencias de XTEN usando tres de más ubicaciones de inserción de XTEN seleccionadas de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o FIG. 8-9, separadas en aproximadamente 100, o aproximadamente 200, o aproximadamente 300, o aproximadamente 400, o aproximadamente 500 aminoácidos, en la que la semivida terminal de la CFXTEN se aumenta al menos aproximadamente dos veces, o al menos aproximadamente tres veces, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente seis veces, o al menos aproximadamente ocho veces, o al menos aproximadamente diez veces, o al menos aproximadamente veinte veces en comparación con un FVIII no unido a un XTEN. En los aspectos anteriores descritos anteriormente en la presente memoria en este párrafo, los XTEN incorporados en las configuraciones de CFXTEN pueden ser idénticos o pueden ser diferente, y pueden tener al menos aproximadamente un 80 %, o un 90 %, o un 91 %, o un 92 %, o un 93 %, o un 94 %, o un 95 %, o un 96 %, o un 97 %, o un 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de una cualquiera de las tablas 3, 4 y 13-17, y opcionalmente pueden incluir una o más secuencias de escisión de la tabla 12, que facilitan la liberación de uno o más de los XTEN de la proteína de fusión de CFXTEN.

En un aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN que potencia la farmacocinética de la proteína de fusión por unión de uno o más XTEN, al componente de FVIII de la proteína de fusión, en la que la proteína de fusión tiene una aumento en el factor de peso molecular aparente de al menos aproximadamente dos veces, o al menos aproximadamente tres veces, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente seis veces, o al menos aproximadamente siete veces, o al menos aproximadamente ocho veces, o al menos aproximadamente diez veces, o al menos aproximadamente doce veces, o al menos aproximadamente quince veces, y en la que la semivida terminal de la CFXTEN, cuando se administra a un sujeto, se aumenta al menos aproximadamente dos veces, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente ocho veces, o al menos aproximadamente 10 veces o más en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN. En el aspecto anterior, en la que al menos dos moléculas de XTEN se incorporan en la CFXTEN, los XTEN pueden ser idénticos o pueden ser de una composición de secuencia, carga neta o longitud diferente. El XTEN puede tener al menos aproximadamente un 80 %, o un 90 %, o un 91 %, o un 92 %, o un 93 %, o un 94 %, o un 95 %, o un 96 %, o un 97 %, o un 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de una cualquiera de las tablas 3, 4 y 13-17, y opcionalmente puede incluir una o más secuencias de escisión de la tabla 12, que facilitan la liberación de uno o más de los XTEN de la proteína de fusión de CFXTEN.

Por tanto, la enseñanza proporciona composiciones de CFXTEN en que el grado de actividad, biodisponibilidad, semivida o característica fisicoquímica de la proteína de fusión puede personalizarse mediante la selección y colocación del tipo y longitud del XTEN en las composiciones de CFXTEN. Por consiguiente, la enseñanza contempla composiciones en que un FVIII de la tabla 1 y XTEN o fragmento de XTEN de una cualquiera de las tablas 3, 4 o 13-17 se producen, por ejemplo, en una configuración seleccionada de una cualquiera de las fórmulas I-VIII o los XTEN se insertan en ubicaciones seleccionadas de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o FIG. 8-9 de modo que la construcción tenga la propiedad deseada.

La enseñanza proporciona métodos para producir las composiciones de CFXTEN que pueden mantener el componente de FVIII a niveles terapéuticos en un sujeto que lo necesita durante un periodo de tiempo al menos dos veces, o al menos tres veces, o al menos cuatro veces, o al menos cinco veces mayor en comparación con dosificaciones comparables del FVIII correspondiente no unido a XTEN. En un aspecto del método, el sujeto está recibiendo profilaxis rutinaria para evitar episodios hemorrágicos. En otro aspecto del método, el sujeto está recibiendo tratamiento para un episodio hemorrágico. En otro aspecto del método, el sujeto está recibiendo tratamiento para elevar la concentración sanguínea en circulación de FVIII procoagulante por encima de un 1 %, o por encima de un 1-5 %, o por encima de un 5-40 % con respecto a concentraciones de FVIII en plasma normal. "Procoagulante", como se usa en la presente memoria, tiene su significado general en la técnica y en general se refiere a una actividad que promueve la formación de coágulos, en un ensayo *in vitro* o *in vivo.* El método para producir las composiciones que pueden mantener el componente de FVIII a niveles terapéuticos incluyen las etapas de seleccionar uno o más XTEN apropiados para la conjugación con un FVIII para proporcionar las propiedades farmacocinéticas deseadas en vista de una dosis y pauta posológica dadas, crear una construcción génica que codifique la CFXTEN en una de las configuraciones divulgadas en la presente memoria, transformar una célula hospedadora apropiada con un vector de expresión que comprende el gen codificante, expresar la proteína de fusión en condiciones de cultivo adecuadas, recuperar la CFXTEN, la administración de la CFXTEN a un mamífero seguida de ensayos para verificar las

propiedades farmacocinéticas y la actividad de la proteína de fusión de CFXTEN (por ejemplo, la capacidad de mantener la hemostasia o servir como procoagulante) y la seguridad de la composición administrada. Esas composiciones que muestran las propiedades deseadas se seleccionan para uso adicional. La CFXTEN creada por los métodos proporcionados en la presente memoria pueden producir eficacia aumentada de la composición administrada mediante, entre otras propiedades, el mantenimiento de las concentraciones en circulación del componente de FVIII procoagulante a niveles terapéuticos durante un periodo de tiempo potenciado.

La enseñanza proporciona métodos para ensayar las proteínas de fusión de CFXTEN de diferente composición o configuración para proporcionar CFXTEN con el grado deseado de actividad procoagulante y terapéutica y propiedades farmacocinéticas, así como un perfil de seguridad suficiente. Se usan ensayos *in vitro* e *in vivo* o modelos animales específicos para evaluar la actividad y características funcionales de cada CFXTEN configurada y/o componente de FVIII a incorporar en la CFXTEN, incluyendo, aunque sin limitación, lo ensayos de los ejemplos, los ensayos de la tabla 49, así como los siguientes ensayos u otros ensayos de este tipo conocidos en la técnica para ensayar las propiedades y efecto de FVIII. Pueden realizarse ensayos funcionales que permiten la determinación de la actividad de coagulación, tal como ensayo de coagulación de una fase y ensayo de coagulación de dos fases (Barrowcliffe TW, Semin Thromb Hemost. (2002) 28(3):247-256), ensayos de protrombina parcial activada (aPTT) (Belaaouaj AA *et al*., J. Biol. *Chem*. (2000) 275:27123-8; Diaz-Collier JA. Haemost (1994) 71:339-46), ensayos cromogénicos de FVIII (Lethagen, S., *et al*., Scandinavian J Haematology (1986) 37:448-453), o ensayos farmacodinámicos en modelos animales incluyendo el tiempo de hemorragia o tromboelastografía (TEG o ROTEM), entre otros. Otros ensayos incluyen determinar la afinidad de unión de una CFXTEN por el sustrato diana usando ensayos de unión a unión competitiva, tales como ensayos Biacore con receptores unidos o chip o proteínas de unión o ensayos de ELISA, como se describe en la patente de Estados Unidos 5534617, ensayos descritos en los ejemplos en la presente memoria, radioensayos de receptor u otros ensayos conocidos en la técnica. Otros ensayos para determinar la unión de inhibidores de FVIII a CFXTEN incluyen el ensayo de Bethesda o la modificación de Nijmegen del ensayo de Bethesda. Los ensayos anteriores también pueden usarse para evaluar variantes de secuencia de FVIII (ensayadas como componente individuales o como proteínas de fusión de CFXTEN) y pueden compararse con el FVIII nativo para determinar si tienen el mismo grado de actividad procoagulante que el CF nativo, o alguna fracción del mismo de modo que sean adecuadas para su inclusión en CFXTEN; por ejemplo, al menos aproximadamente un 10 %, o al menos aproximadamente un 20 %, o al menos aproximadamente un 30 %, o al menos aproximadamente un 40 %, o al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % de la actividad en comparación con el FVIII nativo.

La optimización de la dosis es importante para todos los fármacos. Una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de la CFXTEN varía de acuerdo con factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo y peso del individuo y la capacidad de la proteína de fusión administrada de provocar una respuesta deseada en el individuo. Por ejemplo, una dosis individual normalizada de FVIII para todos los pacientes que presentan diversas afecciones hemorrágicas o parámetros clínicos anómalos (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) no siempre puede ser eficaz. Los pacientes con hemofilia A con traumatismo, que han experimentado cirugía o que tienen altas concentraciones de anticuerpos inhibidores de FVIII en general requerirán dosis mayores y más frecuentes. En general, el nivel de dosificación se ajusta en la frecuencia, duración y unidades de acuerdo con la gravedad y duración de cada episodio hemorrágico del paciente. Por consiguiente, la CFXTEN se incluye en el excipiente, vehículo de suministro o estabilizante farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para suministrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión para detener la hemorragia, medida por ensayos de coagulación convencionales. Una consideración de estos factores pertenece al campo del médico experto habitual con el fin de determinar la cantidad terapéutica o farmacológicamente eficaz de la CFXTEN y la pauta posológica apropiada, frente a esa cantidad que provocaría potencia insuficiente de modo que no se conseguiría mejora clínica o la detención de la hemorragia.

La enseñanza proporciona métodos para establecer una pauta posológica para las composiciones farmacéuticas de CFXTEN de la enseñanza. Los métodos incluyen la administración de dosis consecutivas de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de CFXTEN usando periodos variables de tiempo entre las dosis para determinar el intervalo de dosificación suficiente para conseguir y/o mantener el parámetro, nivel sanguíneo o efecto clínico deseado; dichas dosis consecutivas de una cantidad terapéuticamente eficaz en el intervalo eficaz establece la pauta posológica terapéuticamente eficaz para la CFXTEN para un estado patológico o afección relacionada con el factor VIII. Una cantidad profilácticamente eficaz se refiere a una cantidad de CFXTEN necesaria durante el periodo de tiempo necesario para evitar un resultado o evento fisiológico o clínico; por ejemplo, aparición retardada de un episodio hemorrágico o mantenimiento de las concentraciones sanguíneas de FVIII procoagulante o equivalente por encima de un nivel umbral (por ejemplo, de un 1-5 % a un 5-40 % del normal). En los métodos de tratamiento, la cantidad de dosificación de la CFXTEN que se administra a un sujeto varía de aproximadamente 5 a 300 UI/kg/dosis, o de aproximadamente 10 a 100 UI/kg/dosis, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 65 UI/kg/dosis, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 UI/kg/dosis para un sujeto. Una dosificación adecuada también dependerá de otros factores que pueden influir en la respuesta al fármaco; por ejemplo, los episodios hemorrágicos en general requieren dosis mayores a intervalos más frecuentes en comparación con la profilaxis.

En algunos aspectos, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una composición de proteína de fusión de CFXTEN y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable a un sujeto que lo necesita, en el que la administración produce una mejora mayor en al menos un parámetro o afección fisiológica asociada con una deficiencia de FVIII o coagulopatía, o produce un resultado clínico más favorable mediado por el componente de FVIII de la CFXTEN en comparación con el efecto sobre el parámetro, afección o resultado clínico mediado por la administración de una composición farmacéutica que comprende un FVIII no unido a XTEN y administrado a una dosis comparable. Ejemplos no limitantes de parámetros que se mejoran incluyen la concentración sanguínea de FVIII procoagulante, un tiempo de ensayo de protrombina parcial activada (aPTT) reducido, un tiempo de ensayo de coagulación de una fase o dos fases reducido, aparición retardada de un episodio hemorrágico, un tiempo de ensayo cromogénico de FVIII reducido, un tiempo de hemorragia reducido, resolución de un evento hemorrágico o un valor de Bethesda reducido para la CFXTEN con respecto al FVIII nativo. En un aspecto de lo anterior, la mejora se consigue mediante la administración de la composición farmacéutica de CFXTEN a una dosis que consigue una concentración en circulación de FVIII procoagulante (o equivalente) por encima de un nivel umbral (por ejemplo, de un 1-5 % o un 5-40 % de niveles de FVIII normales), estableciendo de ese modo la dosis terapéuticamente eficaz. En otro aspecto de lo anterior, la mejora se consigue mediante la administración de múltiples dosis consecutivas de la composición farmacéutica de CFXTEN usando una pauta posológica terapéuticamente eficaz que mantiene una concentración en circulación de FVIII procoagulante (o equivalente) por encima de un nivel umbral (por ejemplo, de un 1-5 % o un 5-40 % de niveles de FVIII normales) durante todo el periodo de dosificación. En otro aspecto del método, la administración de al menos dos dosis consecutivas de la composición farmacéutica de CFXTEN usando una pauta posológica terapéuticamente eficaz mantiene una concentración en circulación de FVIII procoagulante (o equivalente) por encima de aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 30 % o un 40 % de los niveles de FVIII normales durante un periodo que es al menos aproximadamente tres veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente cuatro veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente cinco veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente seis veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente siete veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente ocho veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente nueve veces más largo, o al menos aproximadamente diez veces más largo en comparación con un FVIII no unido a XTEN y administrado usando una pauta posológica terapéuticamente eficaz.

En un aspecto, la CFXTEN o una composición farmacéutica que comprende CFXTEN administrada a una pauta posológica terapéuticamente eficaz produce un aumento en el tiempo de al menos aproximadamente tres veces más largo; como alternativa al menos aproximadamente cuatro veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente cinco veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente seis veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente siete veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente ocho veces más largo, como alternativa al menos aproximadamente nueve veces más largo, o al menos aproximadamente diez veces más largo entre al menos dos picos de $C_{máx}$ y/o valles de $C_{mín}$ consecutivos para los niveles sanguíneos de la proteína de fusión en comparación con la proteína biológicamente activa correspondiente de la proteína de fusión no unida al XTEN y administrada a una pauta posológica comparable a un sujeto. En otro aspecto, la CFXTEN administrada a una pauta posológica terapéuticamente eficaz produce una mejora comparable en uno, o dos, o tres o más parámetros medidos usando dosificación menos frecuente o una dosificación total inferior en UI de la proteína de fusión de la composición farmacéutica en comparación con el uno o más componentes de la proteína biológicamente activa correspondiente no unidos al XTEN y administrados a un sujeto usando una pauta posológica terapéuticamente eficaz para el FVIII. Los parámetros medidos incluyen cualquiera de los parámetros clínicos, bioquímicos o fisiológicos divulgados en la presente memoria, u otros conocidos en la técnica para evaluar a sujetos con afecciones relacionas con factor VIII.

(b) Farmacología y propiedades farmacéuticas de CFXTEN

La presente enseñanza proporciona composiciones de CFXTEN que comprenden FVIII unido covalentemente a XTEN que tienen propiedades farmacéuticas y farmacológicas potenciadas en comparación con FVIII no unido a XTEN, así como métodos para potenciar el efecto terapéutico y/o procoagulante de los componentes de FVIII de las composiciones. Además, la enseñanza proporciona composiciones de CFXTEN con propiedades potenciadas en comparación con las proteínas de fusión conocidas en la técnica de factor VIII que contienen albúmina, compañeros polipeptídicos de inmunoglobulina, polipéptidos de longitud más corta y/o compañeros polipéptidos con secuencias repetitivas. Además, las proteínas de fusión de CFXTEN proporcionan ventajas importantes sobre los conjugado químicos, tales como construcciones pegiladas de FVIII, notablemente el hecho de que las proteínas de fusión de CFXTEN recombinantes pueden prepararse en sistemas de expresión de células hospedadoras, que pueden reducir el tiempo y el coste en las fases de investigación y desarrollo y fabricación de un producto, así como producir un producto definido más homogéneo con menos toxicidad por parte del productos y los metabolitos de la CFXTEN en comparación con conjugados pegilados.

Como agentes terapéuticos, la CFXTEN posee varias ventajas sobre los agentes terapéuticos que no comprenden XTEN, incluyendo una o más de la siguientes propiedades no limitantes: solubilidad aumentada, estabilidad térmica aumentada, inmunogenia reducida, peso molecular aparente aumentado, eliminación renal reducida, proteólisis reducida, metabolismo reducido, eficacia terapéutica potenciada, pauta posológica menos frecuente con un tiempo

aumentado entre las dosis que puede mantener la hemostasia en un sujeto con hemofilia A, la capacidad de administrar la composición de CFXTEN por vía subcutánea o intramuscular, una tasa "personalizada" de absorción cuando se administra por vía subcutánea o intramuscular, estabilidad en liofilización potenciada, estabilidad en suero/plasma potenciada, semivida terminal aumentada, solubilidad aumentada en el torrente sanguíneo, unión disminuida por anticuerpos neutralizantes, eliminación activa disminuida, afinidad de unión a sustrato personalizada, estabilidad a la degradación, estabilidad a congelación-descongelación, estabilidad a proteasas, estabilidad a ubicuitinación, facilidad de administración, compatibilidad con otros excipiente o vehículos farmacéuticos, persistencia en el sujeto, estabilidad aumentada en almacenamiento (por ejemplo, vida útil aumentada) y similares. El efecto neto de las propiedades potenciadas es que el uso de una composición de CFXTEN puede producir un efecto terapéutico potenciado global en comparación con un FVIII no unido a XTEN, producir beneficios económicos asociados con una dosificación menos frecuente y/o producir un cumplimiento mejorado por parte del paciente cuando se administra a un sujeto con una afección relacionada con factor VIII.

La enseñanza proporciona composiciones de CFXTEN y composiciones farmacéuticas que comprenden CFXTEN, en las que la administración de la composición produce una mejora en al menos uno de los parámetros clínicos o bioquímicos divulgado en la presente memoria que son útiles para evaluar las presentes enfermedades, afecciones o trastornos. Ejemplos no limitantes de parámetros que se mejoran incluyen las concentraciones sanguíneas de FVIII procoagulante, un tiempo de ensayo de protrombina parcial activada (aPTT) reducido, un tiempo de ensayo de coagulación de una fase o dos fases reducido, aparición retardada de un episodio hemorrágico, un tiempo de ensayo cromogénico de FVIII reducido, un tiempo de hemorragia reducido, resolución de un evento hemorrágico o un valor de Bethesda reducido para la CFXTEN con respecto al FVIII nativo. Las propiedades farmacocinéticas potenciadas de la presente CFXTEN permite usar una dosis de UI acumulativamente inferior de la proteína de fusión para mantener el parámetro en comparación con el componente de FVIII correspondiente no unido al XTEN. En un aspecto, la dosis total de UI de una CFXTEN de los aspectos necesaria para conseguir y mantener la mejora en al menos un parámetro durante aproximadamente 2-7 días es al menos aproximadamente tres veces inferior, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente seis veces, o al menos aproximadamente ocho veces, o al menos aproximadamente 10 veces inferior en comparación con el componente de FVIII correspondiente no unido al XTEN. En otro aspecto, la dosis total en UI de una presente CFXTEN necesaria para conseguir y mantener la mejora en el al menos un parámetro sobre, dos, tres o cuatro dosis consecutivos es al menos aproximadamente tres veces inferior, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente seis veces, o al menos aproximadamente ocho veces, o al menos aproximadamente 10 veces inferior en comparación con el componente de FVIII correspondiente no unido al XTEN. Como alternativa, la enseñanza proporciona determinados aspectos de CFXTEN, en las que el periodo entre administraciones consecutivas que provoca conseguir y mantener la mejora en al menos un parámetro es al menos aproximadamente tres veces, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente seis veces, o al menos aproximadamente ocho veces, o al menos aproximadamente 10 veces más largo en comparación con el componente de FVIII correspondiente no unido al XTEN y administrado a una dosis de UI comparable. Como alternativa, la enseñanza proporciona determinados aspectos de CFXTEN, en las que la administración de 25 UI/kg produce un 30 % de mejora en un tiempo de ensayo de aPTT (o ensayo de coagulación similar) en un sujeto con hemofilia A en comparación con 25 UI/kg del FVIII correspondiente no unido a XTEN cuando se ensaya a aproximadamente 2-7 días después de la administración. En otro aspecto más, la enseñanza proporciona CFXTEN, en la que la administración de 25 UI/kg produce un 30 % de mejora en un tiempo de ensayo del tiempo de hemorragia en un sujeto con hemofilia A en comparación con 25 UI/kg del FVIII correspondiente no unido a XTEN cuando se ensaya a aproximadamente 2-7 días después de la administración.

En un aspecto, el XTEN como compañero de fusión aumenta la solubilidad de la carga de FVIII. Por consiguiente, cuando se desea la potenciación de las propiedades farmacéuticas y fisicoquímicas del FVIII, tal como el grado de solubilidad acuosa o estabilidad, la longitud y/o la composición de la familia de motivo de las secuencias de XTEN incorporadas en la proteína de fusión puede seleccionarse cada una para conferir un grado diferente de solubilidad y/o estabilidad a las proteínas de fusión respectivas de modo que las propiedad farmacéuticas globales de la composición de CFXTEN se potencien. Las proteínas de fusión de CFXTEN pueden construirse y ensayarse, usando métodos descritos en la presente memoria, para confirmar las propiedades fisicoquímicas y la elección de la longitud de secuencia de XTEN o ubicación ajustadas, según lo necesario, para producir las propiedades deseadas. En un aspecto, la CFXTEN tiene una solubilidad acuosa que es al menos aproximadamente un 25 % mayor en comparación con un FVIII no unido al XTEN, o al menos aproximadamente un 30 %, o al menos aproximadamente un 40 %, o al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 75 %, o al menos aproximadamente un 100 %, o al menos aproximadamente un 200 %, o al menos aproximadamente un 300 %, o al menos aproximadamente un 400 %, o al menos aproximadamente un 500 %, o al menos aproximadamente un 1000 % mayor que el FVIII correspondiente no unido a XTEN.

La enseñanza proporciona métodos para producir y recuperar CFXTEN expresada a partir de una célula hospedadora con solubilidad potenciada y facilidad de recuperación en comparación con FVIII no unido a XTEN. En un aspecto, el método incluye las etapas de transformar una célula hospedadora eucariota con un polinucleótido que codifica una CFXTEN con uno o más componentes de XTEN de longitud de secuencia acumulada mayor de aproximadamente 100, o mayor de aproximadamente 200, o mayor de aproximadamente 400, o mayor de aproximadamente 600, o

mayor de aproximadamente 800, o mayor de aproximadamente 1000, o mayor de aproximadamente 2000, o mayor de aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos, que expresa la proteína de fusión de CFXTEN en la célula hospedadora en condiciones adecuadas de cultivo e inducción, y recuperar la proteína de fusión expresada en forma soluble. En un aspecto, el uno o más XTEN de las proteínas de fusión de CFXTEN tienen cada uno al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, a aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia en comparación con uno o más XTEN seleccionados de una cualquiera de las tablas 4 y 13-17, o fragmentos de los mismos, y el FVIII tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, a aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia en comparación con un FVIII seleccionado de la tabla 1, y las componentes de CFXTEN están en una configuración de extremo N a C seleccionada de uno cualquiera de los aspectos de configuración divulgados en la presente memoria.

VI). Usos de las composiciones de CFXTEN

La enseñanza proporciona métodos y regímenes para conseguir un efecto beneficioso en una afección relacionada con el factor VIII mediante la administración de composiciones que comprenden CFXTEN. Como se usa en la presente memoria, "afección relacionada con el factor VIII" pretende incluir, aunque sin limitación, deficiencias del factor VIII, trastornos hemorrágicos relacionados con deficiencia del factor VIII, hemofilia A, neutralización de factor VIII por anticuerpos anti-FVIII u otros inhibidores del factor VIII, y episodios hemorrágicos producidos por traumatismo o cirugía o lesión vascular u otras afecciones de este tipo que pueden mejorare o corregirse mediante la administración de FVIII a un sujeto. Los métodos de la enseñanza consiguen un efecto beneficioso mientras abordan las desventajas y/o limitaciones de otros métodos de tratamiento usando preparaciones de factor VIII que tienen una semivida terminal relativamente corta, requieren administraciones frecuentes, se neutralizan por inhibidores o tienen una farmacoeconomía desfavorable.

La hemostasia se regula por múltiples factores proteínicos, y dichas proteínas, así como análogos de las mismas, han encontrado utilidad en el tratamiento de afecciones relacionadas con el factor VIII. Sin embargo, el uso de FVIII disponible en el mercador ha tenido un éxito menos que óptimo en el tratamiento de sujetos afectados con dichas afecciones. En particular, la optimización de la dosis y la frecuencia de la dosificación son importantes para el FVIII usado en el mantenimiento de las concentraciones de FVIII en circulación por encima de los niveles umbral necesarios para la hemostasia, así como el tratamiento o prevención de episodios hemorrágicos en sujetos con hemofilia A. El hecho de que los productos de FVIII disponibles en el mercado tengan una semivida corta necesita una dosificación frecuente para conseguir el beneficio clínico, que provoca dificultades en el tratamiento de dichos pacientes.

Como se establece por el Subcomité sobre el factor VIII y el factor IX del Comité Científico y de Normalización de la International Society on Thrombosis and Haemostasis (publicado en el sitio web ISTH el 29 de noviembre de 2000), la medida más ampliamente usada de la gravedad de hemofilia A se establece determinando las concentraciones en circulación de niveles procoagulantes de FVIII en plasma, con personas con <1 % (<0,01 UI/ml) de factor VIII definida como grave; un 1-5 % (0,01-0,05 UI/ml) como moderadamente grave; y >5-40 % (0,05-<0,40 UI/ml) como leve, donde normal es 1 UI/ml de factor VIIIC (100 %).

La enseñanza proporciona métodos de tratamiento de un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar una afección relacionada con el factor VIII. Más particularmente, la enseñanza proporciona métodos para tratar o prevenir, controlar la hemorragia en un sujeto. El sujeto puede ser cualquier animal, pero preferiblemente es un ser humano. En un aspecto, el método comprende administrar una cantidad eficaz de coagulación de una composición de CFXTEN al sujeto que lo necesita. En otro aspecto, el método comprende la etapa de administrar al sujeto con una hemorragia una cantidad eficaz de coagulación de una composición farmacéutica que incluye una CFXTEN, en el que la administración provoca una detención o atenuación de la hemorragia. Como se usa en la presente memoria, "cantidad eficaz de coagulación" es una cantidad de una composición de un FVIII que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para lograr la hemostasia u otro resultado terapéutico beneficio o deseado (incluyendo preventivo). En la práctica de la presente enseñanza, se entenderá que una cantidad eficaz de coagulación puede administrarse en una o más administraciones. Las cantidades eficaces de coagulación precisas de la composición farmacéutica a administrar estarán dirigidas por el criterio del facultativo, sin embargo, la dosis unitaria en general dependerá de la gravedad o causa de la hemorragia y la cantidad de FVIII preexistente en el sujeto. En un aspecto particular del método de tratamiento de una hemorragia, se administra una cantidad eficaz de coagulación de una composición farmacéutica que comprende CFXTEN a un sujeto que padece un episodio hemorrágico, en el que la administración provoca la resolución de la hemorragia durante un tiempo al menos dos veces, o al menos tres veces, o al menos cuatro veces más largo en comparación con un FVIII no unido a XTEN y administrado a un sujeto comparable con una hemorragia comparable a una dosis comparable.

En otro aspecto, la administración de una cantidad eficaz de coagulación de una composición de CFXTEN a un sujeto con una afección relacionada con el factor VIII produce una mejora de un 10 % o un 20 %, o un 30 %, o un 40 %, o un 50 %, o un 60 %, o un 70 % o mayor de uno o más parámetros bioquímicos, fisiológicos o clínicos asociados con la afección del factor VIII, en comparación con el FVIII no unido a XTEN, cuando se mide entre 2 y 7 días después de la administración. En otro aspecto, la administración de una cantidad eficaz de coagulación de una composición de CFXTEN a un sujeto que lo necesita, produce una mejora de uno o más parámetros bioquímicos, fisiológicos o clínicos asociados con la afección de FVIII durante un periodo al menos dos veces más largo, o al menos cuatro veces más largo, o al menos cinco veces más largo, o al menos seis veces más largo en comparación con el periodo conseguido por un FVIII no unido a XTEN y administrado a una dosis comparable. Ejemplos no limitantes de parámetros que se mejoran para una duración más larga incluyen concentraciones sanguíneas de FVIII procoagulante, un tiempo de ensayo de protrombina parcial activada (aPTT) reducido, un tiempo de ensayo de coagulación de una fase o dos fases reducido, aparición retardada de un episodio hemorrágico, un tiempo de ensayo cromogénico de FVIII reducido, un tiempo de hemorragia reducido, entre otros parámetros relacionados con FVIII conocidos en la técnica. En los aspectos anteriores del párrafo, la CFXTEN administrada comprende un FVIII con al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con un factor VIII de la tabla 1 y una o más secuencias de XTEN con al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con un XTEN de la tabla 4 insertado en el FVIII en una o más ubicaciones seleccionadas de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9, o como se representa en las FIG. 8-9. En determinados aspectos, al menos un sitio de inserción de XTEN de la CFXTEN se selecciona de los aminoácidos 32, 220, 224, 336, 339, 390, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 y 1910 (numerados con respecto al FVIII humano nativo maduro).

En un aspecto particular del método del tratamiento, una cantidad eficaz de coagulación de la proteína de fusión de CFXTEN administrada a un sujeto que padece hemofilia A es suficiente para aumentar la concentración procoagulante de FVIII en circulación a más de 0,05 UI/ml y para mantener la hemostasia durante al menos aproximadamente 24 h, o al menos aproximadamente 48 h, o al menos aproximadamente 72 h, o al menos aproximadamente 96 h, o al menos aproximadamente 120 h, o al menos aproximadamente 144 h, o al menos aproximadamente 168 h o mayor. En otro aspecto, la administración de una cantidad eficaz de coagulación de una composición farmacéutica que comprende CFXTEN a un sujeto que lo necesita produce una reducción mayor en un tiempo de ensayo de coagulación de una fase de al menos aproximadamente un 5 %, o aproximadamente un 10 %, o aproximadamente un 20 %, o aproximadamente un 30 %, o aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 % o más en una muestra de sangre del sujeto a los 2-7 días después de la administración en comparación con el tiempo de ensayo en un sujeto después de la administración de una cantidad comparable del FVIII correspondiente no unido a XTEN. En otro aspecto, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una CFXTEN o una composición farmacéutica que comprende CFXTEN a un sujeto que lo necesita produce una reducción mayor en el tiempo de protrombina parcial activada de al menos aproximadamente un 5 %, o aproximadamente un 10 %, o aproximadamente un 20 %, o aproximadamente un 30 %, o aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 % o más en una muestra de sangre del sujeto 2-7 días después de la administración en comparación con el tiempo de protrombina parcial activada en un sujeto después de la administración de una cantidad comparable del FVIII correspondiente no unido a XTEN. En otro aspecto, la administración de una CFXTEN o una composición farmacéutica que comprende CFXTEN a un sujeto que lo necesita usando una cantidad terapéuticamente eficaz produce el mantenimiento de los tiempos de protrombina parcial activada en un 30 % del normal en una muestra de sangre del sujeto durante un periodo de tiempo que es al menos dos veces, o al menos aproximadamente tres veces, o al menos aproximadamente cuatro veces más largo en comparación con el de un FVIII no unido a XTEN y administrado a un sujeto usando una dosis comparable.

En un aspecto del método de tratamiento, la proteína de fusión de CFXTEN se fórmula y administra como una composición farmacéutica que comprende la CFXTEN en mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los métodos para preparar formulaciones farmacéuticas son bien conocidos en la técnica. En general pueden encontrarse técnicas y formulaciones en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.ª edición, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 1990 (véase también, Wang y Hanson, Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers, Journal of Parenteral Science and Technology, Technical Report n.º 10, Supl. 42-2S (1988)).

En otro aspecto, la enseñanza proporciona un régimen para el tratamiento de un paciente con hemofilia A, comprendiendo dicho régimen una composición que comprende una proteína de fusión de CFXTEN. En un aspecto del régimen para tratar a un paciente con hemofilia A el régimen comprende además la etapa de determinar la cantidad de composición farmacéutica que comprende la CFXTEN necesaria para conseguir la hemostasia en el paciente. En algunos aspectos del régimen, (i) se administra una cantidad de UI más pequeña de aproximadamente dos veces menos, o aproximadamente tres veces menos, o aproximadamente cuatro veces menos, o aproximadamente cinco veces menos, o aproximadamente seis veces menos, o aproximadamente ocho veces menos, o aproximadamente 10 veces menos de la composición farmacéutica que comprende CFXTEN a un sujeto que lo necesita en comparación con el factor de coagulación correspondiente no unido al XTEN en una pauta posológica por lo demás igual, y la proteína de fusión consigue un área bajo la curva comparable (basada en UI/ml) y/o un efecto terapéutico comparable al FVIII correspondiente no unido al XTEN; (ii) la composición farmacéutica se administra menos frecuentemente (por

ejemplo, cada tres días, aproximadamente cada siete días, aproximadamente cada 10 días, aproximadamente cada 14 días, aproximadamente cada 21 días, o aproximadamente mensual) en comparación con el FVIII correspondiente no unido al XTEN en una cantidad de dosis por lo demás igual, y la proteína de fusión consigue un área bajo la curva comparable y/o un efecto terapéutico comparable al factor de coagulación correspondiente no unido al XTEN; o (iii) se administra una cantidad de UI más pequeña acumulada de al menos aproximadamente un 20 %, o aproximadamente un 30 %, o aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 % menor de la composición farmacéutica en comparación con el FVIII correspondiente o unido al XTEN en una pauta posológica por lo demás igual y la proteína de fusión de CFXTEN consigue un efeto terapéutico comparable al FVIII correspondiente no unido al XTEN. La cantidad de UI más pequeña acumulada se mide durante un periodo de al menos aproximadamente una semana, o aproximadamente 14 días, o aproximadamente 21 días, o aproximadamente un mes. En los aspectos anteriores, el efecto terapéutico puede determinarse por cualquiera de los parámetros medidos descritos en la presente memoria, incluyendo, aunque sin limitación, la concentración sanguínea de FVIII procoagulante, un tiempo de ensayo de protrombina parcial activada (aPTT) reducida, un tiempo de ensayo d coagulación de una fase o dos fases reducido, aparición retardada de un episodio hemorrágico, un tiempo de ensayo cromogénico de FVIII reducido, un tiempo de hemorragia reducido, resolución de un evento hemorrágico o un valor de Bethesda reducido para la CFXTEN con respecto al FVIII nativo, niveles de fibrinógeno u otros ensayos conocidos en la técnica para evaluar las coagulopatías de FVIII. En otro aspecto, la enseñanza proporciona CFXTEN para su uso en un régimen para tratar a un sujeto con hemofilia A, que comprende administrar una composición de CFXTEN en dos o más dosis sucesivas al sujeto a una cantidad eficaz, en la que la administración produce una mejora al menos un 10 % o un 20 %, o un 30 %, o un 40 %, o un 50 %, o un 60 %, o un 70 %, o un 80 %, o un 90 % mayor de al menos uno, dos o tres parámetros asociados con la enfermedad en comparación con un FVIII no unido a XTEN y administrado usando una dosis comparable.

En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a un método de prevención o tratamiento de la hemorragia en un paciente, opcionalmente un paciente con hemofilia A, que tiene uno o más inhibidores preexistentes contra FVIII. Los anticuerpos inhibidores contra FVIII habitualmente se desarrollan en hemofílicos, donde la incidencia global de desarrollar un inhibidor es de un 15-30 %, particularmente en hemofílicos que están muy expuestos a concentrados de FVIII (Algiman *et al.* Natural antibodies to factor VIII (anti-hemophilic factor) in healthy individuals. PNAS USA (1992) 89: 3795-3799). Sin embargo, también se producen anticuerpos inhibidores en pacientes en trastornos autoinmunitarios, neoplasias (tales como trastornos linfoproliferativos, linfomas y tumores sólidos), durante el embarazo y en el estado posparto. También puede producirse inhibición cuando los anticuerpos interfieren con la unión de FVIII a FIX y FX. De forma simultánea o alternativa, los anticuerpos anti-FVIII pueden interferir con la unión del factor de Von Willebrand y/o fosfolípidos a FVIII, afectando a la coagulación y/o semivida de FVIII. La presencia de anticuerpos inhibidores a menudo se detecta en primer lugar con síntomas tales como hematomas fáciles y hemorragia incontrolada, y habitualmente se denomina hemofilia adquirida. Los anticuerpos anti-FVIII pueden determinarse por diferentes métodos incluyendo cuantificación de la actividad anti-FVIII en ensayos de coagulación, ELISA para inhibidores de FVIII y purificación usando cromatografía e inmunoadsorción (Algiman *et al.,* 1992). Por consiguiente, los métodos de la enseñanza se usan en el tratamiento o prevención de cualquier afección asociada con o caracterizada por la presencia de anticuerpos inhibidores contra FVIII. En un aspecto, la enseñanza proporciona un método de tratamiento de un paciente que tiene un inhibidor preexistente contra FVIII, comprendiendo el método la etapa de administrar al paciente una cantidad eficaz de coagulación de una proteína de fusión de CFXTEN que debe administrarse para conseguir hemostasia, en el que la cantidad eficaz de coagulación de la proteína de fusión administrada se reduce en comparación con la cantidad de FVIII no unido a XTEN (o FVIII nativo) que debe administrarse para conseguir hemostasia. En el método, la cantidad reducida de CFXTEN es aproximadamente dos veces, o tres veces, o cuatro veces, o cinco veces menor en UI/kg en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN. En otro aspecto del método, la cantidad de CFXTEN que se administra como dosis para conseguir hemostasia es de al menos 20 a 40 UI/kg menos, o de 30 a 60 UI/kg menos, o de 40 a 80 UI/kg menos, o de 60 a 100 UI/kg menos, o de 100 a 140 UI/kg menos, o de 120 a 180 UI/kg menos, o de 140 a 200 UI/kg menos en comparación con el FVIII correspondiente no unido a XTEN o con el FVIII nativo requerido para conseguir la hemostasia. En otro aspecto, la enseñanza proporciona un método de tratamiento de un episodio hemorrágico en un sujeto con hemofilia A que tiene una concentración de al menos 10, o 20, o 30, o 40, o 50, o 75, o 100, o 150, o 200 o más unidades Bethesda frente a un FVIII no unido a XTEN, en el que la dosis de la proteína de fusión de CFXTEN requerida para detener el episodio hemorrágico es al menos dos veces, o tres veces, o cuatro veces, o cinco veces, o seis veces, o siete veces, u ocho veces, o nueve veces, o 10 veces menor en comparación con la cantidad de FVIII no unido a XTEN (o FVIII nativo) que debe administrarse para conseguir hemostasia en un sujeto comparable. Un experto en la materia entenderá que la cantidad de procoagulante administrado para mantener la hemostasia dependerá de la gravedad de la deficiencia de FVIII y/o la frecuencia o duración de la hemorragia.

Un objeto particular de la presente enseñanza se refiere al uso de CFXTEN con unión reducida por inhibidores de FVIII que se unen a los dominios A2 y/o C2 de factor VIII como fármaco. Dicho fármaco se usa ventajosamente para mantener la hemostasia en un paciente que padece hemofilia, en el que dicho paciente tiene inhibidores de FVIII en circulación dirigidos contra el dominio A2 y/o dominio C2 de factor VIII. En un aspecto, la enseñanza proporciona un método de tratamiento, comprendiendo el método la etapa de administrar al paciente con un inhibidor de unión al dominio A2 una cantidad eficaz de coagulación de una proteína de fusión de CFXTEN, en el que la CFXTEN muestra

al menos un 10 %, o un 20 %, o un 30 %, o un 40 %, o un 50 %, o un 60 %, o un 70 %, o un 80 % o menos unión a un inhibidor que se une al dominio A2 de FVIII, en comparación con el FVIII no unido a XTEN o con FVIII nativo, y en el que la administración produce hemostasia. En otro aspecto, la enseñanza proporciona un método de tratamiento, comprendiendo el método la etapa de administrar al paciente con un inhibidor de unión al dominio C2 una cantidad eficaz de coagulación de una proteína de fusión de CFXTEN, en el que la CFXTEN muestra al menos un 10 %, o un 20 %, o un 30 %, o un 40 %, o un 50 %, o un 60 %, o un 70 %, o un 80 % o menos unión a un inhibidor que se une al dominio C2 de FVIII, en comparación con el FVIII no unido a XTEN o con FVIII nativo, y en el que la administración produce hemostasia. La unión reducida de la presente CFXTEN puede ensayarse directamente por ELISA que detecta inhibidores de FVIII, o puede medirse indirectamente por la demostración de inhibición reducida de la actividad de FVIII de la CFXTEN en comparación con FVIII nativo en presencia de un inhibidor que se mide por un ensayo cromogénico de factor VIII o ensayo de una etapa como se describe en la presente memoria u otros métodos de coagulación adecuados conocidos en la técnica. Como alternativa, la presente CFXTEN puede medirse para la inhibición reducida (o ausencia de la misma) en presencia de inhibidores conocidos mediante el uso de un ensayo de Bethesda modificado. De acuerdo con un aspecto particular de la presente enseñanza, una CFXTEN útil en los métodos tiene reactividad reducida contra uno o más anticuerpos de la tabla 10, así como anticuerpos de origen natural encontrados en pacientes con hemofilia. Con propósitos de ensayo, dichos anticuerpos inhibidores y otros pueden obtenerse de seres humanos (es decir, del suero de pacientes que tienen anticuerpos inhibidores) o pueden obtenerse de ratones, cobayas, caballos, cabras, primates no humanos y otros mamíferos por inmunización con FVIII, o fragmentos del mismo, más particularmente con un fragmento que comprende la totalidad o parte del dominio A2 o C2, ya sea en forma policlonal o monoclonal.

La enseñanza contempla además que la CFXTEN usada de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente memoria puede administrarse junto con otros métodos de tratamiento y composiciones (por ejemplo, otras proteínas de coagulación) útiles para tratar afecciones relacionadas con el factor VIII, o afecciones para las que el factor de coagulación es un tratamiento complementario; por ejemplo, episodios hemorrágicos debidos a lesión o cirugía.

En otro aspecto, la enseñanza proporciona métodos de preparación de un fármaco para una afección relacionada con el factor VIII, que comprende combinar una secuencia de factor VIII seleccionada de la tabla 1 con uno o más XTEN seleccionados de la tabla 4 insertados en uno o más sitios de inserción seleccionados de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 para producir un fármaco que retenga al menos una parte de la actividad del FVIII nativo. La enseñanza proporciona un método de preparación de una composición farmacéutica, que comprende la etapa de combinar el fármaco del aspecto anterior con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto del método de preparación de un fármaco para una afección relacionada con el factor VIII, el factor VIII tiene una secuencia con al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia seleccionada de la tabla 1 y el uno o más XTEN tienen una secuencia con al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia seleccionada de una cualquiera de las tablas 3, 4 y 13-17, o un fragmento de la misma, en el que el uno o más XTEN se insertan en una o más ubicaciones seleccionadas de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9. En un aspecto particular de lo anterior, al menos un sitio de inserción de XTEN se selecciona de los aminoácidos 32, 220, 224, 336, 339, 390, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 y 1910 (numerados con respecto a FVIII humano nativo maduro). En otro aspecto del método, la CFXTEN comprende una secuencia con al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia seleccionada de una cualquiera de la tabla 21.

En otro aspecto, la enseñanza proporciona un método de preparación de las composiciones de CFXTEN para conseguir propiedades farmacocinéticas, farmacológicas o farmacéuticas deseadas. En general, las etapas en el diseño y producción de las composiciones de proteína de fusión de la enseñanza, como se ilustra en las FIG. 11-13, incluyen: (1) la selección de un FVIII (por ejemplo, proteínas nativas, secuencias de la tabla 1, análogos o derivados con actividad) para tratar la afección particular; (2) selección de uno o más XTEN (por ejemplo, secuencias con al menos un 80 % de identidad con secuencias expuestas en la tabla 4) que conferirán las características farmacocinéticas y fisicoquímicas deseadas a la CFXTEN resultante (por ejemplo, la administración de la composición de CFXTEN a un sujeto provoca que la proteína de fusión se mantenga por encima de 0,05-0,4 UI/ml durante un periodo mayor en comparación con FVIII no unido a XTEN); (3) establecimiento de una configuración del extremo N a C deseada de la CFXTEN para conseguir la eficacia o parámetros PK deseados (por ejemplo, seleccionando uno o más sitios de inserción de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9); (4) establecimiento del diseño del vector de expresión que codifica la CFXTEN configurada; (5) transformación de un hospedador adecuado con el vector de expresión; y (6) expresión y recuperación de la proteína de fusión de CFXTEN aislada resultante. En un aspecto del método de preparación de CFXTEN, los XTEN para su inserción se evalúan por la aplicación de la ecuación IV para maximizar la relación de radios de XTEN para la construcción de proteína de fusión, produciendo los XTEN valores mayores de 2,0, o 2,1, o 2,2, o 2,3, o 2,4, o 2,5, o 2,6, o 2,7, o 2,8, o 2,9, o 3,0 que son preferidos. Para aquellas CFXTEN para las que se desea un aumento en la semivida o un periodo de tiempo usado aumentado por encima de la concentración eficaz de coagulación mínima, los XTEN elegidos para su incorporación en general tienen al menos

aproximadamente 144, o aproximadamente 288, o aproximadamente 432, o aproximadamente 576, o aproximadamente 864, o aproximadamente 875, o aproximadamente 912, o aproximadamente 923 residuos aminoacídicos donde tiene que insertarse un solo XTEN en la CFXTEN. En otro aspecto, la CFXTEN comprende un primer XTEN de las longitudes anteriores, y al menos un segundo XTEN de aproximadamente 36, o aproximadamente 42, o aproximadamente 72, o aproximadamente 144, o aproximadamente 288, o aproximadamente 576, o aproximadamente 864, o aproximadamente 875, o aproximadamente 912, o aproximadamente 923, o aproximadamente 1000 o más residuos aminoacídicos. La ubicación del XTEN dentro de la proteína de fusión puede incluir una, dos, tres, cuatro, cinco o más ubicaciones seleccionada de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o FIG. 8-9. En un aspecto, el método de diseño incluye una inserción de XTEN en el FVIII de al menos un sitio seleccionado de los aminoácidos 32, 220, 224, 336, 339, 390, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 y 1910 (numerados con respecto a FVIII humano nativo maduro).

En otro aspecto, la enseñanza proporciona métodos de preparación de composiciones de CFXTEN para mejorar la facilidad de fabricación, producir estabilidad aumentada, solubilidad en agua aumentada y/o facilidad de formulación, en comparación con el FVIII nativo. En un aspecto, la enseñanza incluye un método de aumento de la solubilidad en agua de un FVIII que comprende la etapa de unir el FVIII con la menos aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 95 % de identidad con una secuencia de la tabla 1 a uno o más XTEN en una, dos, tres, cuatro, cinco o más ubicaciones seleccionadas de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o FIG. 8-9, en el que el XTEN es una secuencia con al menos aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de una cualquiera de las tablas 3, 4 y 13-17 de modo que pueda conseguirse una concentración mayor en forma soluble de la CFXTEN resultante, en condiciones fisiológicas, en comparación con el FVIII en un estado no fusionado. En un aspecto particular, la CFXTEN comprende un FVIII unido a dos, tres, cuatro, o cinco XTEN que tienen al menos aproximadamente 24, o aproximadamente 36, o aproximadamente 48, o aproximadamente 60, o aproximadamente 72, o aproximadamente 84, o aproximadamente 96, o aproximadamente 144, o aproximadamente 288 residuos aminoacídicos insertados en sitios seleccionados de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o FIG. 8-9, en que la solubilidad de la proteína de fusión en condiciones fisiológicas es al menos tres veces mayor al FVIII correspondiente no unido a XTEN, o como alternativa, al menos cuatro veces, o cinco veces, o seis veces, o siete veces, u ocho veces, o nueve veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces o mayor que FVIII no unido a XTEN. Los factores que contribuyen a la propiedad de XTEN de conferir solubilidad en agua aumentada de los CF cuando se incorpora en una proteína de fusión incluyen la alta solubilidad del compañero de fusión de XTEN y el bajo grado de autoagregación entre las moléculas de XTEN en disolución, así como la expansión de la hidrofilia de los bucles externos de FVIII en que se inserta el XTEN. En algunos aspectos, el método produce una proteína de fusión de CFXTEN, en la que solubilidad en agua es al menos aproximadamente un 20 %, o al menos aproximadamente un 30 % mayor, o al menos aproximadamente un 50 % mayor, o al menos aproximadamente un 75 % mayor, o al menos aproximadamente un 90 % mayor, o al menos aproximadamente un 100 % mayor, o al menos aproximadamente un 150 % mayor, o al menos aproximadamente un 200 % mayor, o al menos aproximadamente un 400 % mayor, o al menos aproximadamente un 600 % mayor, o al menos aproximadamente un 800 % mayor, o al menos aproximadamente un 1000 % mayor, o al menos aproximadamente un 2000 % mayor en condiciones fisiológicas, en comparación con el FVIII no fusionado. En un aspecto, el XTEN de la proteína de fusión de CFXTEN es una secuencia con al menos aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 95 % de identidad se secuencia en comparación con una secuencia de una cualquiera de las tablas 3, 4 y 13-17. En otro aspecto, la enseñanza incluye un método de aumento de la vida útil de un FVIII, que comprende la etapa de unir el FVIII con uno o más XTEN en uno o más sitios seleccionados de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9, en el que la vida útil de la CFXTEN resultante está prolongada en comparación con el FVIII en un estado no fusionado. Como se usa en la presente memoria, la vida útil se refiere al periodo de tiempo sobre el que la actividad procoagulante de un FVIII o CFXTEN que está en disolución, liofilizada o en alguna otra formulación de almacenamiento permanece estable sin pérdida excesiva de actividad o que permanece dentro de las especificaciones de comercialización establecidas para la composición farmacéutica. Un FVIII que se degrada o agrega en general tiene actividad funcional reducida o biodisponibilidad reducida en comparación con uno que permanece en disolución. Los factores que contribuyen a la capacidad del método de prolongar la vida útil de FVIII cuando se incorpora en una proteína de fusión incluyen solubilidad en agua aumentada, autoagregación reducida en disolución y estabilidad térmica aumentada del compañero de fusión de XTEN. En particular, la baja tendencia de XTEN a agregarse facilita métodos de formulación de preparaciones farmacéuticas que contienen mayores concentraciones en fármaco de CF, y la estabilidad térmica del XTEN contribuye a la propiedad de las proteínas de fusión de CFXTEN de permanecer solubles y funcionalmente activas durante periodos prolongados. El método produce proteínas de fusión de CFXTEN con vida útil prolongada o ampliada que muestran mayor actividad con respecto a un FVIII convencional que se ha sometido a las mismas condiciones de almacenamiento y manipulación. Lo convencional puede ser el FVIII de longitud completa no fusionado o una composición farmacéutica de FVIII disponible en el mercado. En un aspecto, el método incluye la etapa de formular la CFXTEN aislada con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables que potencian la capacidad del XTEN de retener su conformación no estructurada y para que la CFXTEN permanezca soluble en la formulación durante un tiempo que es mayor al del FVIII no fusionado correspondiente. En un aspecto, el método comprende unir un FVIII seleccionado de la tabla 1 a uno o más XTEN seleccionados de una cualquiera de las tablas 3, 4 y 13-17 insertados en uno o más sitios seleccionados de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 y mezclarlo con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable

para crear una composición farmacéutica que retenga más de aproximadamente un 100 % de la actividad procoagulante, o más de aproximadamente un 105 %, un 110 %, un 120 %, un 130 %, un 150 % o un 200 % de la actividad procoagulante de un FVIII convencional sometido a las mismas condiciones de almacenamiento y manipulación cuando se comparan en un punto temporal de al menos 90 días, o al menos 6 meses, o al menos 12 meses. La vida útil también puede evaluarse en términos de actividad funcional que permanece después del almacenamiento, normalizada a la actividad funcional cuando empieza el almacenamiento. En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas de CFXTEN de la enseñanza retienen aproximadamente un 50 % más de actividad procoagulante, o aproximadamente un 60 %, un 70 %, un 80 %, o un 90 % más de la actividad procoagulante de un FVIII convencional cuando se somete a las mismas condiciones durante el mismo periodo de hasta 2 semanas, o 4 semanas, o 6 semanas o más en diversas condiciones de temperatura. En un aspecto, la composición farmacéutica de CFXTEN retiene al menos aproximadamente un 50%, o aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 80 % y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente un 90% o más de su actividad original en disolución cuando se caliente a 80 °C durante 10 min. En otro aspecto, la composición farmacéutica de CFXTEN retiene al menos aproximadamente un 50 %, preferiblemente al menos aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 80 %, o como alternativa al menos aproximadamente un 90 % o más de su actividad original en disolución cuando se caliente o mantiene a 37 °C durante aproximadamente 7 días. En otro aspecto, la composición farmacéutica de CFXTEN retiene al menos aproximadamente un 80 % o más de su actividad funcional después de exposición a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C durante un periodo de tiempo de aproximadamente una hora a aproximadamente 18 horas. En los aspectos anteriores descritos anteriormente en la presente memoria de este párrafo, la actividad retenida de las composiciones farmacéuticas de CFXTEN es al menos aproximadamente dos veces, o al menos aproximadamente tres veces, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente seis veces mayor en un punto temporal dado que la de una composición farmacéutica correspondiente que comprende FVIII no unido al XTEN.

VII). Las secuencias de ácido nucleico de la enseñanza

La presente enseñanza proporciona ácidos polinucleicos aislados que codifican proteínas de fusión quiméricas de CFXTEN y secuencias complementarias a las moléculas de ácido polinucleico que codifican proteína de fusión quiméricas de CFXTEN, incluyendo variantes homólogas de las mismas. En otro aspecto, la enseñanza abarca métodos para producir ácidos polinucleicos que codifican proteínas de fusión quiméricas de CFXTEN y secuencias complementarias a moléculas de ácido polinucleico que codifican proteína de fusión quimérica de CFXTEN, incluyendo variantes homólogas de las mismas. En general, y como se ilustra en las FIG. 11-13, los métodos de producción de una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de fusión de CFXTEN y que expresa el producto génico resultante incluyen ensamblar nucleótidos que codifican FVIII y XTEN, ligar los componentes en el mismo marco, incorporar el gen codificante en un vector de expresión apropiado para una célula hospedadora, transformar la célula hospedadora apropiada con el vector de expresión y cultivar la célula hospedadora en condiciones que causen o permitan que la proteína de fusión se exprese en la célula hospedadora transformada, produciendo de ese modo el polipéptido de CFXTEN biológicamente activo, que se recupera como una proteína de fusión aislada por métodos convencionales de purificación de proteínas conocidos en la técnica. Se usan técnicas recombinantes convencionales en biología molecular para preparar los polinucleótidos y vectores de expresión de la presente enseñanza.

De acuerdo con la enseñanza, las secuencias de ácido nucleico que codifican CFXTEN (o su complemento) se usan para generar moléculas de ADN recombinantes que dirigen la expresión de proteínas de fusión de CFXTEN en células hospedadoras apropiadas. Para los fines de la enseñanza, el ácido nucleico que codifica un péptido señal correspondiente al de FVIII humano nativo (que codifica MQIELSTCFFLCLLRFCFS (SEQ ID NO: 1611)) puede añadirse a cualquiera de las construcciones codificantes descritas en la presente memoria para ayudar en la expresión y secreción de la proteína de fusión de CFXTEN. En un aspecto, el ácido nucleico añadido es ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGT (SEQ ID NO: 1613), o el complemento del mismo.

Varias estrategias de clonación son adecuadas para realizar la presente enseñanza, usándose muchas de ellas para generar una construcción que comprende un gen que codifica una proteína de fusión de la composición de CFXTEN de la presente enseñanza, o su complemento. En algunos aspectos, la estrategia de clonación se usa para crear un gen que codifica una CFXTEN monomérica que comprende al menos un primer FVIII y al menos un primer polipéptido de XTEN, o su complemento. En un aspecto de lo anterior, el gen comprende una secuencia que codifica un FVIII o variante de secuencia. En otros aspectos, la estrategia de clonación se usa para crear un gen que codifica una CFXTEN monomérica que comprende nucleótidos que codifican al menos una primera molécula de FVIII o su complemento y un primer y al menos un segundo XTEN o su complemento que se usa para transformar una célula hospedadora para la expresión de la proteína de fusión de la composición de CFXTEN. En los aspectos anteriores descritos anteriormente en la presente memoria en este párrafo, los genes pueden comprender además nucleótidos que codifican secuencias espaciadoras que también codifican una o más secuencias de escisión.

En el diseño de secuencias de XTEN deseadas, se descubrió que la naturaleza no repetitiva del XTEN de las composiciones de la enseñanza se consigue a pesar de usar una estrategia molecular de "componentes básicos" en

la creación de las secuencias codificantes de XTEN. Esto se consiguió mediante el uso de una colección de polinucleótidos que codifican motivos de secuencia peptídicos, descritos anteriormente, que entonces se ligan y/o multimerizan para crear los genes que codifican las secuencias de XTEN (véanse las FIG. 11 y 12 y los ejemplos). Por tanto, aunque el uno o más XTEN de la proteína de fusión expresada pueden consistir en múltiples unidades de tan pocos como cuatro motivos de secuencia diferentes, como los propios motivos consisten en secuencias de aminoácidos no repetitivas, la secuencia de XTEN global se vuelve no repetitiva. Por consiguiente, en un aspecto, los polinucleótidos que codifican XTEN comprenden múltiples polinucleótidos que codifican secuencias no repetitivas, o motivos, unidos de forma funcional en el mismo marco y en que las secuencias de aminoácidos de XTEN expresadas resultantes no son repetitivas.

En una estrategia, en primer lugar, se prepara una construcción que contiene la secuencia de ADN correspondiente a la proteína de fusión de CFXTEN. El ADN que codifica el FVIII de las composiciones se obtiene de forma sintética, a partir de una fuente comercial, o de una colección de ADNc preparada usando métodos convencionales a partir de tejido o células aisladas que se cree que poseen ARNm de FVIII y que lo expresan a un nivel detectable. Si fuera necesario, la secuencia codificante puede obtenerse usando procedimientos de prolongación de cebador convencionales como se describe en Sambrook, *et al., supra,* para detectar precursores e intermedios de procesamiento de ARNm que pueden no haberse retrotranscrito en ADNc. Entonces, se puede usar metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el ADN o secuencia codificante de ARN diana para obtener suficiente material para la preparación de las construcciones de CFXTEN que contienen el gen de FVIII. Entonces pueden realizarse ensayos para confirmar que los genes de longitud completa de hibridación son el uno o más genes de FVIII deseados. Mediante estos métodos convencionales, el ADN puede obtenerse convenientemente de una colección de ADNc preparada a partir de dichas fuentes. El uno o más genes codificantes de FVIII también pueden crearse por procedimientos sintéticos convencionales conocidos en la técnica (por ejemplo, síntesis automatizada de ácidos nucleicos usando, por ejemplo, uno de los métodos descritos en Engels *et al.* (Agnew. *Chem*. Int. Ed. Engl., 28:716-734 1989)), usando secuencias de ADN obtenidas de bases de datos disponible al público, patentes, o referencias de la bibliografía. Dichos procedimientos son bien conocidos en la técnica y están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes. Por ejemplo, pueden obtenerse secuencias de los números de registro del Chemical Abstracts Services (CAS) (publicados por la American Chemical Society) y/o los identificadores de proteínas de modelo de los números de acceso a GenBank (por ejemplo, ID de Locus, NP_XXXXX, y XP_XXXXX) disponibles en la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponible en internet en ncbi.nlm.nih.gov que corresponde a las entradas en el Registro CAS o en la base de datos GenBank que contienen una secuencia de aminoácidos de la proteína de interés o de un fragmento o variante de la proteína. En un aspecto, el gen que codifica FVIII codifica una secuencia proteínica de la tabla 1, o un fragmento o variante de la misma.

Un gen o polinucleótido que codifica la parte de FVIII de la presente proteína de CFXTEN, en el caso de una proteína de fusión expresada que comprende un solo FVIII, se clona entonces en una construcción, que es un plásmido u otro vector bajo el control de secuencias apropiadas de transcripción y traducción para una expresión de proteínas de alto nivel en un sistema biológico. En una etapa posterior, un segundo gen o polinucleótido que codifica el XTEN se fusiona genéticamente con los nucleótidos que codifican el extremo N y/o C del gen de FVIII clonándolo en la construcción adyacente y en el mismo marco con el gen o genes que codifican el FVIII. Esta segunda etapa se produce a través de una etapa de ligamiento o multimerización. En los aspectos anteriores descritos anteriormente en la presente memoria en este párrafo, debe entenderse que las construcciones génicas que se crean pueden ser, como alternativa, el complemento de los genes respectivos que codifican las proteínas de fusión respectivas.

El gen que codifica el XTEN puede prepararse en una o más etapas, de forma completamente sintética o por síntesis combinada con procesos enzimáticos, tales como clonación mediada por enzimas de restricción, PCR y prolongación con solapamiento, incluyendo métodos más completamente descritos en los ejemplos. Los métodos divulgados en la presente memoria pueden usarse, por ejemplo, para ligar secuencias cortas de polinucleótidos que codifican XTEN en gene de XTEN más largos de una longitud y secuencia deseadas. En un aspecto, el método liga dos o más oligonucleótidos de codones optimizados que codifican secuencias de motivo o segmento de XTEN de aproximadamente 9 a 14 aminoácidos, o de aproximadamente 12 a 20 aminoácidos, o de aproximadamente 18 a 42 aminoácidos, o de aproximadamente 42 a aproximadamente 144 aminoácidos, o de aproximadamente 144 a aproximadamente 288 aminoácidos, o de 288 a aproximadamente 864 aminoácidos o más largas, o cualquier combinación de los intervalos anteriores de longitudes de motivo o segmento.

Como alternativa, el método divulgado se usa para multimerizar secuencias codificantes de XTEN en secuencias más largas de una longitud deseada; por ejemplo, un gen que codifica 36 aminoácidos de XTEN puede dimerizarse en un gen que codifica 72 aminoácidos, después 144, después 288, etc. Incluso con multimerización, los polipéptidos de XTEN pueden construirse de modo que el gen que codifica XTEN tenga baja o casi ninguna repetitividad a través del diseño de los codones seleccionados para los motivos de la unidad más corta que se está usando, que puede reducir la recombinación y aumenta la estabilidad del gen codificante en el hospedador transformado.

Los genes que codifican XTEN con secuencias no repetitivas se ensamblan a partir de oligonucleótidos usando técnicas convencionales de síntesis génica. El diseño génico puede realizarse usando algoritmos que optimizan el uso de codones y la composición de aminoácidos. En un método de la enseñanza, se crea una colección de construcciones

polinucleotídicas que codifican XTEN relativamente cortas y después se ensamblan, como se describe anteriormente. Los genes resultantes entonces se ensamblan con genes que codifican FVIII o regiones de FVIII, como se ilustra en las FIG. 11 y 12, y los genes resultantes se usan para transformar una célula hospedadora y producir y recuperar la CFXTEN para la evaluación de sus propiedades, como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto, la enseñanza proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica los aspectos de proteína de fusión de CFXTEN descritas en la presente memoria. En un aspecto, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de (a) una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, a aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de longitud comparable seleccionada de la tabla 21, cuando se alinean de forma óptima, o (b) el complemento del polinucleótido de (a). En otro aspecto, el ácido nucleico aislado comprende la secuencia ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGT (SEQ ID NO: 1613) unida al extremo 5' del ácido nucleico de (a) o el complemento de la secuencia unido al extremo 3' de (b).

Colecciones de polinucleótidos

En otro aspecto, la enseñanza proporciona colecciones de polinucleótidos que codifican secuencias de XTEN que se usan para ensamblar genes que codifican XTEN de una longitud y secuencia deseadas.

En determinados aspectos, las construcciones de la colección que codifica XTEN comprenden polinucleótidos que codifican segmentos polipeptídicos de una longitud fija. Como etapa inicial, puede ensamblarse una colección de oligonucleótidos que codifican motivos de 9-14 residuos aminoacídicos. En un aspecto preferido, se ensamblan colecciones de oligonucleótidos que codifican motivos de 12 aminoácidos.

Los segmentos de secuencia que codifican XTEN pueden dimerizarse o multimerizarse en secuencias codificantes más largas, como se representa esquemáticamente a FIG. 13. La dimerización o multimerización puede realizarse por ligamiento, prolongación de solapamiento, ensamblaje por PCR o técnicas de clonación similares conocidas en la técnica. Este proceso puede repetirse múltiples veces hasta que las secuencias codificantes de XTEN resultantes hayan alcanzado la organización de secuencia y longitud deseada, proporcionando los genes codificantes de XTEN. Como se apreciará, una colección de polinucleótidos que codifica, por ejemplo, motivos de 12 aminoácidos puede dimerizarse y/o ligarse en una colección de polinucleótidos que codifican 36 aminoácidos. Las colecciones que codifican motivos de diferentes longitudes; por ejemplo, motivos de 9-14 aminoácidos que dan lugar a colecciones que codifican de 27 a 42 aminoácidos se contemplan por la enseñanza. A su vez, la colección de polinucleótidos que codifican de 27 a 42 aminoácidos, y preferiblemente 36 aminoácidos (como se describe en los ejemplos) puede dimerizarse en serie en una colección que contiene longitudes sucesivamente más largas de polinucleótidos que codifican secuencias de XTEN de una longitud deseada para la incorporación en el gen que codifica la proteína de fusión de CFXTEN, como se divulga en la presente memoria.

Una manera más eficaz de optimizar la secuencia de ADN que codifica XTEN se basa en colecciones combinatorias. El gen que codifica XTEN puede diseñarse y sintetizarse en segmentos de modo que se obtengan múltiples versiones de codones para cada segmento. Estos segmentos pueden ensamblarse aleatoriamente en una colección de genes de modo que cada miembro de la colección codifique las mismas secuencias de aminoácidos, pero los números de las colecciones comprenden un número más grande de versiones de codones. Dichas colecciones pueden cribarse para genes que producen expresión de alto nivel y/o una baja abundancia de productos de truncamiento. El proceso de ensamblaje génico combinatorio se ilustra en la FIG. 18. Los genes en la FIG. 18 se ensamblan a partir de fragmentos de 6 bases y cada fragmento está disponible en 4 versiones de codones diferentes. Esto permite una diversidad teórica de 4096.

En algunos aspectos, se ensamblan colecciones de polinucleótidos que codifican aminoácidos que están limitados a familias de XTEN de secuencia específica; por ejemplo, las secuencias AD, AE, AF, AG, AM, o AQ de la tabla 4. En otros aspectos, las colecciones comprenden secuencias que codifican dos o más de las secuencias de la familia de motivo de la tabla 3. Los nombres y secuencias de secuencias polinucleotídicas no limitantes representativas de las colecciones que codifican oligómeros de 36 monómeros se presentan en las tablas 13-17, y los métodos usados para crearlos se describen más completamente en los ejemplos respectivos. En otros aspectos, se construyen colecciones que codifican XTEN a partir de segmentos de codones polinucleotídicos unidos en una secuencia aleatorizada que codifica aminoácidos en los que al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 91 %,o al menos aproximadamente un 92 %,o al menos aproximadamente un 93 %,o al menos aproximadamente un 94 %,o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de los codones se seleccionan del grupo que consiste en codones de los aminoácidos glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P). Las colecciones pueden usarse, a su vez, para dimerización en serie o ligamiento para conseguir colecciones de secuencias polinucleotídicas que codifican secuencias de XTEN, por ejemplo, de 42, 48, 72, 144, 288, 576, 864, 875,

912, 923, 1318 aminoácidos, o hasta una longitud total de aproximadamente 3000 aminoácidos, así como longitudes intermedias, en que el XTEN codificado puede tener una o más de las propiedades divulgadas en la presente memoria, cuando se expresa como un componente de la proteína de fusión de CFXTEN. En algunos casos, las secuencias de la colección de polinucleótidos también pueden incluir bases adicionales usadas como "islas de secuenciación" descritas más completamente a continuación.

La FIG. 14 es un diagrama de flujo esquemático de etapas no limitantes representativas en el ensamblaje de una construcción polinucleotídica de XTEN y una construcción polinucleotídica de CFXTEN en los aspectos de la enseñanza. Los oligonucleótidos individuales **501** se hibridan en motivos de secuencia **502** tal como un motivo de 12 aminoácidos ("oligómero de 12 monómeros"), que se liga a motivos de secuencia adicionales de una colección para crear una combinación que abarca la longitud deseada del XTEN **504,** así como se liga a una concentración más pequeña de un oligo que contiene los sitios de restricción BbsI y KpnI **503.** La combinación resultante de productos de ligamiento se purifica en gel y la banda con la longitud deseada de XTEN se corta, produciendo un gen de XTEN aislado con una secuencia de tope **505.** El gen de XTEN se clona en un vector de relleno. En este caso, el vector codifica una secuencia de CBD opcional **506** y un gen de GFP **508.** La digestión entonces se realiza con BbsI/HindIII para eliminar **507** y **508** y colocar el codón de parada. El producto resultante entonces se clona en un vector digerido con BsaI/HindIII que contiene un gen que codifica el FVIII, produciendo el gen **500** que codifica una proteína de fusión de FVIII-XTEN.

Se puede clonar la colección de genes que codifican XTEN en uno o más vectores de expresión conocidos en la técnica. Para facilitar la identificación de miembros de la colección que se expresan bien, se puede construir la colección como una fusión con una proteína indicadora. Ejemplos no limitantes de genes indicadores adecuados son proteína fluorescente verde, luciferasa, fosfatasa alcalina y beta-galactosidasa. Mediante cribado, se pueden identificar secuencias de XTEN cortas que pueden expresarse en alta concentración en el organismo hospedador de elección. Posteriormente, se puede generar una colección de dímeros de XTEN aleatorios y repetir el cribado para un nivel alto de expresión. Posteriormente, se pueden cribar las construcciones resultantes para varias propiedades tales como el nivel de expresión, la estabilidad en proteasa o la unión a antisuero.

Un aspecto de la enseñanza es proporcionar secuencias polinucleotídicas que codifican los componentes de la proteína de fusión, en las que la creación de la secuencia ha experimentado optimización de codones. Es de particular interés la optimización de codones con el objetivo de mejorar la expresión de las composiciones polipeptídicas y de mejorar la estabilidad genética del gen codificante en los hospedadores de producción. Por ejemplo, la optimización de codones es de particular importancia para secuencias de XTEN que son ricas en glicina o que tienen secuencias de aminoácidos muy repetitivas. La optimización de codones se realiza usando programas informáticos (Gustafsson, C., *et al.* (2004) *Trends Biotechnol,* **22**: 346-53), que minimizan, algunos de ellos, la pausa ribosómica (Coda Genomics Inc.). En un aspecto, se puede realizar optimización de codones construyendo colecciones de codones donde todos los miembros de la colección codifican la misma secuencia de aminoácidos, pero donde se varía el uso de codones. Dichas colecciones pueden cribarse para miembros de alta expresión y genéticamente estables que son particularmente adecuados para la producción a gran escala de productos que contienen XTEN. Cuando se diseñan secuencias de XTEN, se pueden considerar varias propiedades. Se puede minimizar la repetitividad en las secuencias de ADN codificantes. Además, se puede evitar o minimizar el uso de codones que se usen infrecuentemente por el hospedador de producción (por ejemplos, los codones de arginina AGG y AGA y un codón de leucina en *E. coli*). En el caso de *E. coli,* se usan infrecuentemente dos codones de glicina GGA y GGG, en proteínas muy expresadas. Por tanto, la optimización de codones del gen que codifica secuencias de XTEN puede ser muy deseable. Las secuencias de ADN que tienen un alto nivel de glicina tienden a tener un alto contenido de GC que puede dar lugar a inestabilidad o bajos niveles de expresión. Por tanto, cuando es posible, se prefiere elegir codones de modo que el contenido de GC de la secuencia codificante de XTEN sea adecuado para el organismo de producción que se usará para fabricar el XTEN.

En un aspecto, se construyen colecciones de polinucleótidos que usan los métodos divulgados, en los que todos los miembros de la colección codifican la misma secuencia de aminoácidos, pero donde el uso de codones para los aminoácidos repetitivos en la secuencia se varía u optimiza para la célula hospedadora pretendida. Dichas colecciones pueden cribarse para miembros de alta expresión y genéticamente estables que son particularmente adecuados para la producción a gran escala de productos que contienen XTEN. En un aspecto, las colecciones se optimizan para la expresión en una célula hospedadora eucariótica.

Opcionalmente, se pueden secuenciar los clones de la colección para eliminar aislados que contengan secuencias indeseables. La colección inicial de secuencias de XTEN cortas permite alguna variación en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, pueden aleatorizarse algunos codones de modo que puedan producirse varios aminoácidos hidrófilos en una posición particular. Durante el proceso de multimerización iterativa se pueden cribar los miembros de la colección resultante para otras características como solubilidad o resistencia a proteasa además de un cribado para expresión de alto nivel.

Una vez que se selecciona el gen que codifica el XTEN de longitud y propiedades deseadas, se fusiona genéticamente en la ubicación deseada a los nucleótidos que codifican el uno o más genes de FVIII clonándolo en la construcción

adyacente y en el mismo marco con el gen que codifica FVIII, o como alternativa entre nucleótidos que codifican dominios adyacentes del FVIII, o como alternativa dentro de una secuencia que codifica un dominio de FVIII dado, o como alternativa en el mismo marco con nucleótidos que codifican una secuencia espaciadora/de escisión unida a un XTEN terminal. La enseñanza proporciona diversas permutaciones de lo anterior, dependiendo de la CFXTEN a codificar. Por ejemplo, un gen que codifica una proteína de fusión de CFXTEN que comprende un FVIII y dos XTEN, tal como se plasma por la fórmula VI, como se representa anteriormente, el gen tendría polinucleótidos que codifican FVIII, que codifican dos XTEN, que pueden ser idénticos o diferentes en la composición y la longitud de la secuencia. En un aspecto no limitante, de lo anterior, los polinucleótidos de FVIII codificarían el factor VIII y los polinucleótidos que codifican el XTEN del extremo C codificarían un XTEN de 288 aminoácidos y los polinucleótidos que codifican un XTEN interno adyacente al extremo C del dominio A2 codificarían un XTEN de 144 aminoácidos. La etapa de clonación de los genes de FVIII en la construcción de XTEN puede producirse a través de una etapa de ligamiento o multimerización, como se muestra en la FIG. 14. Las construcciones que codifican proteínas de fusión de CFXTEN pueden diseñarse en diferentes configuraciones de los componentes XTEN, CF y secuencias espaciadoras, tales como las configuraciones de las fórmulas I-VIII. En un aspecto, la construcción comprende secuencias polinucleotídicas complementarias a, o aquellas que codifican un polipéptido monomérico de componentes en el siguiente orden (5' a 3') FVIII, un XTEN interno en el dominio B y un XTEN C terminal. En otro aspecto, la construcción comprende secuencias polinucleotídicas complementarias a, o aquellas que codifican un polipéptido monomérico de componentes en el siguiente orden (5' a 3') FVIII, secuencia espaciadora unida al extremo C y XTEN. Los polinucleótidos espaciadores opcionalmente pueden comprender secuencias que codifican secuencias de escisión. Como será evidente para los expertos en la materia, son posibles múltiples permutaciones de dominio de FVIII y XTEN insertados.

La homología, similitud de secuencia o identidad de secuencia de secuencias de nucleótidos o aminoácidos también puede determinarse convencionalmente usando programas informáticos o de ordenador conocidos tales como los programas de comparación por parejas BestFit o Gap (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BestFit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Advances in Applied Mathematics. 1981. 2: 482-489), para encontrar el mejor segmento de identidad o similitud entre dos secuencias. Gap realiza alineaciones globales: todas de una secuencia con todas de otra secuencia similar usando el método de Needleman y Wunsch, (Journal of Molecular Biology. 1970. 48:443-453). Cuando se usa un programa de alineación de secuencias tal como BestFit, para determinar el grado de homología de secuencia, similitud o identidad, puede usarse la configuración por defecto, o puede seleccionarse una matriz de puntuación apropiada para optimizar las puntuaciones de identidad, similitud u homología.

Las secuencias de ácido nucleico que son "complementarias" son aquellas que pueden formar pares de bases de acuerdo con las normas de complementariedad convencionales de Watson y Crick. Como se usa en la presente memoria, la expresión "secuencias complementarias" significa secuencias de ácido nucleico que son sustancialmente complementarias, que pueden evaluarse por la misma comparación de nucleótidos expuesta anteriormente, o que se definen que pueden hibridar con los polinucleótidos que codifican las secuencias de CFXTEN en condiciones rigurosas, tales como las descritas en la presente memoria.

Los polinucleótidos resultantes que codifican las proteínas de fusión quiméricas de CFXTEN entonces pueden clonarse individualmente en un vector de expresión. La secuencia de ácido nucleico se inserta en el vector mediante una diversidad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en uno o más sitios de endonucleasa de restricción apropiados usando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes del vector en general incluyen, aunque sin limitación, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligamiento convencionales que son conocidas por los expertos en la materia. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica y están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes.

Diversos vectores están disponibles al público. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o fago que puede someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector a menudo dependerá de la célula hospedadora en que tiene que introducirse. Por tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de la célula hospedadora y se replica junto con el uno o más cromosomas en que se ha integrado. Plásmidos representativos se ilustran en la FIG. 17, con regiones codificantes para diferentes configuraciones de los componentes FVIII y XTEN retratadas.

La enseñanza proporciona el uso de vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicación y de control que son compatibles con y se reconocen por la célula hospedadora, y están unidas de forma funcional al gen de CFXTEN para una expresión controlada de las proteínas de fusión de CFXTEN. El vector normalmente porta un sitio de replicación, así como secuencias que codifican proteínas que pueden proporcionar selección fenotípica en las células transformadas. Dichas secuencias de vector son bien conocidas para una diversidad de bacterias, levaduras y virus. Los vectores de expresión útiles que pueden usarse incluyen, por ejemplo, segmentos de secuencias de ADN

cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. "Vector de expresión" se refiere a una construcción de ADN que contiene una secuencia de ADN que está unida de forma funcional a una secuencia de control adecuada que puede lograr la expresión del ADN que codifica la proteína de fusión en un hospedador adecuado. Los requisitos son que los vectores sean replicables y viables en la célula hospedadora de elección. Pueden usarse vectores de bajo o alto número de copias según se desee.

Otros vectores adecuados incluyen, aunque sin limitación, derivados de SV40 y pcDNA y plásmidos bacterianos conocidos tales como col EI, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX como se describe por Smith, *et al*., Gene 57:31-40 (1988), pMB9 y derivados del mismo, plásmidos tales como RP4, ADN fágicos tales como los numerosos derivados del fago I tales como NM98 9, así como otro ADN fágico tal como M13 y el ADN fágico monocatenario filamentoso; plásmidos de levadura tales como el plásmido de 2 micrómetros o derivados del plásmido 2m, así como vectores lanzadera de levadura centoméricos e integrantes; vectores útiles en células eucarióticas tales como vectores útiles en células de insecto o de mamífero; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN fágicos, tales como plásmidos que se han modificado para emplear ADN fágico o las secuencias de control de la expresión; y similares. Los sistemas de expresión de levadura que también pueden usarse en la presente enseñanza incluyen, aunque sin limitación, el vector pYES2 sin fusión (Invitrogen), pYESHisA, B, C de fusión (Invitrogen), vectores pRS y similares.

Las secuencias del control de vector incluyen un promotor para lograr la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión al ribosoma del ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula hospedadora de elección y pueda obtenerse de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula hospedadora.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica la variante polipeptídica de FVIII en células de mamífero son el promotor de SV40 (Subramani *et al., Mol. Cell.* Biol. 1 (1981), 854-864), el promotor de MT-1 (gen de la metalotioneína) (Palmiter *et al., Science* 222 (1983), 809-814), el promotor de CMV (Boshart *et al., Cell* 41:521-530, 1985) o el promotor tardío principal de adenovirus 2 (Kaufman y Sharp, *Mol. Cell. Biol,* 2:1304-1319, 1982). El vector también puede portar secuencias tales como UCOE (elementos ubicuos de abertura de la cromatina).

Ejemplos de promotores adecuados para su uso en células hospedadoras de hongo filamentoso son, por ejemplo, el promotor de ADH3 o el promotor de tpiA. Ejemplos de otros promotores útiles son los derivados del gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, la ácido aspártico proteinasa de *Rhizomucor miehei*, la α-amilasa neutra de *A. niger*, la α-amilasa estable ácida de *A. niger*, la glucoamilasa (gluA) *A. niger* o *A. awamori*, la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *A. oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o la acetamidasa *A. nidulans*. Se prefieren los promotores de la TAKA amilasa y gluA.

Promotores adecuados para su uso en vectores de expresión con hospedadores procarióticos incluyen los sistemas promotores de la β-lactamasa y lactosa [Chang *et al*., Nature, 275:615 (1978); Goeddel *et al*., Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); documento EP 36776], y promotores híbridos tales como el promotor de tac [deBoer *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)], todos unidos de forma funcional a los ADN que codifican polipéptidos de CFXTEN. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también pueden contener una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.), unida de forma funcional a los ADN que codifican polipéptidos de CFXTEN.

La enseñanza contempla el uso de otros sistemas de expresión incluyendo, por ejemplo, un sistema de expresión de baculovirus con vectores de transferencia sin fusión, tales como, aunque sin limitación, pVL941 Summers, *et al.,* Virology 84:390-402 (1978)), pVL1393 (Invitrogen), pVL1392 (Summers, *et al*., Virology 84:390-402 (1978) e Invitrogen) y pBlueBacIII (Invitrogen), y vectores de transferencia de fusión tales como, aunque sin limitación, pAc7 00 (Summers, *et al*., Virology 84:390-402 (1978)), pAc701 y pAc70-2 (igual que pAc700, con diferentes marcos de lectura), pAc360 Invitrogen) y puede usarse pBlueBacHisA, B, C (; Invitrogen).

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica la variante polipeptídica de FVIII en células de mamífero son el promotor de CMV (Boshart *et al., Cell* 41:521-530, 1985), el promotor de SV40 (Subramani *et al.,* Mol. *Cell.* Biol. 1 (1981), 854-864), el promotor de MT-1 (gen de la metalotioneína) (Palmiter *et al., Science* 222 (1983), 809-814), promotor tardío principal de adenovirus 2 (Kaufman y Sharp, *Mol. Cell. Biol,* 2:1304-1319, 1982). El vector también puede portar secuencias tales como UCOE (elementos ubicuos de abertura de la cromatina).

Las secuencias de ADN que codifican la CFXTEN también pueden conectarse de forma funcional, si fuera necesario, a un terminador adecuado, tal como el terminador de hGH (Palmiter *et al., Science* 222, 1983, pág. 809-814) o los terminadores de TPI1 (Alber y Kawasaki, *J. Mol. Appl.* Gen. 1, 1982, pág. 419-434) o ADH3 (McKnight *et al., The EMBO J*. 4, 1985, pág. 2093-2099). Los vectores de expresión también pueden contener un conjunto de sitios de empalme de ARN ubicados en dirección 3' del promotor y en dirección 5' del sitio de inserción para la propia secuencia de CFXTEN, incluyendo sitios de empalme obtenidos de adenovirus. También hay una señal de poliadenilación contenida en los vectores de expresión ubicada en dirección 3' del sitio de inserción. Las señales de poliadenilación

particularmente preferidas incluyen la señal de poliadenilación temprana o tardía de SV40 (Kaufman y Sharp, *ibid*.), la señal de poliadenilación de la región Elb de adenovirus 5, el terminador de hGH (DeNoto *et al.* Nucl. Acids Res. 9:3719-3730, 1981). Los vectores de expresión también pueden incluir una secuencia líder vírica no codificante, tal como el líder tripartito de adenovirus 2, ubicado entre el promotor y los sitios de empalme de ARN; y secuencias potenciadoras, tales como el potenciador de SV40.

Para dirigir la CFXTEN de la presente enseñanza a la vía secretora de las células hospedadoras, puede incluirse una secuencia señal secretora (o también denominada una secuencia líder, una preprosecuencia o una presecuencia) en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une de forma funcional a las secuencias de ADN que codifican la CFXTEN, habitualmente colocada 5' respecto a la secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión de CFXTEN. La secuencia señal secretora puede ser aquella normalmente asociada con la proteína de FVIII nativa o puede ser de un gen que codifique otra proteína secretada. Ejemplos no limitantes incluyen OmpA, PhoA, y DsbA para la expresión en *E. coli*, ppL alfa, DEX4, péptido señal de invertasa, péptido señal de fosfatasa ácida, CPY o INU1 para expresión en levaduras, e IL2L, SV40, lgG kappa e lgG lambda para expresión en mamíferos. Las secuencias señal típicamente se eliminan proteolíticamente de la proteína durante el proceso de traslocación y secreción, generando un extremo N definido. Se divulgan métodos en Arnau, *et al*., Protein Expression and Purification 48: 1-13 (2006).

Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican la CFXTEN, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contengan la información necesaria para la replicación, son bien conocido por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook, J. *et al*., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3.ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). De esta manera, una molécula de ADN quimérica que codifica una proteína de fusión de CFXTEN monomérica se genera dentro de la construcción. Opcionalmente, esta molécula de ADN quimérica puede transferirse o clonarse en otra construcción que sea un vector de expresión más apropiado. En este punto, una célula hospedadora que pueda expresar la molécula de ADN quimérica puede transformarse con la molécula de ADN quimérica.

Ejemplos no limitantes de líneas celulares de mamífero para su uso en la presente enseñanza son las células COS-1 (ATCC CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), BHK-21 (ATCC CCL 10)) y BHK-293 (ATCC CRL 1573; Graham *et al., J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977), BHK-570 (ATCC CRL 10314), CHO-K1 (ATCC CCL 61), CHO-S (Invitrogen 11619-012) y 293-F (Invitrogen R790-7), y las líneas celulares precursoras y derivadas conocidas en la técnica útiles para la expresión de FVIII. También está disponible una línea celular tk-ts13 BHK en la ATCC con el número de acceso CRL 1632. Además, pueden usarse otras varias líneas celulares dentro de presente enseñanza, incluyendo células de rata Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), de rata Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), de pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC CCL 61) y de DUKX (Urlaub y Chasin, *Proc.* Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980).

Ejemplos de células de levadura adecuadas incluyen células de especies de *Saccharomyces* o especies de *Schizosaccharomyces*, en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces kluyveri*. Se describen métodos para transformar células de levadura con ADN heterólogo y producir péptidos heterólogos a partir del mismo, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 4599311, patente de Estados Unidos n.º 4931373, patente de Estados Unidos n.º 4870008, patente de Estados Unidos n.º 5037743 y patente de Estados Unidos n.º 4845075. Las células transformadas se seleccionan por un fenotipo determinado por un marcador de selección, habitualmente resistencia a fármaco o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular, por ejemplo, leucina. Un vector preferido para su uso en levaduras es el vector POT1 divulgado en la patente de Estados Unidos n.º 4931373. Las secuencias de ADN que codifican la CFXTEN pueden estar precedidas por una secuencia señal y opcionalmente una secuencia líder, por ejemplo, como se describe anteriormente. Ejemplos adicionales de células de levadura adecuadas son cepa de *Kluyveromyces,* tales como *K. lactis, Hansenula*, por ejemplo,*H. polymorpha* o *Pichia*,por ejemplo, *P. pastoris* (véase, Gleeson *et al., J. Gen. Microbiol*. 132, 1986, pág. 3459-3465; patente de Estados Unidos n.º 4882279). Ejemplos de otras células fúngicas son células de hongos filamentosos, por ejemplo, especies de *Aspergillus*, especies de *Neurospora*, especies de *Fusarium* o especies de *Trichoderma*, en particular cepas de *A. oryzae, A. nidulans* o *A. niger*. El uso de especies de *Aspergillus* para la expresión de proteína se describe en, por ejemplo, los documentos EP 272277, EP 238023, EP 184438. La transformación de *F. oxysporum* puede realizarse, por ejemplo, como se describe por Malardier *et al.,* 1989, *Gene* 78: 147-156. La transformación de especies de *Trichoderma* puede realizarse, por ejemplo, como se describe en el documento EP 244234.

Otras células adecuadas que pueden usarse en la presente enseñanza incluyen, aunque sin limitación, cepas de células hospedadoras procarióticas tales como *Escherichia coli,* (por ejemplo, cepa DH5-α), *Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium* o cepas de los géneros *Pseudomonas, Streptomyces* y *Staphylococcus*. Ejemplos no limitantes de procariotas adecuados incluyen los de los géneros: *Actinoplanes; Archaeoglobus; Bdellovibrio; Borrelia; Chloroflexus; Enterococcus; Escherichia; Lactobacillus; Listeria; Oceanobacillus; Paracoccus; Pseudomonas; Staphylococcus; Streptococcus; Streptomyces; Thermoplasma;* and *Vibrio.*

Se describen métodos de transfección de células de mamífero y expresión de secuencias de ADN introducidas en las células en, por ejemplo, Kaufman y Sharp, *J. Mol.* Biol. 159 (1982), 601-621; Southern and Berg, *J. Mol. Appl. Genet*. 1 (1982), 327-341; Loyter *et al., Proc*. Natl. Acad. Sci. *USA* 79 (1982), 422-426; Wigler *et al., Cell* 14 (1978), 725;

Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7 (1981), 603, Graham y van der Eb, *Virology* 52 (1973), 456; y Neumann *et al., EMBO J.* 1 (1982), 841-845.

Las secuencias de ADN clonadas se introducen en células de mamífero cultivadas por, por ejemplo, transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler *et al*., Cell 14:725-732, 1978; Corsaro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603-616, 1981; Graham y Van der Eb, Virology 52d:456-467, 1973), transfección con muchos reactivos disponibles en el mercado tales como FuGENEG Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) o lipofectamina (Invitrogen) o por electroporación (Neumann *et al*., EMBO J. 1:841-845, 1982). Para identificar y seleccionar células que expresan el ADN exógeno, en general se introduce un gen que confiere un fenotipo de selección (un marcador de selección) en las células junto con el gen o ADNc de interés. Los marcadores de selección preferidos incluyen genes que confieren resistencia a fármacos tales como neomicina, higromicina, puromicina, zeocina y metotrexato. El marcador de selección puede ser un marcador de selección amplificable. Un marcador de selección amplificable preferido es una secuencia de la dihidrofolato reductasa (DHFR). Ejemplos adicionales de marcadores de selección son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen indicadores tales como proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), beta-galactosidasa (β-gal) o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Los marcadores de selección se revisan por Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass.). Los expertos en la materia podrán elegir fácilmente los marcadores de selección adecuados. Cualquier marcador de selección conocido puede emplearse siempre que pueda expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico.

Los marcadores de selección pueden introducirse en la célula o un plásmido diferente al mismo tiempo que el gen de interés, o pueden introducirse en el mismo plásmido. Si están en el mismo plásmido, el marcador de selección y el gen de interés pueden estar bajo el control de promotores diferente o el mismo promotor, produciendo la última disposición un mensaje dicistrónico. Las construcciones de este tipo son conocidas en la técnica (por ejemplo, Levinson y Simonsen, patente de Estados Unidos n.º 4713339). También puede ser ventajoso añadir ADN adicional, conocido como "ADN portador" a la mezcla que se introduce en las células.

Después de que las células hayan captado el ADN, se cultivan en un medio de cultivo apropiado, típicamente 1-2 días, para empezar a expresar el gen de interés. Como se usa en la presente memoria, la expresión "medio de cultivo apropiado" significa un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células y la expresión de la CFXTEN de interés. Los medios en general incluyen una fuente de carbono, una fuente nitrógeno, aminoácidos esenciales, azúcares esenciales, vitaminas, sales, fosfolípidos, proteína y factores de crecimiento. Para la producción de proteínas gamma carboxiladas, el medio contendrá vitamina K, preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml. Después se aplica selección con fármaco para seleccionar el crecimiento de células que están expresando el marcador de selección de un modo estable. Para células que se han transfectado con un marcador de selección amplificable, la concentración de fármaco puede aumentarse para seleccionar un número de copias aumentado de las secuencias clonadas, aumentando de ese modo los niveles de expresión. Los clones de células transfectadas de forma estable se criban entonces par la expresión de la variante polipeptídica de FVIII de interés.

La célula hospedadora transformada o transfectada entonces se cultiva en un medio nutriente adecuado en condiciones que permiten la expresión del polipéptido de CFXTEN, y después de ello el péptido resultante puede recuperarse del cultivo como una proteína de fusión aislada. El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar las células hospedadoras, tal como medio mínimo o complejo que contiene complementos apropiados. Los medios adecuados están disponibles en proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con recetas publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para los expertos en la materia.

La expresión génica puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, por transferencia de Southern convencional, transferencia de Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], transferencia puntual (análisis de ADN) o hibridación *in situ,* usando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente memoria. Como alternativa, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dobles hélices específicas, incluyendo dobles hélices de ADN, dobles hélices de ARN y dobles hélices híbridas de ADN-ARN o dobles hélices de ADN-proteína. Los anticuerpos, a su vez, pueden marcarse y el ensayo puede realizarse cuando la doble hélice se une a una superficie, de modo que, tras la formación de la doble hélice en la superficie, puede detectarse la presencia de anticuerpo unido a la doble hélice.

La expresión génica, como alternativa, puede medirse por métodos inmunológicos de fluorescencia, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones tisulares y ensayo de cultivo celular o líquidos corporales o la detección de marcadores de selección, para cuantificar directamente la expresión de producto génico. Los anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de líquidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse frente a un polipéptido de FVIII de secuencia nativa o frente a un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente memoria o frente a una secuencia exógena fusionada a FVIII y que codifica un epítopo de anticuerpo específico. Ejemplos de marcadores de selección son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen

indicadores tales como proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), beta-galactosidasa (β-gal) o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT).

El uno o más productos polipeptídicos de CFXTEN expresados pueden purificarse mediante métodos conocidos en la técnica o mediante métodos divulgados en la presente memoria. Pueden usarse procedimientos tales como filtración en gel, purificación por afinidad (por ejemplo, usando una columna de anticuerpo anti-FVIII), fraccionamiento salino, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción de hidroxiapatita, cromatografía de interacción hidrófoba y electroforesis en gel; cada uno adaptado para recuperar y purificar la proteína de fusión producida por las células hospedadoras respectivas. Puede conseguirse purificación adicional por medios convencionales de purificación química, tales como cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Algunas CFXTEN expresadas pueden requerir replegamiento durante el aislamiento y la purificación. Se describen métodos de purificación en Robert K. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Charles R. Castor (ed.), Springer-Verlag 1994, y Sambrook, *et al., supra.* También se describen separaciones por purificación de múltiples etapas en Baron, *et al.,* Crit. Rev. Biotechnol. 10:179-90 (1990) y Below, *et al*., J. Chromatogr. A. 679:67-83 (1994). Con propósitos terapéuticos, se prefiere que las proteínas de fusión de CFXTEN de la enseñanza sean sustancialmente puras. Por tanto, en un aspecto preferida de la enseñanza, la CFXTEN de la enseñanza se purifica hasta al menos aproximadamente un 90 a un 95 % de homogeneidad, preferiblemente hasta al menos aproximadamente un 98 % de homogeneidad. La pureza puede evaluarse, por ejemplo, por electroforesis en gel, HPLC y secuenciación de aminoácidos aminoterminales.

VIII). Composiciones farmacéuticas

La presente enseñanza proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden CFXTEN. En un aspecto, la composición farmacéutica comprende una proteína de fusión de CFXTEN divulgada en la presente memoria mezclada con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los polipéptidos de CFXTEN de la presente enseñanza pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante los que el polipéptido se combina en mezcla con un vehículo de transporte farmacéuticamente aceptable tal como disoluciones acuosas, tampones, disolventes y/o suspensiones, emulsiones, estabilizantes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de disolventes no acuosos incluyen propiletilenglicol, polietilenglicol y aceites vegetales. Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas se preparan para su almacenamiento mezclando el ingrediente de CFXTEN activo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos fisiológicamente aceptables opcionales, excipientes (por ejemplo, cloruro de sodio, una sal de calcio, sacarosa o polisorbato) o estabilizantes (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, rafinosa, arginina, una sal de calcio, glicina o histidina), como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.ª edición, Osol, A. Ed. (1980), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas.

La composición farmacéutica puede suministrarse como un polvo liofilizado a reconstituir antes de su administración. En otro aspecto, la composición farmacéutica puede suministrarse en una forma líquida en un vial, cuyos contenidos pueden administrarse directamente a un paciente. Como alternativa, la composición se suministra como un líquido en una jeringa prellenada para la administración de la composición. En otro aspecto, la composición se suministra como un líquido en un vial prellenado que puede incorporare en una bomba.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por cualquier medio o vía adecuada, incluyendo por vía subcutánea, subcutánea mediante bomba de infusión, intramuscular e intravenosa. Se apreciará que la vía preferida variará con la enfermedad y edad del destinatario, y la gravedad de la afección que se esté tratando.

En un aspecto, la composición farmacéutica de CFXTEN en forma líquida o después de su reconstitución (cuando se suministra como un polvo liofilizado) comprende factor VIII de coagulación con una actividad de al menos 50 UI/ml, o al menos 100 UI/ml, o al menos 200 UI/ml, o al menos 300 UI/ml, o al menos 400 UI/ml, o una actividad de al menos 500 UI/ml, o una actividad de al menos 600 UI/ml, que es una composición que puede aumentar la actividad de factor VIII hasta al menos un 1,5 % del nivel plasmático normal en la sangre durante al menos aproximadamente 12 horas, o al menos aproximadamente 24 horas, o al menos aproximadamente 48 horas, o al menos aproximadamente 72 horas, o al menos aproximadamente 96 horas, o al menos aproximadamente 120 horas después de su administración de la composición farmacéutica de factor VIII a un sujeto que necesita profilaxis rutinaria. En otro aspecto, la composición farmacéutica de CFXTEN en forma líquida o después de su reconstitución (cuando se suministra como un polvo liofilizado) comprende factor VIII de coagulación con una actividad de al menos 50 UI/ml, o al menos 100 UI/ml, o al menos 200 UI/ml, o al menos 300 UI/ml, o al menos 400 UI/ml, o al menos 500 UI/ml, o una actividad de al menos 600 UI/ml, que es una composición que puede aumentar la actividad de factor VIII hasta al menos un 2,5% del nivel plasmático normal en la sangre durante al menos aproximadamente 12 horas, o al menos aproximadamente 24 horas, o al menos aproximadamente 48 horas, o al menos aproximadamente 72 horas, o al menos aproximadamente 96 horas, o al menos aproximadamente 120 horas después de su administración a un sujeto que necesita profilaxis rutinaria. Se contempla específicamente que las composiciones farmacéuticas de lo anterior pueden formularse para que incluyan uno o más excipientes, tampones u otros ingredientes conocidos en la técnica como compatibles con la administración por vía intravenosa o vía subcutánea o vía intramuscular. Por tanto, en los

aspectos descritos anteriormente en la presente memoria en este párrafo, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea, por vía intramuscular o por vía intravenosa.

Las composiciones de la enseñanza pueden formularse usando una diversidad de excipientes. Los excipientes adecuados incluyen celulosa microcristalina (por ejemplo, Avicel PH102, Avicel PH101), polimetacrilato, poli(acrilato de etilo, metacrilato de metilo, cloruro de metacrilato de trimetilamonioetilo) (tal como Eudragit RS-30D), hidroxipropilmetilcelulosa (Methocel K100M, Premium CR Methocel K100M, Methocel E5, Opadry®), estearato de magnesio, talco, citrato de trietilo, dispersión de etilcelulosa acuosa (Surelease®) y sulfato de protamina. El agente de liberación lenta también puede comprender un vehículo, que puede comprender, por ejemplo, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción. También pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables en estos agentes de liberación lenta, por ejemplo, sales minerales tales como hidrocloruros, hidrobromuros, fosfatos o sulfatos, así como las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos o benzoatos. La composición también puede contener líquidos, tales como agua, disolución salina, glicerol y etanol, así como sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes o agentes tamponantes del pH. También pueden usarse liposomas como vehículo.

En otro aspecto, las composiciones de la presente enseñanza se encapsulan en liposomas, que han demostrado utilidad en el suministro de agentes activos beneficiosos de una manera controlada a lo largo de periodos prolongados de tiempo. Los liposomas son membranas de bicapa cerradas que contienen un volumen acuoso atrapado. Los liposomas también pueden ser vesículas unilaminares que poseen una única bicapa de membrana o vesículas multilaminares con múltiples bicapas de membrana, cada una separada de la siguiente por una capa acuosa. La estructura de la bicapa de membrana resultante es tal que las colas hidrófobas (no polares) del lípido se orientan hacia el centro de la bicapa mientras que las cabezas hidrófilas (polares) se orientan hacia la fase acuosa. En un aspecto, el liposoma puede recubrirse con un polímero soluble en agua flexible que evita la captación por los órganos del sistema fagocitario mononuclear, principalmente el hígado y el bazo. Los polímeros hidrófilos adecuados para rodear los liposomas incluyen, sin limitación, PEG, polivinilpirrolidona, polivinilmetiléter, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, polihidroxipropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polihidroxipropilmetacrilato, polihidroxietilacrilato, hidroximetilcelulosa hidroxietilcelulosa, polietilenglicol, poliaspartamida y secuencias peptídicas hidrófilas como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 6316024; 6126966; 6056973; 6043094. Se describen tecnologías liposómicas adicionales en las patentes de Estados Unidos n.º 6759057; 6406713; 6352716; 6316024; 6294191; 6126966; 6056973; 6043094; 5965156; 5916588; 5874104; 5215680; y 4684479. Estas describen liposomas y microburbujas recubiertas de lípidos, y métodos para su fabricación. Por tanto, un experto en la materia, considerando tanto la divulgación de esta enseñanza como las divulgaciones de estas otras patentes podría producir un liposoma para la liberación prolongada de los polipéptidos de presente enseñanza.

Para formulaciones líquidas, una propiedad deseada es que la formulación se suministre en una forma que pueda pasar a través de una aguja de calibre 25, 28, 30, 31, 32 para administración intravenosa, intramuscular, intraarticular o subcutánea.

También pueden usarse bombas de jeringa como agentes de liberación lenta. Dichos dispositivos se describen en las patentes de Estados Unidos n.º 4976696; 4933185; 5017378; 6309370; 6254573; 4435173; 4398908; 6572585; 5298022; 5176502; 5492534; 5318540; y 4988337. Un experto en la materia, considerando tanto la divulgación de esta enseñanza como las divulgaciones de estas otras patentes, podría producir una bomba de jeringa para la liberación prolongada de las composiciones de la presente enseñanza.

IX). Kits farmacéuticos

En otro aspecto, la enseñanza proporciona un kit para facilitar el uso de los polipéptidos de CFXTEN. El kit comprende la composición farmacéutica proporcionada en la presente memoria, un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc., formados de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente aloja una composición farmacéutica como una formulación que es eficaz para tratar la afección relacionada con FVIII y puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El prospecto puede enumerar las indicaciones aprobadas para el fármaco, instrucciones para la reconstitución y/o administración del fármaco para el uso para la indicación aprobada, información de dosificación apropiada y seguridad, e información que identifica el lote y caducidad del fármaco. En otro aspecto de lo anterior, el kit puede comprender un segundo recipiente que puede portar un diluyente adecuado para la composición farmacéutica, cuyo uso proporcionará al usuario la concentración apropiada a suministrar al sujeto.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de segmentos de motivo de XTEN_AD36

El siguiente ejemplo describe la construcción de un conjunto de genes de codones optimizados que codifican secuencias de motivo de 36 aminoácidos. Como una primera etapa, se construyó un vector de relleno pCW0359 basado en un vector pET y que incluye el promotor T7. pCW0359 codifica un dominio de unión a celulosa (CBD) y un sitio de reconocimiento por proteasa TEV seguido de una secuencia de relleno que está flanqueada por los sitios BsaI, BbsI y KpnI. Los sitios BsaI y BbsI se insertaron de modo que generaran salientes compatibles después de la digestión. La secuencia de relleno va seguida por una versión truncada del gen de GFP y una marca de His. La secuencia de relleno contiene codones de parada y, por tanto, las células de *E. coli* que portan el plásmido de relleno pCW0359 forman colonias no fluorescentes. El vector de relleno pCW0359 se digirió con BsaI y KpnI para eliminar el segmento de relleno y el fragmento del vector resultante se aisló por purificación en gel de agarosa. Las secuencias se denominaron XTEN_AD36, que reflejan la familia AD de motivos. Sus segmentos tienen la secuencia de aminoácidos $[X]_3$ donde X es un péptido de 12 monómeros con las secuencias: GESPGGSSGSES (SEQ ID NO: 19), GSEGSSGPGESS (SEQ ID NO: 20), GSSESGSSEGGP (SEQ ID NO: 21) o GSGGEPSESGSS (SEQ ID NO: 22). El inserto se obtuvo hibridando las siguientes parejas de parejas oligonucleotídicas sintéticas fosforiladas:

AD1for: AGGTGAATCTCCDGGTGGYTCYAGCGGTTCYGARTC (SEQ ID NO: 1619)

AD1rev: ACCTGAYTCRGAACCGCTRGARCCACCHGGAGATTC (SEQ ID NO: 1620)

AD2for: AGGTAGCGAAGGTTCTTCYGGTCCDGGYGARTCYTC (SEQ ID NO: 1621)

AD2rev: ACCTGARGAYTCRCCHGGACCRGAAGAACCTTCGCT (SEQ ID NO: 1622)

AD3for: AGGTTCYTCYGAAAGCGGTTCTTCYGARGGYGGTCC (SEQ ID NO: 1623)

AD3rev: ACCTGGACCRCCYTCRGAAGAACCGCTTTCRGARGA (SEQ ID NO: 1624)

AD4for: AGGTTCYGGTGGYGAACCDTCYGARTCTGGTAGCTC (SEQ ID NO: 1625)

También se hibridó el oligonucleótido fosforilado 3KpnIstopperFor: AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC (SEQ ID NO: 1626) y el oligonucleótido no fosforilado pr_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA (SEQ ID NO: 1627). Las parejas oligonucleotídicas hibridadas se ligaron, lo que produjo una mezcla de productos con longitud variable que representa el número variable de repeticiones de 12 monómeros ligadas a un segmento BbsI/KpnI. Los productos correspondientes a la longitud de 36 aminoácidos se aislaron de la mezcla por electroforesis preparativa en gel de agarosa y se ligaron en el vector de relleno pCW0359 digerido con BsaI/KpnI. La mayoría de los clones en la colección resultante denominada LCW0401 mostraban fluorescencia verde después de inducción, lo que muestra que la secuencia de XTEN_AD36 se ha ligado en el mismo marco con el gen de GFP y que la mayoría de secuencias de XTEN_AD36 tenían buenos niveles de expresión.

Se cribaron 96 aislados de la colección LCW0401 para alto nivel de fluorescencia estampándolos en placa de agar que contenía IPTG. Los mismos aislados se evaluaron por PCR y se identificaron 48 aislados que contenían segmentos con 36 aminoácidos, así como fluorescencia fuerte. Estos aislados se secuenciaron y se identificaron 39 clones que contenían los segmentos de XTEN_AD36 correctos. Los nombres de archivo de las construcciones de nucleótidos y aminoácidos y las secuencias de estos segmentos se enumeran en la tabla 13.

Tabla 13: Secuencias de ADN y aminoácidos para motivos AD de 36 monómeros (SEQ ID NO: 203-278, respectivamente, en orden de aparición)

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0401_001_GFP-N_A01.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCGGGTGGCTCTAGCGGTTCCGAGTCA GGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCCGAGTCA
LCW0401_002_GFP-N_B01.ab1	GSEGSSGPGESSGESPGG SSGSESGSSESGSSEGGP	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGCGAGTCTTCA GGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCTGAATCA GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA
LCW0401_003_GFP-N_C01.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGESPGGSSGSES	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGTGGTCCA GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGTGGTCCA GGTGAATCTCCGGGTGGCTCCAGCGGTTCCGAGTCA
LCW0401_004_GFP-N_D01.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGCGAACCGTCTGAATCTGGTAGCTCA GGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGTGGTCCA GGTTCTGGTGGTGAACCTTCCGAGTCTGGTAGCTCA
LCW0401_007_GFP-N_F01.ab1	GSSESGSSEGGPGSEGSS GPGESSGSEGSSGPGESS	GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGTGGTCCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGAGTCTTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGTGAATCTTCA
LCW0401_008_GFP-N_G01.ab1	GSSESGSSEGGPGESPGG SSGSESGSEGSSGPGESS	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGTGGTCCA GGTGAATCTCCAGGTGGTTCCAGCGGTTCTGAGTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGTGAATCCTCA
LCW0401_012_GFP-N_H01.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGSEGSSGPGESS	GGTTCTGGTGGTGAACCGTCTGAGTCTGGTAGCTCA GGTTCCGGTGGCGAACCATCCGAATCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGAGTCTTCA
LCW0401_015_GFP-N_A02.ab1	GSSESGSSEGGPGSEGSS GPGESSGESPGGSSGSES	GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGCGGTCCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAATCTTCA GGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAGTCA
LCW0401_016_GFP-N_B02.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSESGSSEGGP	GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCA GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA GGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA
LCW0401_020_GFP-N_E02.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGSSESGSSEGGP	GGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAATCTTCA GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCA
LCW0401_022_GFP-N_F02.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGTGGTCCA GGTTCCGGTGGCGAACCTTCTGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_024_GFP-N_G02.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGTGGTCCA GGTGAATCTCCAGGTGGTTCTAGCGGTTCTGAATCA
LCW0401_026_GFP-N_H02.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGSEGSSGPGESS	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCTGAGTCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAATCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGTGAATCTTCA

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0401_027_GFP-N_A03.ab1	GSKGIEPSESGSSKGIESPGG SSGSESGSGKGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCGGGTGGTTCTAGCGGTTCTGAGTCA GGTTCTGGTGGTGAACCTTCCGAGTCTGGTAGCTCA
LCW0401_028_GFP-N_B03.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSESGSSEGGP	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCA GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGCGGTCCA
LCW0401_030_GFP-N_C03.ab1	GESPGGSSGSESGSEGSS GPGESSGSEGSSGPGESS	GGTGAATCTCCGGGTGGCTCTAGCGGTTCTGAGTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTGGCTCCTCGGGTGAGTCTTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTGGCTCCTCGGGTGAGTCTTCA
LCW0401_031_GFP-N_D03.ab1	GSKGIEPSESGSSKGSKGIEP SESGSSKGSSESGSSEGKGP	GGTTCTGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAATCTGGTAGCTCA GGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA
LCW0401_033_GFP-N_E03.ab1	GSGGIEPSESGSSGSGGIEP SESGSSKGSGGIEPSESGSS	GGTTCCGGTGTGAACCTTCTGAATCTGGTAGCTCA GGTTCCGGTGGCGAACCATCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTTCCGGTGGTGAACCATCCGAGTCTGGTAGCTCA
LCW0401_037_GFP-N_F03.ab1	GSGGIEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSESGSSKGPGESS	GGTTCCGGTGGCGAACCTTCTGAATCTGGTAGCTCA GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTGGCGGAGGTCTTCA
LCW0401_038_GFP-N_G03.ab1	GSGGIEPSESGSSGSGEGSS GPGESSGSGGIEPSESGSS	GGTTCCGGTGGTGAACCGTCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTGGCGAAGGTCTTCA GGTTCTGGTGGCGAACCGTTCGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_039_GFP-N_H03.ab1	GSGGIEPSESGSSGSEGSPGG SSGSESGSGKGEPSESGSS	GGTTCTGGTGGCGAACCGGTCCAATCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCCGAGTCA GGTTCTGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_040_GFP-N_A04.ab1	GSSESGSSEGGPGSGGIEP SESGSSKGSSESGSSEGKGP	GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA GGTTCCGGTGGTGAACCATCTGAATCTGGTAGCTCA GGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGTGGTCCA
LCW0401_042_GFP-N_C04.ab1	GSEGSSGPGESSGESPGG SSGSESGSSEGSSGPGESS	GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGTGAGTCTTCA GGTGAATCTCCAGGTGGCTCTAGCGGTTCCGAGTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTGCTGGCGAGTCCTCA
LCW0401_046_GFP-N_D04.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSLSGSSEGGP	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGCGGTCCA GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGTGGTCCA GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGTGGTCCA
LCW0401_047_GFP-N_E04.ab1	GSGGIEPSESGSSGSEGSPGG SSGSLSKIESPGGSSGSLS	GGTTCTGGTGGCGAACCTTCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCGGGTGGTTCTAGCGGTTCTGAGTCA GGTGAATCTCCGGGTGGTTCCAGCGGTTCTGAGTCA
LCW0401_051_GFP-N_F04.ab1	GSGGIEPSESGSSGSEGSS GPGESSGSEGSPGGSSGSLS	GGTTCTGGTGGCGAACCATCTGAGTCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGCGAGTCTTCA GGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAGTCA

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0401_053_GFP-N_H04.ab1	GESPGTSSTSESGTESPGT SSTSESGTESPTGSTSTES	GGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGTGGTGGTTCCGAGTCA GGTGAATCTCCAGGTGGTCTCTAGCGGTTCCGAGTCA GGTGAATCTCCTGGTGGTTCTAGCGGTTCTGAATCA
LCW0401_054_GFP-N_A05.ab1	GSTSTSSTPGTESSGSEGSS GPGESSGSSGEPSESGSS	GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGAATCTTCA GGTAGCGAAGGTTCTCTGGTCCTGGTGAATCCTCA GGTTCCGGTGGCGAACCATCTGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_059_GFP-N_D05.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCATCCGAATCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTCTGGTCCTGGCGGAATCTTCA GGTGAATCTCCAGGTGGCTCTAGCGGTTCCGAATCA
LCW0401_060_GFP-N_E05.ab1	GSGGEPSESGSSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCCTCTGAAGCGGTTCTTCCGAGGGTGGTCCA GGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAGTCTGGTAGCTCA
LCW0401_061_GFP-N_F05.ab1	GSSTESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSEGSSGPGESS	GGTTCCTCTGAAGCGGTTCTTCTGAGCGCGGTCCA GGTTCTGGTGGCGAACCATCTGAATCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGTGAATCTTCA
LCW0401_063_GFP-N_H05.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGSEGSSGPGESS	GGTTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGCGAGTCTTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGTGAATCTTCA
LCW0401_066_GFP-N_B06.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCTGGTGGCGAACCAATCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGCGGTCCA GGTTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_067_GFP-N_C06.ab1	GSGGEPSESGSSGSEPGG SSGSESGTESPGGSSGSES	GGTTCCCGTGGTGAACCAATCTGAGTCTGGTAGCTCA GGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCAGGTGGTTCCAGCGGTTCCGAATCA
LCW0401_069_GFP-N_D06.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGTESPGGSSGSES	GGTTCCTCTGGTGGCGAACCTTCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCAGGTGGTTCCAGCGGTTCCGAATCA
LCW0401_070_GFP-N_E06.ab1	GSTGSSGPGESSGSSESG SSEGGPGSEGSSGPGESS	GGTACCGAAGGTTCTTCTGGTCCGGCCCGAATCCTCA GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGTGGTCCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGTGAATCTTCA
LCW0401_078_GFP-N_F06.ab1	GSSESGSSEGGPGESPGG SSGSLSETESPGGSSGSES	GGTTCCTCTGAAGCGGTTCTTCTGAAGGCGGTCCA GGTGAATCTCCGGGTGGTCTCCAGCGGTTCTGAATCA GGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCCGAGTCA
LCW0401_079_GFP-N_G06.ab1	GSTGSSGPGESSGSEGSS GPGESSGSSGGPSESGSS	GGTACCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGGTCTTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGCGAGTCTTCA GGTTCCGGTGGCGGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA

Ejemplo 2: Construcción de segmentos de XTEN_AE36

Se construyó una colección de codones que codificaba secuencias de XTEN de 36 aminoácidos de longitud. La secuencia de XTEN se denominó XTEN_AE36. Sus segmentos tienen la secuencia de aminoácidos $[X]_3$ donde X es un péptido de 12 monómeros con la secuencia: GSPAGSPTSTEE (SEQ ID NO: 23), GSEPATSGSETP (SEQ ID NO: 24), GTSESATPESGP (SEQ ID NO: 25) o GTSTEPSEGSAP (SEQ ID NO: 26). El inserto se obtuvo hibridando las siguientes parejas de parejas oligonucleotídicas sintéticas fosforiladas:

AE1for: AGGTAGCCCDGCWGGYTCTCCDACYTCYACYGARGA (SEQ ID NO: 1628)

AE1rev: ACCTTCYTCRGTRGARGTHGGAGARCCWGCHGGGCT (SEQ ID NO: 1629)

AE2for: AGGTAGCGAACCKGCWACYTCYGGYTCTGARACYCC (SEQ ID NO: 1630)

AE2rev: ACCTGGRGTYTCAGARCCRGARGTWGCMGGTTCGCT (SEQ ID NO: 1631)

AE3for: AGGTACYTCTGAAAGCGCWACYCCKGARTCYGGYCC (SEQ ID NO: 1632)

AE3rev: ACCTGGRCCRGAYTCMGGRGTWGCGCTTTCAGARGT (SEQ ID NO: 1633)

AE4for: AGGTACYTCTACYGAACCKTCYGARGGYAGCGCWCC (SEQ ID NO: 1634)

AE4rev: ACCTGGWGCGCTRCCYTCRGAMGGTTCRGTAGARGT (SEQ ID NO: 1635)

También se hibridó el oligonucleótido fosforilado 3KpnIstopperFor: AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC (SEQ ID NO: 1626) y el oligonucleótido no fosforilado pr_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA (SEQ ID NO: 1627). Las parejas oligonucleotídicas hibridadas se ligaron, lo que produjo una mezcla de productos con longitud variable que representa el número variable de repeticiones de 12 monómeros ligadas a un segmento BbsI/KpnI. Los productos correspondientes a la longitud de 36 aminoácidos se aislaron de la mezcla por electroforesis preparativa en gel de agarosa y se ligaron en el vector de relleno pCW0359 digerido con BsaI/KpnI. La mayoría de los clones en la colección resultante denominada LCW0402 mostraban fluorescencia verde después de inducción lo que muestra que la secuencia de XTEN_AE36 se había ligado en el mismo marco con el gen de GFP y la mayoría de secuencias de XTEN_AE36 muestran buena expresión.

Se cribaron 96 aislados de la colección LCW0402 para alto nivel de fluorescencia estampándolos en placa de agar que contenía IPTG. Los mismos aislados se evaluaron por PCR y se identificaron 48 aislados que contenían segmentos con 36 aminoácidos, así como fluorescencia fuerte. Estos aislados se secuenciaron y se identificaron 37 clones que contenían los segmentos de XTEN_AE36 correctos. Los nombres de archivo de las construcciones de nucleótidos y aminoácidos y las secuencias para estos segmentos se enumeran en la tabla 14.

Tabla 14: Secuencias de ADN y aminoácidos para motivos AE de 36 monómeros (SEQ ID NO: 279-352, respectivamente, en orden de aparición)

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0402_002_GFP-N_A07.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSE GSAP	GGTAGCCCCGGCAGGCTCTCCGACCTCTACTGAGGAA GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCCA GGTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCA
LCW0402_003_GFP-N_B07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCA GGTACCTCTACTGAACCTTCCGAGGGCAGCGCTCCA GGTACCTCTACCGAACCTTCTGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_004_GFP-N_C07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATP ESGP	GGTACCTCTACCGAACCGTCTGAAGGTAGCGCACCA GGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCCGGTCCA GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCTGGCCCA
LCW0402_005_GFP-N_D07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATP ESGP	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGTAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCCGGCCCA GGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCCA
LCW0402_006_GFP-N_E07.ab1	GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPT STEE	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCCA GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGCCCA GGTAGCCCGGCAGGTTCTCCGACTTCCACTGAGGAA
LCW0402_008_GFP-N_F07.ab1	GTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSE GSAP	GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCA GGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGCTCTGAGACTCCA GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_009_GFP-N_G07.ab1	GSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSEPATSG SETP	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGGAA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAAGAA GGTAGCGAACCGGCTACCTCCGGCTCTGAAACTCCA
LCW0402_011_GFP-N_A08.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSE GSAP	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGAA GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGGTCCA GGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCTCCA
LCW0402_012_GFP-N_B08.ab1	GSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSE GSAP	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGAA GGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCTACTGAGGAA GGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCA
LCW0402_013_GFP-N_C08.ab1	GTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAP	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCCGGTCCA GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCA GGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGCTCCA
LCW0402_014_GFP-N_D08.ab1	GTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSE GSAP	GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCA GGTAGCCCCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACTGAGGAA GGTACTTCTACCGAACCTTCTGAGGGTAGCGCACCA
LCW0402_015_GFP-N_E08.ab1	GSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSESATP ESGP	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGCCTCTGAGACTCCA GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACCTCTACCGAAGAA GGTACCTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCTGGCCCA
LCW0402_016_GFP-N_F08.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATP	GGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGGCCCA
	ESGP	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCA

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0402_020_GFP-N_G08.ab1	GTSTEPSEGSAPGSEP AISGSETPGSPAGSPT STEE	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGCAGCCAGCGCACCA GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGTTCTGAAACCCCA GGTAGCCCAGCAGGTTCTCCAACTTCTACTGAAGAA
LCW0402_023_GFP-N_A09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSG SETP	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCAACCTCCAACCGAAGAA GGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGCCCA GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACCCCA
LCW0402_024_GFP-N_B09.ab1	GTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPT STEE	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGGAGTCCGCCCA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACTTCCACCGAGGAA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACTTCTACTGAAGAA
LCW0402_025_GFP-N_C09.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSE GSAP	GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCA GGTACTTCTACTGAAACGCGCTACCCCGGAGTCCGGTCCA GGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_026_GFP-N_D09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSEPATSG SETP	GGTAGCCCCGGCAGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTACCTCTACTGAACTTCTGAGGGTAGCGCTCCA GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCA
LCW0402_027_GFP-N_E09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAP	GGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGACTTCCACTGAGGAA GGTACTTCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGCACCA GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCA
LCW0402_032_GFP-N_H09.ab1	GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPT STEE	GGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGTTCTGAAACCCCA GGTACCTCTGAAAGCGCCTACTCCGGAGTCTCCGCCCA GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCA
LCW0402_034_GFP-N_A10.ab1	GTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAP	GGTACCTCTGAAAGCGCCTACTCCGGAGTCTCCGCCCA GGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCA GGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_036_GFP-N_C10.ab1	GSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAP	GGTAGCCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGCTCCA GGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCA
LCW0402_039_GFP-N_E10.ab1	GTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGCCAGCGCTCCA GGTACTTCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGCTCCA GGTACTTCTACTGAACCTTCTGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_040_GFP-N_F10.ab1	GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSE GSAP	GGTAGCGAACCTGCCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCA GGTACCTCTGAAACGCCTACTCCTGAATCTGCCCCA GGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGCCAGCGCACCA
LCW0402_041_GFP-N_G10.ab1	GTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSE GSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCCACCA GGTAGCCCAGCAGTTCTCCTACCTCCACCGAGGAA GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCA
LCW0402_050_GFP-N_A11.ab1	GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSG SETP	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACTCCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCCGCCCCA GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAAACCCCA

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0402_051_GFP-N_B11.ab1	GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSG SETP	GGTAGCGGAACCGGCGAACTTCCGGCCTCTGGAAACCCCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGGCCCA GGTAGCGGAACCTGCTACCTCTGGCTCTGAAACCCCA
LCW0402_059_GFP-N_E11.ab1	GSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGTSTEPSE GSAP	GGTAGCGGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACTCCA GGTAGCGGAACCTGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCCA GGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCACCA
LCW0402_060_GFP-N_F11.ab1	GTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSG SETP	GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAATCTGGCCCA GGTAGCGGAACCGGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCA GGTAGCGGAACCGGCTACCTCCGGTTCTGAAACTCCA
LCW0402_061_GFP-N_G11.ab1	GTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATP ESGP	GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGGCTCCA GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGGCAACCCCTGAATCCGGTCCA
LCW0402_065_GFP-N_A12.ab1	GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSESATP ESGP	GGTAGCGGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCA GGTACCTCTGAAAGCGCTACTACTCCGGAATCTGGTCCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGGAATCCCGGTCCA
LCW0402_066_GFP-N_B12.ab1	GSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGTSTEPSE GSAP	GGTAGCGGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAAACTCCA GGTAGCGGAACCGGCTACTTCCGGTTCTGAAACTCCA GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCA
LCW0402_067_GFP-N_C12.ab1	GSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGSEPATSG SETP	GGTAGCGGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACTCCA GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCTCCA GGTAGCGGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACTCCA
LCW0402_069_GFP-N_D12.ab1	GTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSG SETP	GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCA GGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCA GGTAGCGGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACTCCA
LCW0402_073_GFP-N_F12.ab1	GTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPT STEE	GGTACTTCTACTGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCA GGTAGCGGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAAACCCCA GGTAGCCCCGGCTGGCTCTGCCGACCTCCACCGAGGAA
LCW0402_074_GFP-N_G12.ab1	GSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSESATP ESGP	GGTAGCGGAACCGGCTACTTCCCGCCTCTGAGACTCCA GGTAGCCCCAGCTCTGGTTCTCTCAACCTCTACTCTGAGGAA GGTACTTCTGAAAGCGGCTACCCCCTGGAATCTGGTCCA
LCW0402_075_GFP-N_H12.ab1	GTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATP ESGP	GGTACCTCTGAAAGCGGCAACTCCTGAGTCTGGCCCA GGTAGCGGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAGACTCCA GGTACCTCTGAAAGCGGCAACCCCTGGAATCTGGTCCA

Ejemplo 3: Construcción de segmentos de XTEN_AF36

Se construyó una colección de codones que codificaba secuencias de 36 aminoácidos de longitud. Las secuencias se denominaron XTEN_AF36. Sus segmentos tienen la secuencia de aminoácidos $[X]_3$ donde X es un péptido de 12 monómeros con la secuencia: GSTSESPSGTAP (SEQ ID NO: 27), GTSTPESGSASP (SEQ ID NO: 28), GTSPSGESSTAP (SEQ ID NO: 29), o GSTSSTAESPGP (SEQ ID NO: 30). El inserto se obtuvo hibridando las siguientes parejas de parejas oligonucleotídicas sintéticas fosforiladas:

AF1for: AGGTTCTACYAGCGAATCYCCKTCTGGYACYGCWCC (SEQ ID NO: 1636)

AF1rev: ACCTGGWGCRGTRCCAGAMGGRGATTCGCTRGTAGA (SEQ ID NO: 1637)

AF2for: AGGTACYTCTACYCCKGAAAGCGGYTCYGCWTCTCC (SEQ ID NO: 1638)

AF2rev: ACCTGGAGAWGCRGARCCGCTTTCMGGRGTAGARGT (SEQ ID NO: 1639)

AF3for: AGGTACYTCYCCKAGCGGYGAATCTTCTACYGCWCC (SEQ ID NO: 1640)

AF3rev: ACCTGGWGCRGTAGAAGATTCRCCGCTMGGRGARGT (SEQ ID NO: 1641)

AF4for: AGGTTCYACYAGCTCTACYGCWGAATCTCCKGGYCC (SEQ ID NO: 1642)

AF4rev: ACCTGGRCCMGGAGATTCWGCRGTAGAGCTRGTRGA (SEQ ID NO: 1643)

También se hibridó el oligonucleótido fosforilado 3KpnIstopperFor: AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC (SEQ ID NO: 1626) y el oligonucleótido no fosforilado pr_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA (SEQ ID NO: 1627). Las parejas oligonucleotídicas hibridadas se ligaron, lo que produjo una mezcla de productos con longitud variable que representa el número variable de repeticiones de 12 monómeros ligadas a un segmento BbsI/KpnI. Los productos correspondientes a la longitud de 36 aminoácidos se aislaron de la mezcla por electroforesis preparativa en gel de agarosa y se ligaron en el vector de relleno pCW0359 digerido con BsaI/KpnI. La mayoría de los clones en la colección resultante denominada LCW0403 mostraban fluorescencia verde después de inducción lo que muestra que la secuencia de XTEN_AF36 se había ligado en el mismo marco con el gen de GFP y la mayoría de secuencias de XTEN_AF36 muestran buena expresión.

Se cribaron 96 aislados de la colección LCW0403 para alto nivel de fluorescencia estampándolos en placa de agar que contenía IPTG. Los mismos aislados se evaluaron por PCR y se identificaron 48 aislados que contenían segmentos con 36 aminoácidos, así como fluorescencia fuerte. Estos aislados se secuenciaron y se identificaron 44 clones que contenían los segmentos de XTEN_AF36 correctos. Los nombres de archivo de las construcciones de nucleótidos y aminoácidos y las secuencias para estos segmentos se enumeran en la tabla 15.

Tabla 15: Secuencias de ADN y aminoácidos para motivos AF de 36 monómeros (SEQ ID NO: 353-440, respectivamente, en orden de aparición)

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0403_004_GFP-N_A01.ab1	GTSTPESGSASPGTSP SGESSTAPGTSPSGES STAP	GGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCATCTCCA GGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAG GTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCCA
LCW0403_005_GFP-N_B01.ab1	GTSPSGESSTAPGSTS STAESPGPGTSPSGES STAP	GGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGCACCA GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGCCCAG GTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCA
LCW0403_006_GFP-N_C01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSP SGESSTAPGTSTPESG SASP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTCCAG GTACCTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGG TACTTCTACTCCTGAAAGCGGCTCTGCTTCTCCA
LCW0403_007_GFP-N_D01.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGTSPSGES STAP	GGTTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAG GTTCCACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGTCCAG GTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCACCA
LCW0403_008_GFP-N_E01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSP SGESSTAPGTSTPESG SASP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAG GTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGG TACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA
LCW0403_010_GFP-N_F01.ab1	GSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGSTSESPS GTAP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAG GTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAG GTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCA
LCW0403_011_GFP-N_G01.ab1	GSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGTSTPESG SASP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAG GTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAG GTACTTCTACCCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA
LCW0403_012_GFP-N_H01.ab1	GSTSESPSGTAPGTSP SGESSTAPGSTSESPS GTAP	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCCAG GTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCAGG TTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCA
LCW0403_013_GFP-N_A02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGTSPSGES STAP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGCCCA GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGTCCAG GTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCA
LCW0403_014_GFP-N_B02.ab1	GSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGSTSESPS GTAP	GGTTCCACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAG GTACCTCTACCCCTGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAG GTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCACCA
LCW0403_015_GFP-N_C02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGTSPSGES STAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCCAG GTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTCCAGG TACCTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCA
LCW0403_017_GFP-N_D02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS ESPSGTAPGSTSSTAE SPGP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAG GTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCACCAG GTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_018_GFP-N_E02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGSTSSTAE SPGP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGCCCA GGTTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGTCCAG GTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGTCCA

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0403_019_GFP-N_F02.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS STAESPGPGSTSSTAE SPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTCCAG GTTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAGG TTCCACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGTCCA
LCW0403_023_GFP-N_H02.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGSTSESPS GTAP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCCAG GTTCTACCAGCGAATCTCCCCGTCTGGTACTGCTCCAGG TTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGTACTGGCACCA
LCW0403_024_GFP-N_A03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGSTSSTAE SPGP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAG GTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAGG TTCCACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_025_GFP-N_B03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS SLALSPGPGTSPSGES STAP	GGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAG GTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCCAGG TACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCA
LCW0403_028_GFP-N_D03.ab1	GSSPSASTGTGPGSST PSGATGSPGSSTSPSGA TGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACCGGCCCAG GTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACTGGCTCTCTCCAGG TAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCA
LCW0403_029_GFP-N_E03.ab1	GTSPSGESSTAPGTST PESGSASPGSTSSTAE SPGP	GGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAG GTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCCGCATCTCCAG GTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTCCA
LCW0403_030_GFP-N_F03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGTSTPESG SASP	GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCAG GTTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAGG TACTTCTACTCCGGAAAGCGGGTTCCGCTTCTCCA
LCW0403_031_GFP-N_G03.ab1	GTSPSGESSTAPGSTS STAESPGPGTSTPESG SASP	GGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAG GTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAGG TACTTCTACCCCGGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCA
LCW0403_033_GFP-N_H03.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS STAESPGPGSTSSTAE SPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCACCAG GTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAGG TTCCACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCA
LCW0403_035_GFP-N_A04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS ESPSGTAPGSTSSTAE SPGP	GGTTCCACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGCCCA GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACTGGCACCA GGTTCTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_036_GFP-N_B04.ab1	GSTSSTAESPGPGTSP SGTESSTAPGTSTPESG SASP	GGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCCAG GTACTTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCAG GTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCA
LCW0403_039_GFP-N_C04.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSPSGES STAP	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCCAG GTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACCGCACCAG GTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCACCA
LCW0403_041_GFP-N_D04.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSTPESG SASP	GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTCCAG GTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACCGCACCAG GTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCA

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0403_044_GFP-N_E04.ab1	GTSTPESGSASPGSTS STAESPGPGTSTSSTAE SPGP	GGTACCTCTACTCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCAG GTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGCCCAG GTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCCA
LCW0403_046_GFP-N_F04.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSPSGES STAP	GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACTGCACCA GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCCAG GTACCTCTACTCCTGAAGCGGTTCTGCATCTCCA
LCW0403_047_GFP-N_G04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGSTSESPS GTAP	GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAG GTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGCCCAG GTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACCGCTCCA
LCW0403_049_GFP-N_H04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STALSPGPGTSTPESG SASP	GGTTCCACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCCA GGTTCTACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAG GTACCTCTACTCCTGAAGCGGTTCCGCATCTCCA
LCW0403_051_GFP-N_A05.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGTSTSESPS GTAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAG GTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCAGG TTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCCA
LCW0403_053_GFP-N_B05.ab1	GTSPSGESSTAPGSTS ESPSGTAPGSTSSTAE SPGP	GGTACCTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCA GGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTCCAG GTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGGCCCA
LCW0403_054_GFP-N_C05.ab1	GSTSESPSGTAPGTSP SGESSTAPGSTSSTAE SPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAG GTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGG TTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGGCCCA
LCW0403_057_GFP-N_D05.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS ESPSGTAPGTSPSGES STAP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAG GTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGCACCAG GTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCA
LCW0403_058_GFP-N_E05.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSTPESG SASP	GGTTCTACTAGCGGAATCTCCTCTGGCACTGCACCAG GTTCTACCAGCGGAATCTCCGTCTGGCACTGCACCAG GTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCA
LCW0403_060_GFP-N_F05.ab1	GTSTPESGSASPGSTS ESPSGTAPGSTSSTAE SPGP	GGTACCTCTACTCCCGGAAAGCGGTTCCGCATCTCCA GGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCACCA GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGGCCCA
LCW0403_063_GFP-N_G05.ab1	GSTSSTAESPGPGTSP SGESSTAPGTSPSGES STAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGCCCA GGTACCTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAG GTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCA
LCW0403_064_GFP-N_H05.ab1	GTSPSGESSTAPGTSP SGESSTAPGTSPSGES STAP	GGTACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCCAG GTACCTCTCCTAGCGGCGGAATCTTCTACCGCTCCAGG TACCTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCACCA
LCW0403_065_GFP-N_A06.ab1	GSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGSTSESPS GTAP	GGTTCCACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAG GTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGG TTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGCACCA

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0403_066_GFP-N_B06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSP SGESSTAPGTSPSGES STAP	GGTTCTACTAGCGGAATCTCCGTCTTGGCACTGCTCCAG GTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGG TACTTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCA
LCW0403_067_GFP-N_C06.ab1	GSTSESPSGTAPGTST PESGSASPGTSSTAE SPGP	GGTTCTACTAGCGGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCCAG GTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCAGG TTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGGTCCA
LCW0403_068_GFP-N_D06.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGSTSESPS GTAP	GGTTCCACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAG GTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCTCCAGG TTCTACCAGCGGAATCTCCGTCTGGCACCGCACCA
LCW0403_069_GFP-N_E06.ab1	GSTSESPSGTAPGTST PESGSASPGTSTPESG SASP	GGTTCTACTAGCGGAATCCCCGTCTGGTACCGCACCA GGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCTGCTTCTCCAG GTACTTCTACCCCGGAAAGCGGCTCCGCATCTCCA
LCW0403_070_GFP-N_F06.ab1	GSTSESPSGTAPGTST PESGSASPGTSTPESG SASP	GGTTCTACTAGCGGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAG GTACTTCTACTCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGG TACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA

Ejemplo 4: Construcción de segmentos de XTFN_AG36

Se construyó una colección de codones que codificaba secuencias de 36 aminoácidos de longitud. Las secuencias se denominaron XTEN_AG36. Sus segmentos tienen la secuencia de aminoácidos $[X]_3$ donde X es un péptido de 12 monómeros con la secuencia: GTPGSGTASSSP (SEQ ID NO: 31), GSSTPSGATGSP (SEQ ID NO: 32), GSSPSASTGTGP (SEQ ID NO: 33), o GASPGTSSTGSP (SEQ ID NO: 34). El inserto se obtuvo hibridando las siguientes parejas de parejas oligonucleotídicas sintéticas fosforiladas:

AG1for: AGGTACYCCKGGYAGCGGTACYGCWTCTTCYTCTCC (SEQ ID NO: 1644)

AG1rev: ACCTGGAGARGAAGAWGCRGTACCGCTRCCMGGRGT (SEQ ID NO: 1645)

AG2for: AGGTAGCTCTACYCCKTCTGGTGCWACYGGYTCYCC (SEQ ID NO: 1646)

AG2rev: ACCTGGRGARCCRGTWGCACCAGAMGGRGTAGAGCT (SEQ ID NO: 1647)

AG3for: AGGTTCTAGCCCKTCTGCWTCYACYGGTACYGGYCC (SEQ ID NO: 1648)

AG3rev: ACCTGGRCCRGTACCRGTRGAWGCAGAMGGGCTAGA (SEQ ID NO: 1649)

AG4for: AGGTGCWTCYCCKGGYACYAGCTCTACYGGTTCTCC (SEQ ID NO: 1650)

AG4rev: ACCTGGAGAACCRGTAGAGCTRGTRCCMGGRGAWGC (SEQ ID NO: 1651)

También se hibridó el oligonucleótido fosforilado 3KpnIstopperFor: AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC (SEQ ID NO: 1626) y el oligonucleótido no fosforilado pr_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA (SEQ ID NO: 1627). Las parejas oligonucleotídicas hibridadas se ligaron, lo que produjo una mezcla de productos con longitud variable que representa el número variable de repeticiones de 12 monómeros ligadas a un segmento BbsI/KpnI. Los productos correspondientes a la longitud de 36 aminoácidos se aislaron de la mezcla por electroforesis preparativa en gel de agarosa y se ligaron en el vector de relleno pCW0359 digerido con BsaI/KpnI. La mayoría de los clones en la colección resultante denominada LCW0404 mostraban fluorescencia verde después de inducción lo que muestra que la secuencia de XTEN_AG36 se había ligado en el mismo marco con el gen de GFP y la mayoría de secuencias de XTEN_AG36 muestran buena expresión.

Se cribaron 96 aislados de la colección LCW0404 para alto nivel de fluorescencia estampándolos en placa de agar que contenía IPTG. Los mismos aislados se evaluaron por PCR y se identificaron 48 aislados que contenían segmentos con 36 aminoácidos, así como fluorescencia fuerte. Estos aislados se secuenciaron y se identificaron 44 clones que contenían los segmentos de XTEN_AG36 correctos. Los nombres de archivo de las construcciones de nucleótidos y aminoácidos y las secuencias para estos segmentos se enumeran en la tabla 16.

Tabla 16: Secuencias de ADN y aminoácidos para motivos AG de 36 monómeros (SEQ ID NO: 441-528, respectivamente, en orden de aparición)

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0404_001_GFP-N_A07.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATG SP	GGTGCATCCCCGGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCCA GGTACTCCTGGTAGCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCAG GTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_003_GFP-N_B07.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSTPSGATG SP	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAG GTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCAGG TAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_006_GFP-N_C07.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGSSTPSGATG SP	GGTGCATCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAG GTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACCGGCCCAGG TAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCCCCA
LCW0404_007_GFP-N_D07.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGS P	GGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAG GTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACTGGTTCCCCAGG TGCATCCCCTGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_009_GFP-N_E07.ab1	GTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGSRPSASTGT GP	GGTACCCCTGGCAGCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCAG GTGCTTCCCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGG TTCTAGACCTTCTGCATCCACCGGTACTGGTCCA
LCW0404_011_GFP-N_F07.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGS P	GGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAG GTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGG TGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_012_GFP-N_G07.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGS P	GGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCA GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAG GTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCA
LCW0404_014_GFP-N_H07.ab1	GASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGS P	GGTGCATCTCCGGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCAG GTGCATCCCCTGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGG TGCTTCTCCTGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_015_GFP-N_A08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTG SP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCA GGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACTGGTACTGGCCCAG GTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_016_GFP-N_B08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSS P	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAG GTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCCCCAGG TACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCA
LCW0404_017_GFP-N_C08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGS P	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGTTCCCCAG GTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCCCCAGG TGCATCCCCTGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_018_GFP-N_D08.ab1	GTPGSGTASSSPGSSPS ASTGTGPGSSTPSGATG SP	GGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAG GTTCTAGCCCTTCTGCATCTACCGGTACCGGTCCAGG TAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA
LCW0404_023_GFP-N_F08.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASS SP	GGTGCTTCCCCCGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCCAG GTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCCAGG TACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCA

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0404_025_GFP-N_G08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGS P	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAG GTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGG TGCTTCTCCGGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_029_GFP-N_A09.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSASTGTG P	GGTACCCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTCTCTCCAG GTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGG TTCTAGCCCGTCTGCATCTACCGGTACCGGCCCA
LCW0404_030_GFP-N_B09.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGTPGSGTASS SP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAG GTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCTCTCCAG GTACTCCGGGTAGCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCA
LCW0404_031_GFP-N_C09.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGS P	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAG GTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAG GTGCATCCCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_034_GFP-N_D09.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGS P	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAG GTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAG GTGCATCCCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_035_GFP-N_E09.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATG SP	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAG GTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCTCTCCAG GTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGTTCTCCA
LCW0404_036_GFP-N_F09.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSS P	GGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACCGGTACTGGCCAG GTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACTGGTTCCCCAGG TACCCCTGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCA
LCW0404_037_GFP-N_G09.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGSSTPSGATG SP	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAG GTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTTCCCAGG TAGCTCTAGCCCTTCTGGTGCAAGCGGCTCTCCA
LCW0404_040_GFP-N_H09.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGS P	GGTGCATCCCCGGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCA GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAG GTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA
LCW0404_041_GFP-N_A10.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSS P	GGTACCCCTGGTAGCGGTACTGCTTCTTCTCCTCCAG GTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGTTCTCCAGG TACCCCGGGTAGCGGTACCGCATCTTCTCTCCA
LCW0404_043_GFP-N_C10.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGS P	GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACTGGGCCAG GTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCCCCAGG TAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGCTCTCCA
LCW0404_045_GFP-N_D10.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGT GP	GGTGCTTCTCCTGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAG GTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGGTACTGGTCCAGG TTCTAGCCCTTCTGCATCCACTGGTACTGGTCCA
LCW0404_047_GFP-N_F10.ab1	GTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGS P	GGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCAG GTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGG TGCTTCTCCGGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCA

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0404_048_GFP-N_G10.ab1	GSSTPSGATGSPGASPG TSSTGSPGSSTPSGATGS P	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCTCCAG GTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGG TAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA
LCW0404_049_GFP-N_H10.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATG SP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCTCCAG GTACTCCCGGCAAGCGGTACTGCTTCTCCTCCAGG TAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA
LCW0404_050_GFP-N_A11.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTPSGAIG SP	GGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCCAG GTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCAGG TAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA
LCW0404_051_GFP-N_B11.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGAIGS P	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAG GTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCCCCAGG TAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACTGGCTCTCCA
LCW0404_052_GFP-N_C11.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTG SP	GGTGCATCTCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCA GGTACTCCTGGCAGCGGTACTGCATCTTCCTCTCCAG GTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_053_GFP-N_D11.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTG SP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGTTCTCCAG GTTCTAGCCCGTCTGCATCCACTGGTACCGGTCCAGG TGCTTCCCCTGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_057_GFP-N_E11.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTG P	GGTGCATCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCAG GTAGCTCTACTCCGGTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGG TTCTAGCCCTTCTGCATCTACCGGTACCGGTCCA
LCW0404_060_GFP-N_F11.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGS P	GGTACTCCTGGCAGCGGTACCCCATCTTCCTCTCCAG GTAGCTCTACTCCGGTCTGGTGCAACTGGTTCCCCAGG TGCTTCTCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_062_GFP-N_G11.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATG SP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCA GGTACTCCTGGTAGCGGTACCGTCTTCTTCTCCAG GTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCCCCA
LCW0404_066_GFP-N_H11.ab1	GSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTG SP	GGTTCTAGCCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGCCCAG GTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACTGGTCCAGG TGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_067_GFP-N_A12.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSNPSASTGTG P	GGTACCCCGGGTACCGGTACCGCTTCTTCTCCAG GTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGG TTCTAACCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTCCA
LCW0404_068_GFP-N_B12.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGS P	GGTTCTAGCCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCCAG GTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGG TGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_069_GFP-N_C12.ab1	GSSTPSGATGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSS P	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAG GTGCATCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAG GTACTCCGGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTCCTCCA

Nombre de archivo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos
LCW0404_070_GFP-N_D12.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACTCCGGTCTGGTGCAACCGGTTCCCAG GTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCCAGG TAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACTGGCTCTCCA
LCW0404_073_GFP-N_E12.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATG SP	GGTGCTTCTCCTGCACTAGCTCTACCGGTTCTCCAG GTACCCCTGGTAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAGG TAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCCCCA
LCW0404_075_GFP-N_F12.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGT GP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCCCCAG GTTCTAGCCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTCCAGG TTCTAGCCCGTCTGCATCTACTGGTACTGGTCCA
LCW0404_080_GFP-N_G12.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGT GP	GGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAG GTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACTGGTACTGGTCCAGG TTCTAGCCCTTCTGGTTCCACTGGTACTGGTCCA
LCW0404_081_GFP-N_H12.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASS SP	GGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAG GTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCAGG TACCCCTGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCA

Ejemplo 5: Construcción de XTEN_AE864

Se construyó XTEN_AE864 a partir de dimerización en serie de XTEN_AE36 a AE72, 144, 288, 576 y 864. Se construyó un conjunto de segmentos de XTEN_AE72 a partir de 37 segmentos diferentes de XTEN_AE36. Se mezclaron cultivos de *E. coli* que albergaban los 37 segmentos diferentes de 36 aminoácidos y se aisló el plásmido. Esta combinación plasmídica se digirió con BsaI/NcoI para generar el fragmento pequeño como el inserto. La misma combinación plasmídica se digirió con BbsI/NcoI para generar el fragmento grande como el vector. Los fragmentos de inserto y vector se ligaron produciendo una duplicación de la longitud y la mezcla de ligamiento se transformó en células BL21Gold(DE3) para obtener colonias de XTEN_AE72.

Esta colección de segmentos de XTEN_AE72 se denominó LCW0406. Todos los clones de LCW0406 se combinaron y dimerizaron de nuevo usando el mismo proceso que el descrito anteriormente produciendo la colección LCW0410 de XTEN_AE144. Todos los clones de LCW0410 se combinaron y dimerizaron de nuevo usando el mismo proceso que el descrito anteriormente produciendo la colección LCW0414 de XTEN_AE288. Se recogieron aleatoriamente dos aislados LCW0414.001 y LCW0414.002 de la colección y se secuenciaron para verificar las identidades. Todos los clones de LCW0414 se combinaron y dimerizaron de nuevo usando el mismo proceso que el descrito anteriormente produciendo la colección LCW0418 de XTEN_AE576. Se cribaron 96 aislados de la colección LCW0418 para alto nivel de fluorescencia de GFP. Se secuenciaron 8 aislados con los tamaños correctos de insertos por PCR y fluorescencia fuerte y se eligieron 2 aislados (LCW0418.018 y LCW0418.052) para uso futuro basándose en los datos de secuenciación y expresión.

El clon específico pCW0432 de XTEN_AE864 se construyó combinando LCW0418.018 de XTEN_AE576 y LCW0414.002 de XTEN_AE288 usando el mismo proceso de dimerización que el descrito anteriormente.

Ejemplo 6: Construcción de XTEN_AM144

Se construyó un conjunto de segmentos de XTEN_AM144 partiendo de 37 segmentos diferentes de XTEN_AE36, 44 segmentos de XTEN_AF36, y 44 segmentos de XTEN_AG36.

Se mezclaron cultivos de *E. coli* que albergaban los 125 segmentos diferentes de 36 aminoácidos y se aisló el plásmido. Esta combinación plasmídica se digirió con BsaI/NcoI para generar el fragmento pequeño como el inserto. La misma combinación plasmídica se digirió con BbsI/NcoI para generar el fragmento grande como el vector. Los fragmentos de inserto y vector se ligaron produciendo una duplicación de la longitud y la mezcla de ligamiento se transformó en células BL21Gold(DE3) para obtener colonias de XTEN_AM72.

Esta colección de segmentos de XTEN_AM72 se denominó LCW0461. Todos los clones de LCW0461 se combinaron y dimerizaron de nuevo usando el mismo proceso que el descrito anteriormente produciendo la colección LCW0462. Se cribaron 1512 aislados de la colección LCW0462 para la expresión de proteína. Se transfirieron colonias individuales a placas de 96 pocillos y se cultivaron durante una noche como cultivos de partida. Estos cultivos de partida se diluyeron en medio reciente de autoinducción y se cultivaron durante 20-30 h. La expresión se midió usando un lector de placa de fluorescencia con excitación a 395 nm y emisión a 510 nm. Unos 192 aislados mostraron expresión de alto nivel y se enviaron para secuenciación de ADN. La mayoría de clones de la colección LCW0462 mostraron buena expresión y propiedades fisicoquímicas similares que sugieren que la mayoría de combinaciones de segmentos de XTEN_AM36 producen secuencias de XTEN útiles. Se eligieron treinta aislados de LCW0462 como conjunto preferido de segmentos de XTEN_AM144 para la construcción de proteínas multifuncionales que contienen múltiples segmentos de XTEN. Los nombres de archivo de las construcciones de nucleótidos y aminoácidos y las secuencias para estos segmentos se enumeran en la tabla 17.

Tabla 17: Secuencias de ADN y aminoácidos para segmentos AM144 (SEQ ID NO: 529-594, respectivamente, en orden de aparición)

Clon	Secuencia recortada	Secuencia proteínica
LCW462_r1	GGTACCCCGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAGGTAGC TCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACCC CGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTC CTACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTG AGTCTGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCG CTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGCCCAGG TTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACTGGTCCAGGTGCTTCT CCGGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTACCTCTACCGAAC CGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTG AGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTG AAACTCCA	GTPGSGTASSPGS STPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSPAGSP TSTEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GSSPSASTGTGPGS SPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETP
LCW462_r5	GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTA CTAGCGAATCCCCTTCTGGTACCGCACCAGGTACTTCTCCGAG CGGCGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCC GAAGCGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGC AGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGT CCAGGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTA GCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCCAGGTGCTTCCCC GGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCT CCTTCTGCCACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTG GCACTGCACCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCTT CTCCA	GSTSESPSGTAPGST SESPSGTAPGTSPSG FSSTAPGTSTEPSTG SAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGA SPGTSSTGSPGSSTP SGATGSPGASPGTS STGSPGSTSESPSGT APGSTSESPSGTAP GTSTPPSGSASP
LCW462_r9	GGTACTTCTACCGAAGCTTCGGAGGCAGCGCACCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGGCCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCTT CTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGG AGTCCGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCG CACCAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAG GTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCAGGTAGCC CGGCTGGCTCTCCGACCTCCACCGAAGGTGCTTCTCCTG GCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTC TACCGGTACTGGTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACTGGT ACTGGTCCA	GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSES ATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGASPGT SSTGSPGSSPSASTG TGPGSSPSASTGTG P

Clon	Secuencia recortada	Secuencia proteínica
LCW462_r10	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACC TCTGAAAGGGCTACTCCGGAATCTGGTCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCGGAATCCGGTCCAGGTTCTACCAGCGAATCT CCTTCTGGCACTGGTCCAGGTTCTACTAGCGAATCCGCGTCTG GTACCGCACCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGC ACCAGGTGCATCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGT TCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACCGGCCCAGGTAGCTCTA CCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCGTC TGGTGCAACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCT ACTGGCTCCCCAGGTGCATCCCCTGGCACCAGCTCTACCGGTT CTCCA	GSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESPS GTAPGSTSESPSGT APGTSPSGESSTAP GASPGTSSTSGSPGS SPSASTGTGPGSSTPSG SGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGS P
LCW462_r15	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTA GCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACCCC TTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTACTTCTGAAAGGCGCTACC CCGCAATCTGGCCAGGTAGCGAATCCGGCTACTTCTGGTTCT GAAACCCCAGGTAGCGAAGCGGCTACCTCCGGTTCTGAAACT CCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCCGGTCCAGGT ACCTCTACCGAACCGTCCGGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCT ACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGGCTCCAGGTACCTCTACCGAA CCGTCCGAGGGTAGCGGCACCAGGTACCTCTACTGAACCGTCT GAGGGTAGCGGCTCCAGGTAGCGGAACCGGCAACCTCCGGTTCT GAAACTCCA	GASPGTSSTSGSPGS SPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGTSESAT PESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETP
LCW462_r16	GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGC CCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACCGG AACCTTCTGAGGGTAGCGGCACCAGGTACCTCTGAAAGCGCAA CTCCTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCT CTGAGACTCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCTG GTCCAGGTAGCCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGAAG GTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGGTCCAGGTACCTC TACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGC TACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCC GAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCT GAAACTCCA	GTSTTPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEP SFGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPTSGP GSPAGSPTSTLEGT SESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSEPATS GSETPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETP

Clon	Secuencia recortada	Secuencia proteínica
LCW462_r20	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACC TCTACTGAACCTTCCGAGGCCAGCGCTCCAGGTACCTCTACC GAACCTTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTACCGAACCG TCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAG GGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCTTCTGAAGGTAGC GCACCAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCCGCCCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTT CTGGTTCTGAAACCCCAGGTAGCCCCGGCTGGCTCTCCGACCT CCACCGAGGAA	GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAP APGTSTEPSEGSAPGT GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSES ATPESGPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEE
LCW462_r23	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACT TCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCCC CTTCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGG CACCGCAACCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCCGCTTCT CCAGGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCAGGT ACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCTGGCCCAGGTACTTCTA CTGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCAGGTACTTCTACTGAAC CGTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCC CGGAATCGCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACGCCCGGAGT CCGGCCCA	GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGT APGTSTPESGSASP GSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP
LCW462_r24	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTTCTA GCCCGTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACCCC TTCTGGTGCTACTGGTTCTCCAGGTAGCCCTGGCTCTCCG ACTTCTACTGAGGAAGGTAGCCCGGGCTGGTTCTCCGACTTCTA CTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTC CAGGTGCTTCCCCGGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTC TAGCCCTTCTGCACTCTACTGGTACCCAGGTACTCTACCGGGC AGCGGTACTGCTCTTCTCCTCTCCAGGTTCTACTAGCTCTACTG CTGAATCTCCTGGCCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTC TACCGCTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCTGCATCT CCA	GSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAP GASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGSTSSTA ESPGPGTSPSGESST APGTSTPESGSASP

Clon	Secuencia recortada	Secuencia proteínica
LCW462_r27	GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTACT GAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTACTGAACCG TCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCG GAATCCGCGCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCC GGCCCAGGTACTCCTGGCAGCGGTACCCGCTTCTTCTTCTCCAG GTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCTTC TCCGGCACTAGCTCTACTCGTTCTCCAGGTAGCCCTGCTGGC TCTCCGACTTCTACTGAGGAAGGTAGCCCCGGCTGGTTCTCCG ACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGT AGCGCTCCA	GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTE PSFGSAPGTSTEPSF GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP GTPGSGTASSPGA SPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAP
LCW462_r28	GGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGTACT TCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCAGGTACCTCTACT GAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCG TCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCT GAGTCCGGGTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCT CGCCCAGGTACCCCCGGGTAGCGCTACTGCTTCTTCCTCTCCAG GTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTGCTTC TCCGGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTACCTCTACTGAA CCTTCTGAGGGCAGCGCTTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACC CCGGAGTCCGGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGT AGCGCCACCA	GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTE PSFGSAPGTSTEPSF GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP GTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSPGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAP
LCW462_r38	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACTCCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCCGGCCCAGGTACCGAACCG GCTACTTCCGGCTCTGAAACCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTG GTGCAACCGGCTCCCCAGGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCTT CTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTC CCCAGGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGT AGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTGCTTCCC CGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCGAACCTGCTA CTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGA GGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGA AACTCCA	GSPATSGSETPGT SPSATPESGPGSEPA TSGSETPGSSTPSGA TGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSPGSEPATS GSETPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETP

Clon	Secuencia recortada	Secuencia proteinica
LCW462_r39	GGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACC	GTSTEPSEGSAPGT
	TCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCCACCAGGTACTTCTGAA	STEPSEGSAPGTSES
	AGCGCAACACCCTGAATCCGGTCCAGGTAGCCCTGCTGGCTCT	ATPESGPGSPAGSP
	CCGACTTCTACTGAGGAAGGTACTCCCGGCTCTGGTTTCTCCGGACT	TSTEEGSPAGSPTST
	TCTACTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCCGAAGGTAGC	EEGTSTEPSEGSAP
	GCTCCAGGTAGCCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCCACCCGAGGAA	GSPAGSPTSTEEGT
	CGTACCTCTACTGAACCTTCCTGAAGGTAGCGCTCCAGGTACC	STEPSEGSAPGTSTE
	TCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCCTG	PSEGSAPGTASPGTS
	GGCACCAGCCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCCGTCTGCTT	STGSPGSSPSASTGT
	CTACTGGTACTGGTCCAGGTTCTAGCCCCTTCTGCTTCCACTGG	GPGSSPSASTGTGP
	TACTGGTCCA	
LCW462_r41	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTGCTT	GSSTPSGATGSPGA
	CTCCTGGTACTAGCTCTACCCGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCC	SPGTSSTGSPGSSTP
	GTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCA	SGATGSPGSPAGSP
	AGCTCCACCGAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAA	TSTEEGTSESATPES
	TCCGGCCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACC	GPGSTPATSGSETP
	CCAGGTGCATCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTA	GASPGTSSTGSPGS
	GCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTTCTAGCCC	STPSGATGSPGSSPS
	TTCTGCATCTACCGGTACTGGTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCC	ASTGTGPGSTSESPS
	CCTTCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTG	GTAPGSTSESPSGT
	GCACCGCACCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCCGGCTCCGCTT	APGTSTPESGSASP
	CTCCA	
LCW462_r42	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCCAGGTTCTA	GSTSESPSGTAPGST
	CTAGCCGAATCCCCGTCTGGTACCGCACCAGGTACTTCTCCTAG	SESPSGTAPGTSPSG
	CGGCGAATCTTCTACCGCACCAGGTACCTCTGAAAGCGCTAC	ESSTAPGTSESATPE
	TCCGGAGTCTGGCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTCGAGCGG	SGPGTSTEPSEGSAP
	TAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGC	GTSTEPSEGSAPGT
	ACCAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGCAGCGCTCCAGG	STEPSEGSAPGTSES
	TACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCCAGGTACTTCT	ATPESGPGTSTEPSE
	ACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACTACTACGCT	GSAPGSSTPSGATG
	TCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCT	SPGASPGTSSTGSP
	CTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGG	GSSTPSGATGSP
	CTCTCCA	

Clon	Secuencia recortada	Secuencia proteínica
LCW462_r43	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGCCCAGGTACCT CTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACTTCTCCGAG CGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCT GAATCTCCGGGTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTC CTGGCCCAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTCC AGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTTCT ACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTACTTCTACCC CGGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCAGGTTCTACCAGCTCTACCG CTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGG CACCGCACCAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCA CCA	GSTSSTAESPGPGTS PSGESSTAPGTSPSG ESSTAPGSTSSTAES PGPGSTSSTAESPGP GTSTPESGSASPGTS PSGESSTAPGSTSST AESPGPGTSTPESGS ASPGSTSSTAESPGP GSTSESPSGTAPGTS PSGESSTAP
LCW462_r45	GGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCATCTCCAGGTTCTA CCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCACCAGGTTCTACTAGCT CTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTACCTCTACTGAACCTTC CGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGG CAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGG TCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCCAGG TACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACTTCT ACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGC GCTACTCCGGAGTCCGGTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCC GAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGT AGCGCTCCC	GTSTPESGSASPGST SESPSGTAPGSTSST AESPGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAP
LCW462_r47	GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTACC TCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCG GCAACCTCCGGTTCTGAAACTCCAGGTACTTCTACTGAACCGT CTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGG AATCCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCG GCCCAGGTGCATCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAG GTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACCGGCCCAGGTAGCTC TACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCG TCTGGTGCAACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTG CTACTGGCTCCCCAGGTGCATCCCCTGGCACCAGCTCTACCG GTTCTCCA	GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP GASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGS P

Clon	Secuencia recortada	Secuencia proteínica
LCW462_r54	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACTCCAGGTAGC	GSEPATSGSETPGS
	GAACCTGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCCAGGTACTTCTACT	EPATSGSETPGTSTE
	GAACCTTCTGAGGGCAGCGCACCAGGTAGCGAACCTGCAACC	PSFGSAPGSFPATS
	TCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCT	GSETPGTSESATPES
	GAATCTGGCCCCAGGTACTTCTACTGAACGGTCCGAGGGCAGC	GPGTSTEPSEGSAP
	GCACCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAG	GSSTPSGATGSPGS
	GTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCCAGGTGCTTC	STPSGATGSPGASP
	TCCGGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTCTACCCCG	GTSSTGSPGSSTPSG
	TCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTACTAGCT	ATGSPGASPGTSST
	CTACCCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGG	GSPGSSTPSGATGS
	CTCTCCA	P
LCW462_r55	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGCCAGCGCTCCAGGTACT	GTSTEPSEGSAPGT
	TCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG	STEPSEGSAPGTSTE
	AACCTTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCTA	PSEGSAPGTSESATP
	CTCCGGAGTCCGGTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAAG	ESGPGTSTEPSEGS
	GCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGG	APGTSTEPSEGSAP
	CTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTCTGGCACTGCTCCAGG	GSTSESPSGTAPGTS
	TACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACTTCTCC	PSGESSTAPGTSPSG
	CCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCAGGTAGCCCGGCTGGC	ESSTAPGSPAGSPTS
	TCTCCTACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTC	TLEGTSESATPESGP
	CTGAGTCTGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTA	GTSTEPSEGSAP
	GCGCTCCA	
LCW462_r57	GGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGC	GTSTEPSEGSAPGS
	GAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCAGGTAGCCCGGCT	EPATSGSETPGSPA
	GGCTCTCCGACCTCCACCGAGGAAGGTAGCCCGGCAGGCTCT	GSPTSTEEGSPAGSP
	CCTGACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCG	TSTEEGTSESATPES
	GAGTCCGGTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGC	GPGTSTEPSEGSAP
	GCACCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCA	GTSTEPSEGSAPGT
	GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCAGGTACT	STEPSEGSAPGTSES
	TCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCAGGTAGCTCTACT	ATPESGPGSSTPSG
	CCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTT	ATGSPGSSPSASTG
	CCACTGGTACTGGCCCAGGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTA	TGPGASPGTSSTGS
	CTGGTTCTCCA	P

Clon	Secuencia recortada	Secuencia proteínica
LCW462_r61	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAGACTCCAGGTAGC CCTGCTGGCTCTCCGACCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAA AGCGCTACCCCTGAGGTCTGGCCCAGGTACCTCTACTGAACCTT CCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCCTCGAAGCG GCAGCGCACCAGGTACTTCCTGAAAGCGCAACCCCTCGAATCCCG GTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGGATCTCCAG GTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCACCAGGTTCTA CTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTACTTCTGAAA GCGCTACTCCGGAGTCCGGTCCAGGTACCTCTACCGAACCGT CCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGG GTAGCGCTCCA	GSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPTSGP GTSTPESGSASPGST SESPSGTAPGSTSST AESPGPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAP
LCW462_r64	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACT TCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACCTCTACCGAACCGT CTGAAGGTAGCGCACCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTG AGTCCGGTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGATCTCG GCCCAGGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAG GTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACTGGTCCCCAGGTGCTTC TCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCCACCAGCTCT ACTGCTGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCTTCCTAGCGGTGAAT CTTCTACTGCTCCAGGTACTTCTACTCCTGAAAGCGGCTCTGC TTCTCCA	GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTE PSFGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP GTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSPGSTSSTA ESPGPGTSPSGESST APGTSTPESGSASP
LCW462_r67	GGTAGCCCCGGCAGCCTCTCCGACCTCTACTGAGGAAGGTACT TCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCCAGGTACCTCTACC GAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCA ACCCCTGAATCCGGTCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGC TCTGAGACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTTCCGAAGGTAGC GCACCAGGTAGCCCCGCCTGGTTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACC TCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACC GAAGCGTTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCT TCTGAAGCGCACCCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAA GGTAGCGCACCA	GSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSTE PSFGSAPGTSPSAPP ESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAP

Clon	Secuencia recortada	Secuencia proteínica
LCW462_r69	GGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACGCGCACCAGGTTCTA CTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTACTTCTCCGAG CGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTGAAAGCGGCTACT CCGGAGTCTGGCCCAGGTACCTCTACTGAACCGCTCTGAGCGGT AGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCCCGCA CCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCCAGGTA GCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTGCTTCTCC GGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTACTTCTACTCCGGAA AGCGGTTCCGCATCTCCAGGTACTTCTCCTAGCGGGAATCTT CTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGC TCCA	GTSPSGESSTAPGST SSTAESPGPGTSPSG FSSTAPGTSFSATPF SGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSS PSASTGTGPGSSTPS GATGSPGASPGTSS TGSPGTSTPESGSAS PGTSPSGESSTAPGT SPSGTESSTAP
LCW462_r70	GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCCAGGTACC TCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG AACCGTCCGAAGGTAGCGCCACCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTC CGACTTCTACTGAGGAAGGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTT CTACTGAGGAAGGTACTTCTACCGAAGCCTTCCGAAGGTAGCG CTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACTGGCCCAGG TAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCCCCAGGTAGCTCT ACTCCTTCTGGTGCAACTGGCTCTCCAGGTAGCCGAACCGGCA ACTTCCGGCTCTGAAACCCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACT CCTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCTGGCTCT GAAACCCCA	GTSTESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTST FEGTSTEPSEGSAP GSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSEPATS GSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETP
LCW462_r72	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGCCAGCGCTCCAGGTACC TCTACTGAACCTTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACC GAACTTTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTAGCTCTACCCCGTCT GGTGCTACCGGTTCCCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTA CCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTC TCCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCCGTCCAGG TAGCGAACCGGCTACTTCTGGCTCTGAGACTCCAGGTACTTCT ACCGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTTCTACTAGCGAA TCTCCTTCTGCCACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGT CTGGCACTGCACCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCG CTTCTCCA	GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSSTPSG ATGSPGASPGTSST GSPGSSTPSGATGS PGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGT APGTSTPESGSASP

Clon	Secuencia recortada	Secuencia proteínica
LCW462_r73	GGTACCTCTACTCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCAGGTTCCA CTAGCTCTACCGGCAGAATCTCCGGGCCCCAGGTTCTACTAGCTC TACTGCTGAATCTCCTGGCCCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCT ACTGGTACTGGCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCG GCTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCC AGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCCAGGTAC CTCTGAAAAGCGCTACTCCTGAATCCTGCCCAGTTACGCCCGC AGGTTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGTTCTACTAGCGAATC TCCTTCTGCACACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCT GGCACTGCACCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCT TCTCCC	GTSTPESGSASPGST SSTAESPGPGSTSST AESPGPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSP GSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSTSESP SGTAPGSTSESPSGT APGTSTPESGSASP
LCW462_r78	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGAAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCCTGGTCCAGGTACCTCTACTG AACCGTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCC CTTCTGGCACCGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCCGCCGTCTGG TACCGCACCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCA CCAGGTACCTCTACCGAAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGT AGCCCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCT ACCGAACCTTCTGAGGGTAGCGCACCAGGTAGCGAACCTTCA ACCTCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACT CCTGAATCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGC AGCGCACCA	GSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSTE PSFGSAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGT APGTSPSGESSTAP GTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGSEPATSG SETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAP
LCW462_r79	GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGC CCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACCGG AACCTTCTGAGGGTAGCGCACCAGGTACCTCCCTAGCGGCG AATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTC TACCGCTCCAGGTACCTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCA CCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGTACCTCCAGGTT CTACCAGCCGAATCCCCTTCTGGCACCGCACCAGGTACTTCTAC CCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCAGGTAGCGAACCTGCAAC CTCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCT GAATCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGC GCACCA	GTSTTPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSPSGESS TAPGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGST SESPSGTAPGSTSES PSGTAPGTSTPESGS ASPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAP

Clon	Secuencia recortada	Secuencia proteínica
LCW462_r87	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACC TCTGAAAGCGCTACTCCCGAATCTGGTCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCGGAATCCCGGTCCAGGTACTTCTCCGAAGCCGGT GAATCTTCTACCGCACCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAAT CTCCGGGCCCAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGC TCCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTAGTGCTCCAGGT ACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGGTCTCCAGGTTCTACCA GCTCTACCCGCAGAATCTCCCGGGTCCAGGTAGCTCTACTCCGTC TGGTGCAACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCA ACCGGCTCCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAAACTGG CTCTCC	GSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSES ATPESGPGTSPSGES STAPGSTSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGS TSESPSGTAPGTSPS GESSTAPGSTSSTA ESPGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGANWLS
LCW462_r88	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGAAGGTAGC CCGGCTGGTTCTCCGGACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTACCG AACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTT CCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGG GCAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCG GTCCAGGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGG TAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTGCTTCC CCGGGTACCAGCTCTACCCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGT CTGGTGCTACTGCTTCTCCAGGTACTCCCGGCAGCCGGTACTG CTTCCTCCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGG CTCTCCA	GSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTEP SPGSAPGTSTEPSP GSAPGTSTEPSPGS APGTSESATPESGP GASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSP
LCW462_r89	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCTCCAGGTACTC CGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCC TTCTGGTGCTACTGCTCTCCAGGTAGCCCCGGCTGGCTCTCCT ACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAG TCTGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCT CCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCTGGCCCAGGT AGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAGACTCCAGGTACCTCT GAAAGCGCAACCCCGGAATCTGGTCCAGGTACTTCTACTGAA CCGTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACC CCGGAATCCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAG TCCGGCCA	GSSTPSGATGSPGT PGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSPAGSP TSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP

Ejemplo 7: Construcción de XTEN_AM288

La colección LCW0462 completa se dimerizó como se describe en el ejemplo 6 produciendo una colección de clones de XTEN_AM288 denominada LCW0463. Se cribaron 1512 aislados de la colección LCW0463 usando el protocolo descrito en el ejemplo 6. Se secuenciaron 176 clones de alta expresión y se eligieron 40 segmentos de XTEN_AM288 preferidos para la construcción de proteínas multifuncionales que contienen múltiples segmentos de XTEN con 288 residuos aminoacídicos.

Ejemplo 8: Construcción de XTEN_AM432

Se generó una colección de segmentos de XTEN_AM432 recombinando segmentos de la colección LCW0462 de segmentos de XTEN_AM144 y segmentos de la colección LCW0463 de segmentos de XTEN_AM288. Esta nueva colección de segmentos de XTEN_AM432 se denominó LCW0464. Los plásmidos se aislaron de cultivos de *E. coli* que albergaban LCW0462 y LCW0463, respectivamente. Se cribaron 1512 aislados de la colección LCW0464 usando el protocolo descrito en el ejemplo 6. Se secuenciaron 176 clones de alta expresión y se eligieron 39 segmentos de XTEN_AM432 preferidos para la construcción de XTEN más largos y para la construcción de proteínas multifuncionales que contienen múltiples segmentos de XTEN con 432 residuos aminoacídicos.

En paralelo, se construyó la colección LMS0100 de segmentos de XTEN_AM432 usando segmentos preferidos de XTEN_AM144 y XTEN_AM288. El cribado de esta colección produjo 4 aislados que se seleccionaron para construcción adicional.

Ejemplo 9: Construcción de XTEN_AM875

El vector de relleno pCW0359 se digirió con BsaI y KpnI para eliminar el segmento de relleno y el fragmento del vector resultante se aisló por purificación en gel de agarosa.

Se hibridó el oligonucleótido fosforilado BsaI-AscI-KpnIforP: AGGTGCAAGCGCAAGCGGCGCGCCAAGCACGGGAGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC (SEQ ID NO: 1652) y el oligonucleótido no fosforilado BsaI-AscI-KpnIrev: CCTCGAGTGAAGACGAACCTCCCGTGCTTGGCGCGCCGCTTGCGCTTGC (SEQ ID NO: 1653) para introducir la isla de secuenciación A (SI-A) que codifica los aminoácidos GASASGAPSTG (SEQ ID NO: 1654) y tiene dentro la secuencia GGCGCGCC de nucleótidos de reconocimiento de la enzima de restricción AscI. Las parejas oligonucleotídicas hibridadas se ligaron con vector de relleno pCW0359 digerido con BsaI y KpnI preparado anteriormente para producir pCW0466 que contenía SI-A. Después se generó una colección de segmentos de XTEN_AM443 recombinando 43 segmentos de XTEN_AM432 preferidos del ejemplo 8 y segmentos de SI-A de pCW0466 en el extremo C usando el mismo proceso de dimerización descrito en el ejemplo 5. Esta nueva colección de segmentos de XTEN_AM443 se denominó LCW0479.

Se generó una colección de segmentos de XTEN_AM875 recombinando segmentos de la colección LCW0479 de segmentos de XTEN_AM443 y 43 segmentos de XTEN_AM432 preferidos del ejemplo 8 usando el mismo proceso de dimerización descrito en el ejemplo 5. Esta nueva colección de segmentos de XTEN_AM875 se denominó LCW0481.

Ejemplo 10: Construcción de XTEN_AM1318

Se hibridó el oligonucleótido fosforilado BsaI- FseI-KpnIforP: AGGTCCAGAACCAACGGGGCCGGCCCCAAGCGGAGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC (SEQ ID NO: 1655) y el oligonucleótido no fosforilado BsaI-FseI-KpnIrev: CCTCGAGTGAAGACGAACCTCCGCTTGGGGCCGGCCCCGTTGGTTCTGG (SEQ ID NO: 1656) para introducir la isla de secuenciación B (SI-B) que codifica los aminoácidos GPEPTGPAPSG (SEQ ID NO: 1657) y tiene dentro la secuencia GGCCGGCC de nucleótidos de reconocimiento de la enzima de restricción FseI. Las parejas oligonucleotídicas hibridadas se ligaron con vector de relleno pCW0359 digerido con BsaI y KpnI que se usó en el ejemplo 9 para producir pCW0467 que contenía SI-B. Después se generó una colección de segmentos de XTEN_AM443 recombinando 43 segmentos de XTEN_AM432 preferidos del ejemplo 8 y segmentos de SI-B de pCW0467 en el extremo C usando el mismo proceso de dimerización descrito en el ejemplo 5. Esta nueva colección de segmentos de XTEN_AM443 se denominó LCW0480.

Se generó una colección de segmentos de XTEN_AM1318 recombinando segmentos de la colección LCW0480 de segmentos de XTEN_AM443 y segmentos de la colección LCW0481 de segmentos de XTEN_AM875 usando el mismo proceso de dimerización que en el ejemplo 5. Esta nueva colección de segmentos de XTEN_AM1318 se denominó LCW0487.

Ejemplo 11: Construcción de XTEN_AD864

Usando las varias rondas consecutivas de dimerización, se ensambló un conjunto de secuencias de XTEN_AD864 partiendo de segmentos de XTEN_AD36 enumerados en el ejemplo 1. Estas secuencias se ensamblaron como se describe en el ejemplo 5. Se evaluaron varios aislados de XTEN_AD864 y se descubrió que mostraban buena expresión y excelente solubilidad en condiciones fisiológicas. Se secuenció una construcción intermedia de XTEN_AD576. Este clon se evaluó en un experimento de PK en macacos y se midió una semivida de aproximadamente 20 h.

Ejemplo 12: Construcción de XTEN_AF864

Usando las varias rondas consecutivas de dimerización, se ensambló un conjunto de secuencias de XTEN_AF864 partiendo de segmentos de XTEN_AF36 enumerados en el ejemplo 3. Estas secuencias se ensamblaron como se describe en el ejemplo 5. Se evaluaron varios aislados de XTEN_AF864 y se descubrió que mostraban buena expresión y excelente solubilidad en condiciones fisiológicas. Se secuenció una construcción intermedia de XTEN_AF540. Este clon se evaluó en un experimento de PK en macacos y se midió una semivida de aproximadamente 20 h. Un clon de longitud completa de XTEN_AF864 tenía excelente solubilidad y mostraba semivida que excedía de 60 h en macacos. Se ensambló un segundo conjunto de secuencias de XTEN_AF que incluían una isla de secuenciación como se describe en el ejemplo 9.

Ejemplo 13: Construcción de XTEN_AG864

Usando las varias rondas consecutivas de dimerización, se ensambló un conjunto de secuencias de XTEN_AG864 partiendo de los segmentos de XTEN_AD36 enumerados en el ejemplo 1. Estas secuencias se ensamblaron como se describe en el ejemplo 5. Varios aislados de XTEN_AG864 se evaluaron y se descubrió que mostraban buena expresión y excelente solubilidad en condiciones fisiológicas. Un clon de longitud completa de XTEN_AG864 tenía excelente solubilidad y mostró semivida que excedía de 60 h en macacos.

Ejemplo 14: Métodos de producción y evaluación de CFXTEN con XTEN internos y terminales

El diseño, construcción y evaluación de CFXTEN que comprende FVIII y uno o más XTEN se consigue usando una estrategia sistemática. Las regiones adecuadas para los sitios de inserción de XTEN incluyen, aunque sin limitación, regiones en o proximales a los límites de los dominios conocidos de FVIII, los límites de los exones, los bucles superficiales conocidos, las regiones con un bajo grado de orden y las regiones hidrófilas. Mediante el análisis de los anterior, se han identificado diferentes regiones entre la secuencia de la secuencia con el dominio B eliminado (BDD) de FVIII como sitios de inserción para XTEN, cuyos ejemplos no limitantes se enumeran en las tablas 5-8, y se muestran esquemáticamente en las FIG. 8 y 9. Inicialmente, se crean construcciones individuales (usando métodos descritos a continuación) en que el ADN que codifica un solo XTEN o fragmento de XTEN de una longitud que varía de 6 a 2004 residuos aminoacídicos se inserta en la secuencia de FVIII correspondiente a o cerca de (por ejemplo, en 6 aminoácidos) cada uno de los sitios de inserción individuales identificados en la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9, y las construcciones resultantes se expresan y la proteína recuperada entonces se evalúa para sus efectos sobre la retención de la actividad procoagulante usando, por ejemplo, uno de los ensayos *in vitro* de la tabla 49. Por ejemplo, usando los métodos descritos a continuación, se preparan construcciones en que una secuencia de XTEN se inserta dentro de las secuencias de dominio A1, A2, B, A3, C1 y C2 de FVIII, así como unido al extremo C, y las proteínas de fusión expresadas resultantes se evalúan en un ensayo cromogénico de la tabla 49, en comparación con un FVIII no unido a XTEN. Las proteínas de fusión de CFXTEN pueden clasificarse además en función de categorías altas, intermedias y bajas basadas en las actividades que muestran. En aquellos casos donde la CFXTEN muestra actividad que es comparable o moderadamente reducida en comparación con FVIII, el sitio de inserción se considera favorable. En aquellos casos donde la actividad es intermedia, el sitio de inserción puede ajustarse de 1-6 aminoácidos hacia el extremo N o C del sitio de inserción y/o la longitud o carga neta del XTEN puede alterarse y la una o más construcciones resultantes pueden volver a evaluarse para determinar si su actividad se mejora. Como alternativa, el XTEN se inserta en la construcción con sitios de escisión flanqueantes; preferiblemente sitios que son susceptible a escisión por proteasas encontradas en ensayos de coagulación, de modo que el XTEN se libere durante la activación del componente de FVIII, proporcionando de ese modo información adicional sobre la idoneidad del sitio de inserción de XTEN en la proteína de fusión.

Una vez evaluados todos los sitios de inserción individuales e identificados los sitios de inserción favorables, se crean colecciones de construcciones con dos, tres, cuatro, cinco o más XTEN insertados en las permutaciones de sitios favorables. La longitud y carga neta del XTEN (por ejemplo, XTEN de la familia AE frente a AG) se varían para averiguar los efectos de estas variables sobre la actividad de FVIII y las propiedades fisicoquímicas de la proteína de fusión. Las construcciones de CFXTEN que retienen un grado deseado de actividad de FVIII procoagulante *in vitro* se evalúan entonces *in vivo* usando modelos de ratón y/o de perro de hemofilia A, como se describe en ejemplos a continuación, u otros modelos conocidos en la técnica. Además, las construcciones se ensayan en presencia de inhibidores de FVIII y otros anticuerpos anti-FVIII para determinar las construcciones que retienen la actividad. Además, se preparan construcciones de CFXTEN que incorporan secuencias de escisión en o cerca de la una o más uniones de FVIII y XTEN (por ejemplo, secuencias de la tabla 8) diseñadas para liberar el XTEN y se evalúan para la potenciación de la actividad de FVIII y los efectos sobre la semivida terminal. Mediante el proceso iterativo de

preparación de construcciones que combinan diferentes sitios de inserción, variando la longitud y las cualidades de la composición del XTEN (por ejemplo, diferentes familias de XTEN), y evaluación, los expertos en la materia obtienen, mediante los métodos anteriores, CFXTEN con propiedades deseadas, tales como, aunque sin limitación, actividad de FVIII procoagulante, unión reducida con inhibidores de FVIII, propiedades farmacocinéticas potenciadas, capacidad de administración a un sujeto por diferentes vías y/o propiedades farmacéuticas potenciadas.

Ejemplo 15: Métodos de producción y evaluación de CFXTEN que contiene FVIII y AE_XTEN

Se presenta un esquema general para producir y evaluar composiciones de CFXTEN en la FIG. 15, y forma la base para la descripción general de este ejemplo. Usando los métodos divulgados y los conocidos por los expertos en la materia, junto con directrices proporcionadas en los ejemplos ilustrativos, un experto en la materia puede crear y evaluar proteínas de fusión de CFXTEN que comprenden XTEN y FVIII o variantes de FVIII conocidas en la técnica. El ejemplo es, por lo tanto, para interpretarse como meramente ilustrativo, y no limitante de los métodos de ninguna manera en absoluto; serán evidentes numerosas variaciones para los expertos en la materia. En este ejemplo, se crea una CFXTEN de un factor VIII BDD unido a un XTEN de la familia AE de motivos.

El esquema general para producir polinucleótidos que codifican XTEN se presenta en las FIG. 11 y 12. La FIG. 14 es un diagrama de flujo esquemático de las etapas representativas en el ensamblaje de una construcción polinucleotídica de XTEN en una de los aspectos de la enseñanza. Los oligonucleótidos individuales **501** se hibridan en motivos de secuencia **502** tal como un motivo de 12 aminoácidos ("oligómero de 12 monómeros"), que se liga a motivos de secuencia adicionales de una colección que puede multimerizar para crear una combinación que abarca la longitud deseada del XTEN **504**, así como se liga a una concentración más pequeña de un oligo que contiene los sitios de restricción BbsI y KpnI **503**. Las colecciones de motivos incluyen familias de XTEN de secuencia específica; por ejemplo, las secuencias AD, AE, AF, AG, AM o AQ de la tabla 3. Como se ilustra en la FIG. 14, la longitud del XTEN, en este caso, es de 36 residuos aminoacídicos, pero también se consiguen longitudes más largas mediante este proceso general. Por ejemplo, la multimerización se realiza por ligamiento, prolongación solapante, ensamblaje por PCR o técnicas de clonación similares conocidas en la técnica que, en este caso, producen una construcción con 288 residuos aminoacídicos. La combinación resultante de productos de ligamiento se purifica en gel y la banda con la longitud deseada de XTEN se corta, produciendo un gen de XTEN aislado con una secuencia de tope **505**. El gen de XTEN puede clonarse en un vector de relleno. En este caso, el vector codifica una secuencia de CBD opcional **506** y un gen de GFP **508**. La digestión entonces se realiza con BbsI/HindIII para eliminar **507** y **508** y colocar el codón de parada. El producto resultante se clona entonces en un vector digerido con BsaI/HindIII que contiene un gen que codifica el FVIII, produciendo el gen **500** que codifica una proteína de fusión de CFXTEN con un XTEN de 288 aminoácidos unido al extremo C del factor VIII. Como sería evidente para un experto en la materia, los métodos se aplican para crear construcciones en configuraciones alternativas y con longitudes variables de XTEN o en múltiples ubicaciones.

Las secuencias de ADN que codifican FVIII se obtienen convenientemente por procedimientos convencionales conocidos en la técnica a partir de una colección de ADNc preparada a partir de una fuente celular apropiada, a partir de una colección genómica o pueden crearse sintéticamente (por ejemplo, síntesis automatizada de ácidos nucleicos) usando secuencias de ADN obtenidas de bases de datos disponibles al público, patentes o referencias de la bibliografía. En el presente ejemplo, se prepara una variante de FVIII con el dominio B eliminado (BDD) como se describe en el ejemplo 17. Un gen o polinucleótido que codifica la parte de FVIII de la proteína o su complemento se clona entonces en una construcción, tales como las descritas en la presente memoria, que pueden ser un plásmido u otro vector bajo el control de secuencias apropiadas de transcripción y traducción para expresión de proteínas de alto nivel en un sistema biológico. Un segundo gen o polinucleótido para la parte de XTEN o su complemento se fusiona genéticamente a los nucleótidos que codifican el extremo del gen de FVIII clonándolo en la construcción adyacente o en el mismo marco con el gen que codifica el CF, mediante una etapa de ligamiento o multimerización. De esta manera, una molécula de ADN quimérica que codifica (o es complementaria a) la proteína de fusión de CFXTEN se genera dentro de la construcción. Opcionalmente, un gen que codifica un segundo XTEN se inserta y se liga en el mismo marco internamente a los nucleótidos que codifican la región codificante de FVIII. Las construcciones se diseñan en diferentes configuraciones para que codifiquen diversos sitios de inserción del XTEN en la secuencia de FVIII, incluyendo aquellos de la tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8 y tabla 9 o aquellos ilustrados en las FIG. 8-9. Opcionalmente, esta molécula de ADN quimérica se transfiere o clona en otra construcción que es un vector de expresión más apropiado; por ejemplo, un vector apropiado para una célula hospedadora de mamífero tal como CHO, BHK y similares. En este punto, una célula hospedadora que puede expresar la molécula de ADN quimérica se transforma con la molécula de ADN quimérica, descrito más completamente a continuación, o por métodos bien conocidos, dependiendo del tipo de hospedador celular, como se describe *supra*.

Las células hospedadoras que contienen el vector de expresión de XTEN-FVIII se cultivan en medio nutriente convencional modificado según lo apropiado para activar el promotor. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para la expresión y serán evidentes para los expertos en la materia. Después de la expresión de la proteína de fusión, el caldo de cultivo se recoge y se separa de la masa celular y el extracto crudo resultante se retiene para la purificación de la proteína de fusión.

La expresión génica se mide en una muestra directamente, por ejemplo, por transferencia de Southern convencional, transferencia de Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], transferencia puntual (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente memoria. Como alternativa, la expresión génica se mide por métodos inmunológicos de fluorescencia, tales como tinción inmunohistoquímica de células para cuantificar directamente la expresión de producto génico. Los anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o ensayos de líquidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse frente al polipéptido de secuencia de FVIII usando un péptido sintético basado en las secuencias proporcionadas en la presente memoria o frente a secuencia exógena fusionada a FVIII y que codifica un epítopo de anticuerpo específico. Ejemplos de marcadores de selección son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen indicadores tales como proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), beta-galactosidasa (β-gal) o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT).

El producto polipeptídico de CFXTEN se purifica mediante métodos conocidos en la técnica. Procedimientos tales como filtración en gel, purificación por afinidad, fraccionamiento salino, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía por adsorción en hidroxiapatita, cromatografía de interacción hidrófoba o electroforesis en gel son todos técnicas que pueden usarse en la purificación. Se describen métodos específicos de purificación en Robert K. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Charles R. Castor, ed., Springer-Verlag 1994, y Sambrook, *et al., supra.* También se describen separaciones por purificación de múltiples etapas en Baron, *et al*., Crit. Rev. Biotechnol. 10:179-90 (1990) y Below, *et al*., J. Chromatogr. A. 679:67-83 (1994).

Como se ilustra en la FIG. 15, las proteínas de fusión de CFXTEN aisladas se caracterizan por sus propiedades químicas y de actividad. Una proteína de fusión aislada se caracteriza, por ejemplo, por la secuencia, la pureza, el peso molecular aparente, la solubilidad y la estabilidad usando métodos convencionales conocidos en la técnica. La proteína de fusión que cumple las normas esperadas se evalúa para la actividad, que puede medirse *in vitro* o *in vivo* midiendo uno de los parámetros asociados con el factor VIII descritos en la presente memoria, usando uno o más ensayos divulgados en la presente memoria, o usando los ensayos de los ejemplos o la tabla 49.

Además, la proteína de fusión de FVIII de CFXTEN se administra a una o más especies animales para determinar los parámetros farmacocinéticos convencionales y las propiedades farmacodinámicas, como se describe en los ejemplos 25 y 26.

Mediante el proceso iterativo de producción, expresión y recuperación de construcciones de CFXTEN, seguido de su caracterización usando métodos divulgados en la presente memoria u otros conocidos en la técnica, las composiciones de CFXTEN que comprenden CF y un XTEN se producen y evalúan para confirmar las propiedades esperadas tales como solubilidad potenciada, estabilidad potenciada, farmacocinética mejorada e inmunogenia reducida, que da lugar a una actividad terapéutica potenciada global en comparación con el FVIII no fusionado correspondiente. Para aquellas proteínas de fusión que no poseen las propiedades deseadas, se construye una secuencia o configuración diferente, se expresa, se aísla y se evalúa por estos métodos para obtener una composición con dichas propiedades.

Ejemplo 16: Construcción de plásmidos de expresión para BDD FVIII

I. Construcción de vectores de expresión de FVIII con el dominio B eliminado (BDD FVIII)

El vector de expresión que codifica BDD FVIII se creó clonando el marco abierto de lectura de BDD FVIII en el vector pcDNA4 (Invitrogen, CA) que contenía una poliA para permitir la expresión óptima en mamíferos del gen de FVIII, produciendo una construcción denominada pBC0100. Se identificaron varios sitios naturales dentro de esta construcción para uso en clonación, incluyendo BsiWI 48, AflII 381, PshAI 1098, KpnI 1873, BamHI 1931, PflMI 3094, ApaI 3574, XbaI 4325, NotI 4437, XhoI 4444, BstEII 4449, AgeI 4500, PmeI 4527. Para facilitar el desarrollo del ensayo, se introdujeron los nucleótidos que codifican la marca de Myc e His en el marco abierto de lectura de FVIII. El pBC0100 se amplificó por PCR usando los siguientes cebadores: 1) F8-BsiWI-F: tattccCGTACGgccgccaccATGCAAATAGAGCTCTCCACCT (SEQ ID NO: 1658); 2) F8-nostop-XhoI-R1: GGTGACCTCGAGcgtagaggtcctgtgcctcg (SEQ ID NO: 1659) para introducir BsiWI y XhoI en ubicaciones apropiadas. El producto de PCR se digirió con BsiWI y XhoI. PcDNA4-Myc-His/C se digirió con Acc65I y XhoI, que generó dos productos de 5003 y 68 pb. El producto de 5003 pb se ligó con el fragmento de FVIII de PCR digerido y se usó para transformación de DH5alfa. Las enzimas Acc65I y BsiWI crean extremos compatibles, pero su ligamiento destruye el sitio para futuras digestiones. La construcción resultante se denominó pBC0102 (pcDNA4-FVIII_3-Myc-His). Para facilitar el diseño y la ejecución de futuras estrategias de clonación, especialmente las que implican la creación de construcciones de expresión de BDD FVIII que contienen múltiples inserciones de XTEN, se seleccionaron sitios adicionales de enzimas de restricción únicas para incorporación, incluyendo BsiWI 908, NheI 1829 y ClaI 3281. La introducción de estos sitios se hizo mediante el método QuikChange (Agilent, CA) individualmente. La construcción resultante se denominó pBC0112 (pcDNA4-FVIII_4-Myc-His). Para evitar problemas que pueden surgir de los péptidos conectores que conectan entre Myc/His y FVIII/Myc, y para eliminar sitios de enzimas de restricción que se prefieren para futura inserción de XTEN, se mutaron las secuencias que codifican las secuencias peptídicas de ARGHPF (SEQ

ID NO: 1660) en GAGSPGAETA (SEQ ID NO: 178) (entre FVIII y Myc), NMHTG (SEQ ID NO: 1661) en SPATG (SEQ ID NO: 1662) (entre Myc e His) mediante el método QuikChange. La construcción se denominó pBC0114 (pcDNA4-FVIII_4-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His ('GAGSPGAETA' y 'SPATG' divulgadas como las SEQ ID NO: 178 y 1662, respectivamente)) (secuencia en la tabla 21), que se usó como vector fundamental para el diseño y la creación de otros vectores de expresión que incorporan secuencias de XTEN. La expresión y los datos de actividad de FVIII para esta construcción se presentan en

II. Construcción de vectores de expresión de FVIII con el dominio B eliminado (BDD FVIII)

El gen que codifica BDD FVIII se sintetiza por GeneArts (Regensburg, Alemania) en el vector de clonación pMK (pMK-BDD FVIII). Las proteínas BDD FVIII contienen 1457 aminoácidos en un peso molecular total de 167 539,66. Hay 6 dominios dentro de la proteína de FVIII de tipo silvestre, los dominios A1, A2, B, A3, C1 y C2. En la proteína de BDD FVIII, la mayor parte del dominio B se ha eliminado ya que mostró ser un dominio no estructurado y la eliminación del dominio no altera las funciones cruciales de esta proteína. El vector pMK usado por GeneArts no contiene promotor, y no puede usarse como vector de expresión. Los sitios para las enzimas de restricción NheI en el extremo 5' y SfiI, SalI y XhoI en el extremo 3' se introducen para facilitar la subclonación de la secuencia de ADN que codifica BDD FVIII en vectores de expresión, tales como CET1019-HS (Millipore). También se introducen varios sitios de enzimas de restricción únicas en la secuencia de FVIII para permitir manipulación adicional (por ejemplo, inserción, mutagénesis) de las secuencias de ADN. Los sitios únicos enumerados con su sitio de corte incluyen, aunque sin limitación: SacI 391, AfiII 700, SpeI 966, PshAI 1417, Acc65I 2192, KpnI 2192, BamHI 2250, HindIII 2658, PfoI 2960, PflMI 3413, ApaI 3893, Bsp1201 3893, SwaI 4265, OliI 4626, XbaI 4644 y BstBI 4673. El sitio HindIII reside en el propio extremo del dominio A2 y puede usarse potencialmente para la modificación del dominio B. El pMK-BDD FVIII sintetizado de GeneArts no contiene un codón de parada. El codón de parada se introduce amplificando un fragmento de 127 pb de FVIII usando los siguientes cebadores: 5'-GTGAACTCTCTAGACCCACCG-3' (SEQ ID NO: 1663); 5'-CTCCTCGAGGTCGACTCAGTAGAGGTCCTGTGCCTCG-3' (SEQ ID NO: 1664). El fragmento se digiere con XbaI y SalI, y se liga en pMK-BDD FVIII digerido con XbaI/SalI. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción llamada pBC0027 (pMK-BDD FVIII-STOP) contiene secuencias codificantes que codifican la proteína de BDD FVIII. La construcción pBC0027 entonces se digiere con NheI/SalI, y se liga con el vector CET1019-HS digerido con NheI/SalI (Millipore). El vector CET1019-HS contiene un promotor de CMV humano y una secuencia UCOE para facilitar la expresión génica. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción final se denomina pBC0025 (CET1019-HS-BDD FVIII-STOP), que codifica la proteína de BDD FVIII bajo el control de un promotor de CMV humano. Se espera que la introducción de la construcción pBC0025 en células de mamífero permita la expresión de la proteína de BDD FVIII con actividad procoagulante.

Ejemplo 17: Construcción de plásmidos de expresión para BDD FVIII que contienen XTEN

1. Inserción AE42 del dominio B

Se ejecutaron dos reacciones de PCR en paralelo para insertar XTEN_AE42 en la región del dominio B remanente de las construcciones de BDD FVIII. Las reacciones de PCR implicaron los siguientes cebadores:

cgaaagcgctacgcctgagaGTGGCCCTGGCTCTGAGCCAGCCACCTCCGGCTCTGAAACCCCTGCCTC

GAGCccaccagtcttgaaacgcc (SEQ ID NO: 1665);

TGATATGGTATCATCATAATCGATTTCCTCTTGATCTGACTG (SEQ ID NO: 1666);

agcttgaggatccagagttc (SEQ ID NO: 1667);

tctcaggcgtagcgctttcgCTTGTCCCCTCTTCTGTTGAGGTGGGGGAGCCAGCAGGAGAACCTGGCG

CGCCgttttgagagaagcttcttggt (SEQ ID NO: 1668). Los productos de PCR entonces sirvieron como moldes, y se realizó una segunda PCR para introducir el XTEN_AE42 en las secuencias de nucleótidos codificantes de FVIII flanqueadas por BamHI y ClaI. Este producto de PCR se digirió con BamHI y ClaI simultáneamente con la digestión de PBC0114 con las dos mismas enzimas. El producto de PCR se ligó al vector digerido. Esta construcción se denominó pBC0135 (pcDNA4-FVIII_4XTEN_AE42-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His) ('GAGSPGAETA' y 'SPATG' divulgadas con las SEQ ID NO: 178 y 1662, respectivamente), y codifica el BDD FVIII con un XTEN AE42 incorporado dentro del dominio B residual.

2. Inserción AE42 y mutación R1648A

Se empleó el método QuikChange (Agilent, CA) para introducir una mutación R1648A en PBC0135. Esta construcción se denominó pBC0149 (pcDNA4-FVIII_4XTEN_AE42-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His_R1648A) ('GAGSPGAETA' y

'SPATG' divulgadas como las SEQ ID NO: 178 y 1662, respectivamente), que elimina ese sitio de procesamiento de FVIII.

3. Inserción AE288 del dominio B

XTEN_AE288 se amplificó por PCR usando los siguientes cebadores: tctcaaaacGGCGCGCCAggtacctcagagtctgctacc (SEQ ID NO: 1669) y tggtggGCTCGAGGCtggcgcactgccttc (SEQ ID NO: 1670). PBC0075 se usó como molde para esta reacción de PCR. El producto de PCR se digirió con AscI y XhoI, y PBC0135 se digirió con las mismas enzimas. El producto de PCR se ligó al fragmento PBC0135. Esta construcción se denominó pBC0136 (pcDNA4-FVIII_4XTEN_AE288-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His) ('GAGSPGAETA' y 'SPATG' divulgadas con las SEQ ID NO: 178 y 1662, respectivamente), y codifica el BDD FVIII con un XTEN AE288 incorporado dentro del dominio B residual.

4. Inserción AE288 y mutación R1648A

XTEN_AE288 se amplificó por PCR usando los siguientes cebadores: tctcaaaacGGCGCGCCAggtacctcagagtctgctacc (SEQ ID NO: 1671) y tggtggGCTCGAGGCtggcgcactgccttc (SEQ ID NO: 1672). La construcción pBC0075 se usó como molde para esta reacción de PCR. El producto de PCR se digirió con AscI y XhoI, y pBC0149 se digirió con las mismas enzimas. El producto de PCR se ligó al fragmento pBC0149. Esta construcción se denominó pBC0137 (pcDNA4-FVIII_4XTEN_AE288-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His R1648A) ('GAGSPGAETA' y 'SPATG' divulgadas como las SEQ ID NO: 178 y 1662, respectivamente) y contiene una secuencia de XTEN AE288 interna al dominio B, con la mutación R1648A que elimina ese sitio de procesamiento de FVIII.

3. Inserciones AE144, AG144, AG288 del dominio B con y sin mutaciones R1648A

Fragmentos de XTEN seleccionados se amplificaron por PCR para introducir sitios AscI y XhoI en el extremo 5' y 3', respectivamente. El producto de PCR se digirió con AscI y XhoI, y pBC0135 (para R1648) o pBC0149 (para A1648) se digirieron con las mismas enzimas. El producto de PCR se ligó al vector pBC0135 o pBC0149. Estas construcciones se denominaron pSD0005, 6, 7, 8, 17 y 18.

Construcción de plásmidos de expresión para BDD FVIII con inserción de XTEN en el extremo C

1. Inserción AE288 C terminal

XTEN_AE288 se amplificó por PCR usando los siguientes cebadores: ggggccgaaacggccggtacctcagagtctgctacc (SEQ ID NO: 1673) y tgttcggccgtttcggcccctggcgcactgccttc (SEQ ID NO: 1674). La construcción pBC0075 se usó como molde para esta reacción de PCR. El producto de PCR se digirió con SfiI, y pBC0114 se digirió con la misma enzima. El producto de PCR se ligó al fragmento pBC0114 digerido. Esta construcción se denominó pBC0145 (pcDNA4-FVIII_4-XTEN_AE288-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His) ('GAGSPGAETA' y 'SPATG' divulgadas como las SEQ ID NO: 178 y 1662, respectivamente), y codifica una secuencia AE288 en el extremo C del BDD FVIII.

2. Inserción AG288 C terminal

XTEN_AG288 se diseñó y sintetizó por DNA2.0 (Menlo Park, CA). El gen sintetizado se amplificó por PCR usando los siguientes cebadores: ggggccgaaacggccccgggagcgtcacc (SEQ ID NO: 1675) y tgttcggccgtttcggcccctgacccggttgcccc (SEQ ID NO: 1676). El producto de PCR se digirió con SfiI, y el vector basado en PBC0114 se digirió con la misma enzima. El producto de PCR se ligó al fragmento PBC0114 digerido. Esta construcción se denominó pBC0146 (pcDNA4-FVIII_4-XTEN_AG288-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His) ('GAGSPGAETA' y 'SPATG' divulgadas como las SEQ ID NO: 178 y 1662, respectivamente), y codifica una secuencia AG288 en el extremo C del BDD FVIII.

3. Inserciones AE/AG144, 288, 864 C terminales

Se introdujeron sitios AscI y XhoI en el vector basado en PBC0114 mediante métodos QuikChange usando los cebadores: 5O37-PBC0114-AscI-XhoI-F: CAGGACCTCTACGGCGCgccagcctcgaGCGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGG (SEQ ID NO: 1677); 5O38-PBC0114-AscI-XhoI-R: CCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGCtcgaggctggcGCGCCGTAGAGGTCCTG (SEQ ID NO: 1678). Diversos fragmentos de XTEN se amplificaron por PCR con AscI y XhoI introducidos en el extremo 5' y 3', respectivamente. El producto de PCR se ligó al vector PBC0114 digerido. Estas construcciones se denominaron pSD0013, pSD0014, pSD0015, pSD0016, pSD0019 y pSD0020.

Construcción de plásmidos de expresión para BDD FVIII con inserciones de XTEN entre dominios y dentro de dominios

1. Inserciones AE7, AE42 y AE144

Se usan cuatro estrategias distintas para la inserción de AE42 en los sitios indicados (por ejemplo, los sitios de restricción naturales o introducidos BsiWI 48, AflII 381, PshAI 1098, KpnI 1873, BamHI 1931, PflMI 3094, ApaI 3574,

XbaI 4325, NotI 4437, XhoI 4444, BstEII 4449, AgeI 4500, PmeI 4527, BsiWI 908, NheI 1829 y ClaI 3281) dentro de la secuencia codificante de BDD FVIII, que contribuyen cada uno a la creación de varias construcciones. Mediante el diseño, estas inserciones de AE42 crean sitios AscI y XhoI flanqueados en cada lada de la inserción, que permiten la introducción/sustitución de XTEN más largos, así como XTEN con diferentes secuencias o secuencias de escisión incorporadas, según sea necesario. Específicamente, las construcciones que contiene inserciones de XTEN_144 se enumeran en la tabla 21. Estas inserciones se crean remplazando AE7 o AE42 con un fragmento XTEN_144 sometido a PCR flanqueado por sitios AscI y XhoI.

2. Método mediado por PCR doble

Se ejecutan dos reacciones de PCR en paralelo para insertar XTEN_AE42 en el sitio indicado. Las dos reacciones de PCR introducen XTEN en el extremo 3' o el 5' mediante el uso de un cebador largo que contiene XTEN parcial. Los productos de PCR entonces sirven como moldes, y se realiza una segunda PCR para introducir el XTEN_AE42 en las secuencias de nucleótidos que codifican FVIII flanqueadas por sitios de enzimas de restricción seleccionados. Este producto de PCR se digiere con las enzimas apropiadas simultáneamente con la digestión de PBC0114 usando las dos mismas enzimas. El producto de PCR se liga al vector digerido. Usando este método, se crean construcciones denominadas pBC0126, pBC0127, pBC0128 y pBC0129, que provocan inserciones AE42 en las ubicaciones R3, R3, P130, L216, respetivamente. Las secuencias se enumeran en la tabla 21. Las secuencias XTEN_144 seleccionadas entonces pueden someterse a PCR para introducir sitios AscI y XhoI en cualquier extremo del fragmento, y se ligan a la construcción de FVIII-XTEN_AE42 digerida. Por ejemplo, pSD0053 se creó remplazando el AE42 de pBC0129 con XTEN_AE144. Otras construcciones de XTEN_144 se crearon mediante la misma estrategia y se enumeran en la tabla 21.

3. Método de clonación de dos etapas mediado por QuikChange

El método QuikChange se emplea para introducir secuencias codificantes de XTEN_AE7 que están flanqueadas por AscI y XhoI en sitios indicados. La construcción intermedia resultante entonces se digiere con AscI y XhoI. XTEN_AE42 o XTEN_AE144 se amplifica por PCR para introducir los dos sitios y se digiere en consecuencia. El vector y el inserto entonces se ligan para crear las construcciones finales. Las secuencias se enumeran en la tabla 21.

4. Método de ligamiento mediado por enzima de restricción de tipo II de tres PCR

Se realizan tres reacciones de PCR para crear dos piezas de fragmentos codificantes de FVIII flanqueados por una enzima de restricción de tipo I que se correlaciona con un sitio único dentro del gen de FVIII_4 y una enzima de tipo II (por ejemplo, BsaI, BbsI, BfuAI), la tercera reacción de PCR creó el XTEN_AE42 flanqueado por dos sitios de enzima de restricción de tipo II. Los tres fragmentos de PCR se digieren con enzimas apropiadas y se ligan en una pieza lineal que contiene la inserción de XTEN_AE42 dentro de un fragmento de secuencias codificantes de FVIII. Este producto entonces se digiere con enzimas únicas apropiadas dentro de las secuencias codificantes de FVIII y se liga a la construcción PBC0114 digerida con las mismas enzimas, y produce construcciones denominadas pBC0130 (con la inserción de XTEN en el residuo P333), pBC0132 (con la inserción de XTEN en el residuo D403), pBC0133 (con la inserción de XTEN en el residuo R490). Las secuencias se enumeran en la tabla 21. Las secuencias XTEN_144 seleccionadas entonces pueden someterse a PCR para introducir sitios AscI y XhoI en cualquier extremo del fragmento, y se ligan a la construcción de FVIII-XTEN_AE42 digerida. Por ejemplo, pSD0001 y pSD0003 se crearon remplazando el AE42 de pBC0132 con XTEN_AE144 y XTEN_AG144 respectivamente. Otras construcciones de XTEN_144 enumeradas en la tabla 21 se crearon mediante la misma estrategia.

5. Síntesis génica personalizada

La síntesis génica personalizada se realiza por GeneArt (Regensburg, Alemania). Los genes se diseñan de modo que incluyan nucleótidos que codifican el XTEN_AE42 insertado en el uno o más sitios indicados y los genes se flanquean por dos sitios de enzimas de restricción únicos seleccionados dentro del gen de FVIII_4. Los genes sintetizados y PBC0114 se digieren con enzimas apropiadas y se ligan para crear el producto final con el BDD FVIII que incorpora el XTEN_AE42 entre los sitios de restricción. Las secuencias XTEN_144 seleccionadas entonces pueden someterse a PCR para introducir sitios AscI y XhoI en cualquier extremo del fragmento, y se ligan a la construcción de FVIII-XTEN_AE42 digerida.

Construcción de plásmidos de expresión con inserciones dobles de XTEN en el dominio B y en el extremo C

La construcción pBC0136, que codifica el BDD FVIII con un XTEN AE288 incorporado dentro del dominio B residual, se digiere con BamHI y ClaI, y el fragmento resultante de 1372 pb de esta digestión es el inserto. La construcción pBC0146 se digiere con BamHI y ClaI, y la pieza de 9791 pb de esta digestión es el vector. El vector y el inserto se ligan juntos para crear pBC0209, que contiene una inserción AE288 dentro del dominio B y una AG288 en el extremo C. Se utiliza la misma estrategia para crear construcciones que contienen dos inserciones AE288 en el dominio B y en el extremo C, respectivamente, usando PBC0145 como vector.

Construcción de plásmidos de expresión con múltiples inserciones de XTEN

La construcción pBC0127, que codifica un XTEN AE42 en la posición R3 de FVIII, se digiere con BsiWI y AflII, y el fragmento resultante de 468 pb de esta digestión es el inserto. La construcción pBC0209 se digiere con BsiWI y AflII, la pieza de 10 830 pb de esta digestión es el vector. El vector y el inserto se ligan juntos para crear una construcción denominada pBC0210, que contiene una inserción AE42 en el dominio A1, tres aminoácidos adicionales ATR para restaurar la secuencia de escisión señal, una inserción de XTEN AE288 dentro del dominio B y un AG288 en el extremo C. Se usa la misma metodología para crear construcciones que codifican múltiples XTEN en los sitios de restricción naturales e introducidos; por ejemplo, BsiWI 48, AflII 381, PshAI 1098, KpnI 1873, BamHI 1931, PflMI 3094, ApaI 3574, XbaI 4325, NotI 4437, XhoI 4444, BstEII 4449, AgeI 4500, PmeI 4527, BsiWI 908, NheI 1829 y ClaI 3281.

Construcción de vectores de expresión de BDD FVIII con XTEN AE288 interno

Se introducen dos sitios de la enzima de restricción BsaI en la construcción PBC0027 pMK-BDD FVIII entre el par de bases 2673 y 2674 usando el método QuikChange siguiendo el protocolo del fabricante (Agilent Technologies, CA). Las secuencias de ADN insertadas son gggtctcccgcgccagggtctccc, y la construcción resultante se denomina pBC0205 (secuencia en la tabla 21). La secuencia de ADN que codifica AE288 (u otras variantes y longitudes de XTEN; por ejemplo, AE42, AG42, AG288, AM288) se somete a PCR entonces con cebadores que introducen sitios BsaI en 5' y también en 3'. El vector pBC0205 y el inserto (XTEN_288) se digieren entonces con BsaI y se ligan para crear pBC0206, que codifica el gen de FVIII con una inserción de XTEN_AE288 dentro del dominio B (secuencia en la tabla 21). La construcción pBC0206 entonces se digiere con NheI/SalI, y se liga con el vector CET1019-HS digerido con NheI/SalI (Millipore). El vector CET1019-HS contiene un promotor de CMV humano y una secuencia UCOE para facilitar la expresión génica. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción final se denomina pBC0207 (CET1019-HS-BDD FVIII-STOP), que codifica la proteína de BDD FVIII bajo el control de un promotor de CMV humano (secuencia en la tabla 21). Se espera que la introducción de la construcción pBC0207 en células de mamífero permita la expresión de la proteína de BDD FVIII con XTEN_AE288 interno. Se usa el mismo protocolo para introducir, transformar y expresar construcciones que contienen otras variantes y longitudes de XTEN; por ejemplo, AE42, AG42, AG288, AM288, AE864, AG864 u otro XTEN de la tabla 4.

Construcción de vectores de expresión de BDD FVIII-/-XTEN AE864

El fragmento de BDD FVIII con NheI y SfiI flanqueando el extremo 5' y 3' se genera digiriendo la construcción pBC0025. Este fragmento digerido se liga entonces a un vector pSecTag digerido con NheI/SfiI (pBC0048 pSecTag-FVIII-/-XTEN_AE864) que codifica el FVIII seguido de la secuencia de XTEN_AE864. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción final es pBC0060, que codifica la proteína de BDD FVIII-/-XTEN_AE864 bajo el control de un promotor de CMV humano. Se espera que la introducción de la construcción pBC0060 en células de mamífero exprese la proteína de FVIII con una fusión de XTEN C terminal (BDD FVIII-/-XTEN_AE864) con actividad procoagulante.

Construcción de vectores de expresión de BDD FVIII-/FXI/-XTEN AE864

El fragmento de BDD FVIII con NheI y SfiI flanqueando el extremo 5' y 3' se genera digiriendo la construcción pBC0025. Este fragmento digerido se liga entonces a un vector pSecTag digerido con NheI/SfiI (pBC0047 pSecTag-FVIII-/FXI/-XTEN_AE864) que codifica el FVIII seguido de la secuencia de escisión de FXI (/FXI/) y XTEN_AE864. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción final es pBC0051, que codifica la proteína de BDD FVIII-/FXI/-XTEN_AE864 bajo el control de un promotor de CMV humano. Se espera que la introducción de la construcción pBC0051 en células de mamífero exprese la proteína de FVIII con una fusión de XTEN C terminal (BDD FVIII-/FXI/-XTEN_AE864), que posteriormente podría escindirse por FXI, liberando, por lo tanto, la proteína de BDD FVIII con actividad procoagulante.

Construcción de vectores de expresión de BDD FVIII-/FXI/-XTEN que comprenden AE288 o AG288

La secuencia de XTEN AE864 fusionada en pBC0060 se remplaza digiriendo las secuencias de XTEN AE288 y AG288 con BsaI y HindIII. Una etapa posterior de ligamiento usando el fragmento de XTEN AE288 o AG288 respectivo y pBC0051 digerido con BsaI/HindIII permite el intercambio de las secuencias AE288 o AG288 en el vector de expresión de BDD FVIII. Las construcciones finales resultantes son pBC0061 para BDD FVIII-AE288 y pBC0062 para BDD FVIII-AG288. Se espera que la introducción de la construcción pBC0061 en células de mamífero exprese la proteína de FVIII con una fusión de XTEN AE288 C terminal (BDD FVIII-/-XTEN_AE288) con actividad procoagulante. Se espera que la introducción de la construcción pBC0062 en células de mamífero exprese la proteína de FVIII con una fusión de XTEN AG288 C terminal (BDD FVIII-/-XTEN_AG288) con actividad procoagulante.

Construcción de vectores de expresión de BDD FVIII-/FXI/-XTEN con XTEN alternativo

La secuencia de XTEN fusionada en pBC0051 se remplaza digiriendo el ADN que codifica otras secuencias de XTEN (por ejemplo, otras variantes y longitudes de XTEN; por ejemplo, AE42, AG42, AG288, AM288) con BsaI y HindIII. Un ligamiento usando el fragmento de XTEN y pBC0051 digerido con BsaI/HindIII permite el intercambio de las diversas secuencias que codifican XTEN en el vector de expresión de BDD FVIII, proporcionando las construcciones alternativas. Se espera que la introducción de las construcciones alternativas en células de mamífero exprese la proteína de FVIII con un XTEN C terminal (BDD FVIII-/FXI/-XTEN) que posteriormente puede escindirse por FXI, liberando el FVIII, produciendo fusión de FVIII procoagulante con actividad procoagulante.

Ejemplo 18: Construcción de plásmidos de expresión para péptido señal de FVIII-XTEN-/FXI/-BDD FVIII

Construcción de vectores de expresión para péptido señal de FVIII-XTEN AE864

La secuencia codificante para el péptido señal de FVIII se genera hibridando los dos siguientes oligos: 5'-CTAGCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGTG GGTCTCC-3' (SEQ ID NO: 1679); 5'-ACCTGGAGACCCACTAAAGCAGAATCGCAAAAGGCACAGAAAGAAGCAGGTGGAGAGCTC TATTTGCATG-3' (SEQ ID NO: 1680). Los oligos hibridados están flanqueados por los sitios de las enzimas de restricción NheI y BsaI en cualquier extremo, y se ligan al vector pCW0645 digerido con NheI/BsaI que codifica el FVII-XTEN_AE864. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción final se denomina pBC0029, que codifica la proteína de péptido señal-XTEN_AE864 bajo el control de un promotor de CMV humano. Esta construcción se usa como construcción intermedia para crear una construcción de expresión con XTEN fusionado en el extremo N de la proteína de FVIII, y también puede usarse como plásmido principal para crear construcciones de expresión que permitan la fusión de XTEN en el extremo N de una proteína secretada.

Construcción de vectores de expresión de péptido señal-XTEN AE864-/FXI/-BDD FVIII

Un fragmento de 1800 pb dentro de la región codificante de FVIII se amplifica usando cebadores que introducen sitios NheI-BbsI-/FXI/-AgeI en el extremo 5' y la enzima de restricción KpnI endógena en el extremo 3'. El fragmento de FVIII digerido con NheI/KpnI se liga con el vector pBC0027 digerido con NheI/KpnI. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción resultante se denomina pBC0052, que contiene secuencias que codifican la proteína de /FXI/-FVIII sin el péptido señal de FVIII. Esta construcción se usa como construcción intermedia para crear una construcción de expresión con XTEN fusionado en el extremo N de la proteína de FVIII.

El vector pBC0052 se digiere con las enzimas BbsI/XhoI, y se usa para ligarlo con pBC0029 digerido con Bbsi/XhoI. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción final se denomina pBC0053, que codifica la proteína de péptido señal-XTEN_AE864-/FXI/-BDD FVIII bajo el control de un promotor de CMV humano. Se espera que la introducción de la construcción pBC0053 en células de mamífero exprese la proteína de FVIII con una fusión de XTEN N terminal (péptido señal-XTEN_AE864-/FXI/-BDD FVIII), que posteriormente podría escindirse por FXI, liberando, por lo tanto, la proteína de BDD FVIII.

Construcción de vectores de expresión de péptido señal-XTEN-/FXI/-BDD FVIII

La secuencia de XTEN fusionada en pBC0053 puede remplazarse digiriendo otros fragmentos de XTEN (por ejemplo, AM, AF, AG) con BsaI y BbsI. Un ligamiento usando el fragmento de XTEN y pBC0053 digerido con BsaI/BbsI permite el intercambio de diversas piezas de XTEN (por ejemplo, AM, AF, AG) en el vector de expresión de BDD FVIII. Diversas fusiones de XTEN pueden aumentar las semividas de estas proteínas de forma diferente, permitiendo la modificación de las propiedades (por ejemplo, eficacia, potencia) de estas proteínas. Se espera que la introducción de cualquiera de estas construcciones de fusión en células de mamífero exprese la proteína de FVIII con una fusión de XTEN N terminal (péptido señal-XTEN-/FXI/-BDD FVIII), en que el péptido de XTEN fusionado posteriormente puede escindirse por FXI, generando la proteína de BDD FVIII.

Ejemplo 19: Construcción de BDD FVIII con inserción de XTEN entre dominios

Construcción de vectores de expresión de BDD FVIII con una inserción de XTEN en los límites de los dominios A2-B

La construcción pBC0027 (pMK-BDD FVIII-STOP) es un vector de clonación diseñado para que contenga secuencias codificantes de la proteína de BDD FVIII, pero no un promotor colocado para iniciar la expresión de BDD FVIII. Esta construcción se usa para la manipulación de las secuencias codificantes de BDD FVIII ya que la cadena principal del vector contiene muy pocos sitios para enzimas de restricción, permitiendo, por lo tanto, estrategias de clonación fáciles.

Las proteínas BDD FVIII contienen 1457 aminoácidos en un peso molecular total de 167 539,66. Hay 6 dominios dentro de la proteína de FVIII de tipo silvestre, los dominios A1, A2, B, A3, C1 y C2. En la proteína de BDD FVIII, la mayor parte del dominio B se ha eliminado ya que se cree que es un dominio no estructurado y la eliminación del dominio no altera las funciones cruciales de esta proteína. Sin embargo, los límites del dominio B parecen ser posiciones excelentes para crear fusiones de XTEN para permitir la prolongación de las semividas de las proteínas.

Dentro de la construcción pBC0027, hay un sitio único para la enzima de restricción HindIII en el límite de la unión de A2-B. El XTEN (por ejemplo, secuencias de las tablas 4 o 13-17) se amplifica usando cebadores que introducen un sitio de escisión de HindIII y FXI en cualquier extremo de la secuencia codificante de XTEN. La secuencia de XTEN fusionada puede alterarse amplificando diversos fragmentos de XTEN. Diversas fusiones de XTEN pueden aumentar las semividas de estas proteínas de forma diferente, permitiendo la modificación de las propiedades (por ejemplo, eficacia, potencia) de estas proteínas. El fragmento HindIII-/FXI/-XTEN-/FXI/-HindIII se digiere con HindIII y se liga con pBC0027 digerido con HindIII. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción final se denomina pBC0054, que codifica la proteína de BDD FVIII con una fusión de XTEN entre dominios (FVIII(A1-A2)-/FXI/-XTEN-/FXI/-FVIII(C1-C2)), pero no un promotor para iniciar la expresión génica.

La construcción pBC0054 se digiere con NheI/SalI, y se liga con el vector CET1019-HS digerido con NheI/SalI (Millipore). El vector CET1019-HS contiene un promotor de CMV humano y una secuencia UCOE para facilitar la expresión génica. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción final se denomina pBC0055 (CET1019-HS-FVIII(A1-A2)-/FXI/-XTEN-/FXI/-FVIII(C1-C2)), que codifica la proteína de BDD FVIII con una fusión de XTEN entre dominios (entre los dominios A2/B) (FVIII(A1-A2)-/FXI/-XTEN-/FXI/-FVIII(C1-C2)) bajo el control de un promotor de CMV humano. Se espera que la introducción de la construcción pBC0055 en células de mamífero exprese la proteína de BDD FVIII con una fusión de XTEN entre dominios (FVIII(A1-A2)-/FXI/-XTEN-/FXI/-FVIII(C1-C2)), que posteriormente podría escindirse por FXI, liberando, por lo tanto, la proteína de BDD FVIII.

Construcción de vectores de expresión de BDD FVIII con una inserción de XTEN en los límites de los dominios A1-A2

La construcción pBC0027 se diseña como molde para dos reacciones de PCR usando los cuatro siguientes cebadores:

(Reacción I) 5'-ATGATGGCATGGAAGCCTAT-3' (SEQ ID NO: 1681); 5'-ATCCCTCACCTTCGCCAGAACCTTCAGAACCCTCACCTTCAGAACCTTCACCAGAACCTTCA CCATCTTCCGCTTCTTCATTATTTTTCAT-3' (SEQ ID NO: 1682).

(Reacción II) 5'-TTCTGGCGAAGGTGAGGGATCTGAAGGCGGTTCTGAAGGTGAAGGTGGCTCTGAGGGTTCC GAATATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAAT-3' (SEQ ID NO: 1683); 5'-TATTCTCTGTGAGGTACCAGC-3' (SEQ ID NO: 1684).

Los productos de PCR generados son de 150 pb y 800 pb, respectivamente. El producto de 800 pb se usa como molde para la siguiente ronda de reacción de PCR con el producto de 150 pb como un cebador y 5'-TATTCTCTGTGAGGTACCAGC-3' (SEQ ID NO: 1685) como el otro. El producto de la segunda ronda de PCR es de 930 pb y se digiere con las enzimas de restricción PshAI y ACC65I. Este fragmento de ADN flanqueado por PshAI/Acc65I se liga con pBC0027 digerido con PshAI/Acc65I. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción final se denomina pBC0058 (pMK-BDD FVIII-D345-XTEN_Y36), que codifica la proteína de BDD FVIII con una fusión de XTEN entre dominios (entre los dominios A1/A2) después del residuo D345.

La construcción pBC0058 se digiere con NheI/SalI, y se liga con el vector CET1019-HS digerido con NheI/SalI (Millipore). El vector CET1019-HS contiene un promotor de CMV humano y una secuencia UCOE para facilitar la expresión génica. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción final se denomina pBC0059 (CET1019-HS-BDD FVIII D345-XTEN_Y36), que codifica la proteína de BDD FVIII con una fusión de XTEN entre dominios (entre los dominios A1/A2) después del residuo D345 bajo el control de un promotor de CMV humano. Se espera que la introducción de la construcción pBC0059 en células de mamífero exprese la proteína de BDD FVIII con una fusión de XTEN entre dominios (BDD FVIII D345-XTEN_Y36).

Ejemplo 20: Construcción de FVIII con inserción de XTEN dentro del dominio

Construcción de vectores de expresión de BDD FVIII con inserción de XTEN después de P598 (dentro del dominio A2)

Las secuencias codificantes para XTEN_Y36 se amplifican usando técnicas de PCR con los siguientes cebadores:

5'-GAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATACAACGCTTTCTCCCCAATCCAGGTGAAGGTTCTGGTGAAGGG-3' (SEQ ID NO: 1686)

5'-AACTCTGGATCCTCAAGCTGCACTCCAGCTTCGGAACCCTCAGAGCC-3' (SEQ ID NO: 1687).

El producto de PCR de 184 pb está flanqueado por los sitios de las enzimas de restricción KpnI y BamHI en cualquier extremo, y se liga al vector pBC0027 digerido con KpnII/BamHI que codifica el gen de BDD FVIII. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción final se denomina pBC0056, que contiene secuencias de ADN que codifican la proteína de FVIII con una fusión de XTEN_Y36 después del residuo P598. Esta estrategia de clonación se usa para introducir diversas formas de XTEN en la proteína de BDD FVIII alterando el molde para la reacción de PCR y cambiando los cebadores en consecuencia.

La construcción pBC0056 se digiere con NheI/SalI, y se liga con el vector CET1019-HS digerido con NheI/SalI (Millipore). El vector CET1019-HS contiene un promotor de CMV humano y una secuencia UCOE para facilitar la expresión génica. La mezcla de ADN ligado se usa para transformar células bacterianas DH5a. Los transformantes se criban mediante miniprep de ADN y las construcciones deseadas se confirman por secuenciación de ADN. La construcción final se denomina pBC0057 (CET1019-HS-FVIII P598-XTEN_Y32), que codifica la proteína de BDD FVIII con una fusión de XTEN dentro del dominio (dentro del dominio A2) bajo el control de un promotor de CMV humano. Se espera que la introducción de la construcción pBC0057 en células de mamífero exprese la proteína de BDD FVIII con una fusión de XTEN dentro del dominio (FVIII P598-XTEN_Y32).

Construcción de vectores de expresión de BDD FVIII con otras inserciones de XTEN dentro del dominio

Para introducir diversos segmentos de XTEN en otros sitios dentro del dominio dentro de BDD FVIII (por ejemplo, el XTEN de las tablas 4 o 13-17), se diseñan cebadores que amplifican XTEN con un saliente que puede hibridar con BDD FVIII. La secuencia codificante de FVIII (pMK-BDD FVIII) se diseña con diversos sitios únicos de enzimas de restricción para permitir estas inserciones específicas. Las enzimas de restricción únicas se enumeran a continuación con su sitio de corte: NheI 376, SacI 391, AfiII 700, SpeI 966, PshAI 1417, Acc65I 2192, KpnI 2192, BamHI 2250, HindIII 2658, PfoI 2960, PflMI 3413, ApaI 3893, Bsp1201 3893, SwaI 4265, OliI 4626, XbaI 4644, BstBI 4673, SalI4756 y XhoI 4762. Los sitios NheI y SalI en cualquier extremo de la secuencia codificante se usan para insertar el fragmento de ADN en un vector dirigido por el promotor de CMV humano, el CET1019-HS (Millipore) para su expresión en células de mamífero. Estas construcciones expresan la proteína de BDD FVIII con una fusión de XTEN con secuencias enumeradas en la tabla 21.

Ejemplo 21: Construcción de FVIII con inserciones de XTEN

CFXTEN con dos XTEN:

Para obtener CFXTEN con dos inserciones de XTEN en diversas regiones (del extremo N al extremo C: A1-R1, A1-R2, A2-R1, A2-R2, dominio B, a3, A3-R1, A3-R2, extremo C), se utilizaron construcciones que expresaban fusiones con inserciones de un solo XTEN que retenían actividad de FVIII. La secuencia codificante de FVIII (pBC0114 pcDNA4-FVIII_4-X10-Myc-SPATG-His extra RE) ('SPATG' divulgada como la SEQ ID NO: 1662) se diseñó con diversos sitios únicos de enzimas de restricción para permitir estas combinaciones específicas. Las enzimas de restricción únicas se enumeran en la tabla 18 a continuación con sus sitios relativos entre diferentes regiones: BsiWI (entre el extremo N y A1-R1), Af1II (entre A1-R1 y A1-R2), NheI (entre A1-R2 y A2-R1), KpnI (entre A2-R1 y A2-R2), BamHI (entre A2-R2 y el dominio B), ClaI (entre a3 y A3-R1), Pf1MI (entre A3-R1 y A3-R2), XbaI (entre A3-R2 y el extremo C), AgeI (entre el extremo C de FVIII y el codón de parada). Los componentes básicos y enzimas de restricción para clonar las colecciones se eligieron, como se enumera en la tabla a continuación. Los componentes elegidos en cada región se mezclaron a una relación molar de 1:1, y se digirieron dos conjuntos de mezclas de ADN con enzimas de restricción únicas. Los fragmentos de ADN se separaron con gel de agarosa al 1 % y se purificaron por el kit de extracción de gel Qiagen. El ADN con inserción de XTEN en la primera región deseada se consideró el inserto (el fragmento de ADN más pequeño en gel de agarosa), mientras que el ADN con inserción de XTEN en la segunda región deseada se consideró el vector (el fragmento de ADN más grande en gel de agarosa). El inserto y el vector se ligaron para reconstituir el plásmido. La mezcla de ADN ligado se usó para transformar células hospedadoras competentes de *E. coli* DH5α. Los transformantes se cribaron por amplificación por círculo rodante (RCA) y secuenciación de Sanger para cubrir aproximadamente 3-4 veces el tamaño potencial de la colección. Se identificaron clones únicos y se hicieron en miniprep. Entonces se usaron dos digestiones de restricción distintas para confirmar adicionalmente la integridad de XTEN en cada región. Las secuencias de aminoácidos y las de ADN codificantes para las proteínas de fusión de CFXTEN resultantes se enumeran en la tabla 21.

CFXTEN con una o dos inserciones de XTEN dentro de los dominios B/a3 y el extremo C:

El dominio B/a3 y el extremo C de FVIII son regiones no estructuradas que toleraban bien inserciones de XTEN. El dominio B/a3 mediaba además interacciones con otros cofactores, incluyendo el factor de Von Willebrand. Para investigar las inserciones de XTEN óptimas en el dominio B/a3, se hicieron eliminaciones seleccionadas y mutaciones de la región mediante métodos de mutagénesis basada en PCR. Las reacciones de PCR seleccionadas y los vectores se ligaron con enzimas de restricción únicas como se enumera en la tabla 18. Los fragmentos de ADN se separaron con gel de agarosa al 1 % y se purificaron por el kit de extracción de gel Qiagen. El ADN con inserción de XTEN en la primera región deseada se consideró el inserto (el fragmento de ADN más pequeño en gel de agarosa), mientras que el ADN con inserción de XTEN en la segunda región deseada se consideró el vector (el fragmento de ADN más grande en gel de agarosa). El inserto y el vector se ligaron para reconstituir el plásmido. La mezcla de ADN ligado se usó para transformar células hospedadoras competentes de *E. coli* DH5α. Los transformantes se cribaron por PCR de colonias y secuenciación de Sanger para cubrir aproximadamente 8X del tamaño potencial de la colección. Se identificaron clones únicos y se hicieron en miniprep. Entonces se usó una digestión de restricción con tres enzimas para confirmar adicionalmente la integridad de XTEN en cada región. Las secuencias de aminoácidos y las de ADN codificantes para las proteínas de fusión de CFXTEN resultantes se enumeran en la tabla 21.

Tabla 18. Diseño de clonación para colecciones de FVIII con dos inserciones de XTEN

ID de la colección	Componentes del inserto (región de XTEN)	Componentes del vector (región de XTEN)	Enzimas de restricción
LSD0001	pSD0005, pSD0006, pSD0007, pSD0008, pSD0017, pSD0018, pBC0136, pBC0137 (dominio B)	pSD0013 (extremo C)	NheI + ClaI
LSD0002	pSD0005, pSD0006, pSD0007, pSD0008, pSD0017, pSD0018, pBC0136, pBC0137 (dominio B)	pSD0014 (extremo C)	NheI + ClaI
LSD0003	pSD0005, pSD0006, pSD0007, pSD0008, pSD0017, pSD0018, pBC0136, pBC0137 (dominio B)	pSD0019 (extremo C)	NheI + ClaI
LSD0004	pSD0005, pSD0006, pSD0007, pSD0008, pSD0017, pSD0018, pBC0136, pBC0137 (dominio B)	pSD0020 (extremo C)	NheI + ClaI
LSD0005	pSD0045, pSD0046, pSD0048, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0001 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0006	pSD0045, pSD0046, pSD0048, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0002 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0007	pSD0045, pSD0046, pSD0048, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0003 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0008	pSD0045, pSD0046, pSD0048, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0004 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0037	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0032 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0038	pSD0039 (a3)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	BamHI+ClaI
LSD0039	pSD0039 (a3)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	BamHI+ClaI
LSD0040	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	ClaI+XbaI
LSD0041	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	ClaI+XbaI
LSD0042	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	ClaI+XbaI
LSD0043	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	ClaI+XbaI
LSD0044	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	PflMI+XbaI
LSD0045	pSD0039 (a3)	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	BamHI+ClaI

ID de la colección	Componentes del inserto (región de XTEN)	Componentes del vector (región de XTEN)	Enzimas de restricción
LSD0046	pSD0039 (a3)	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	BamHI+ClaI
LSD0047	pSD0046 (A1-R1)	pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0048	pSD0045, pSD0051 (A1-R1)	pSD0003 (A2-R1)	BsiWI+AflII
pNL0006	producto de PCR	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	BamHI+PflMI
pNL0007	producto de PCR	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	ClaI+PflMI
pNL0008	producto de PCR	LSD0003.009 (dominio B y extremo C)	ClaI+PflMI
pNL0009	producto de PCR	pSD0039 (dominio a3)	BamHI+AscI
pNL0010	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	pNL0009 (dominio a3)	XbaI+AgeI

Ejemplo 22: Construcción de vectores de expresión de BDD FVIII con 3-5 inserciones de XTEN en los sitios 18/26, 403, 745/1656, 1720, 1900 o 2332

Se eligieron construcciones de fusión de FVIII con inserciones de XTEN en los sitios 18/26, 403, 745/1656, 1720, 1900 o 2332 para recombinar y generar construcciones con 3, 4, 5 o 6 inserciones de XTEN.

Construcción de vectores de expresión de BDD FVIII con 3-5 inserciones de XTEN en los sitios 26, 403, 1656, 1720 o 1900

Las construcciones elegidas con un solo XTEN en los sitios deseados fueron: pSD0050, pSD0001, pSD0039, pSD0010 y pSD0062. Las construcciones con doble XTEN en los sitios deseados incluían LSD0005.002, LSD0038.001, LSD0040.002, LSD0042.013, LSD0039.010, LSD0041.008, LSD0043.008, LSD0045.002, LSD0046.002 y LSD0044.002. Los componentes básicos y enzimas de restricción para clonar las construcciones se eligieron, como se enumera en la tabla 19 a continuación. Los componentes elegidos se digirieron con enzimas de restricción únicas. El ADN de los insertos y los vectores se separaron con gel de agarosa al 1 % y se purificaron por el kit de extracción de gel Qiagen. El inserto y el vector se ligaron, y después se transformaron en células hospedadoras de *E. coli* DH5α. Se analizaron cuatro colonias para cada construcción por RCA y secuenciación de ADN. Los clones con inserciones de XTEN deseadas se hicieron en miniprep. Entonces se usaron las digestiones de restricción para confirmar adicionalmente la integridad de XTEN en cada región. Las secuencias de aminoácidos y las de ADN codificantes para las proteínas de fusión de CFXTEN resultantes se enumeran en la tabla 21. Las construcciones resultantes se numeraron de pSD0077 a pSD0092.

Construcción de vectores de expresión de BDD FVIII con 4-6 inserciones de XTEN en los sitios 18, 403, 1656, 1720, 1900 o 2332

Las construcciones pSD0077 a pSD0092 sirvieron como componentes básicos para generar construcciones con 4 a 6 XTEN con inserciones en 18, 403, 1656, 1720, 1900 y 2332. Las construcciones de componentes básicos y enzimas de restricción para clonar las construcciones se eligieron, como se enumera en la tabla 19 a continuación. Los componentes elegidos se digirieron con enzimas de restricción únicas. El ADN de los insertos y los vectores se separaron con gel de agarosa al 1 % y se purificaron por el kit de extracción de gel Qiagen. El inserto y el vector se ligaron, y después se transformaron en células hospedadoras de *E. coli* DH5α. Se analizaron ocho colonias para cada construcción por PCR de colonias y secuenciación de ADN. Los clones con inserciones de XTEN deseadas se hicieron en miniprep. Entonces se usaron las digestiones de restricción para confirmar adicionalmente la integridad de XTEN en cada región. Las secuencias de aminoácidos y las de ADN codificantes para las proteínas de fusión de CFXTEN resultantes se enumeran en la tabla 21. Las construcciones resultantes se numeraron de pBC0247 a pBC0257, pNL0022, 23, 24, 25 y 30.

Construcción de vectores de expresión de BDD FVIII con 4-6 inserciones de XTEN en los sitios 18, 403, 745, 1720, 1900 o 2332

Las construcciones pBC0247 a pBC0252, pBC0255, pNL0022 a pNL0025 sirvieron como componentes básicos para generar construcciones con 4 a 6 XTEN con inserciones en 18, 403, 745, 1720, 1900 y 2332. Las construcciones de componentes básicos y enzimas de restricción para clonar las construcciones se eligieron, como se enumera en la tabla 19 a continuación. Los componentes elegidos se digirieron con enzimas de restricción únicas. El ADN de los insertos y los vectores se separaron con gel de agarosa al 1 % y se purificaron por el kit de extracción de gel Qiagen. El inserto y el vector se ligaron, y después se transformaron en células hospedadoras de *E. coli* DH5α. Se analizaron ocho colonias para cada construcción por PCR de colonias y secuenciación de ADN. Los clones con inserciones de XTEN deseadas se hicieron en miniprep. Entonces se usaron las digestiones de restricción para confirmar

adicionalmente la integridad de XTEN en cada región. Las secuencias de aminoácidos y las de ADN codificantes para las proteínas de fusión de CFXTEN resultantes se enumeran en la tabla 21. Las construcciones resultantes se numeraron de pBC0258 a pBC0268.

Tabla 19: Diseño de clonación para colecciones de FVIII con 3-5 inserciones de XTEN en los sitios 26, 403, 1656, 1720 o 1900

Nombre de la construcción	Componentes del inserto (región de XTEN)	Componentes del vector (región de XTEN)	Enzimas de restricción
pSD0077	pSD0050 (A1-R1)	LSD0039,010 (A2-R1, a3)	BsiWI+AflII
pSD0078	pSD0010 (A3-R1)	LSD0005,002 (A1-R1, A2-R1)	ClaI+XbaI
pSD0079	pSD0062 (A3-R2)	LSD0005,002 (A1-R1, A2-R1)	ClaI+XbaI
pSD0080	pSD0050 (A1-R1)	LSD0045,002 (a3, A3-R1)	BsiWI+AflII
pSD0081	pSD0050 (A1-R1)	LSD0046,002 (a3, A3-R2)	BsiWI+AflII
pSD0082	pSD0050 (A1-R1)	LSD0044,002 (A3-R1, A3-R2)	BsiWI+AflII
pSD0083	pSD0010 (A3-R1)	LSD0039,010 (A2-R1, a3)	ClaI+XbaI
pSD0084	pSD0062 (A3-R2)	LSD0039,010 (A2-R1, a3)	ClaI+XbaI
pSD0085	pSD0062 (A3-R2)	LSD0041,008 (A2-R1, A3-R1)	PflMI+XbaI
pSD0086	pSD0062 (A3-R2)	LSD0045,002 (a3, A3-R1)	PflMI+XbaI
pSD0087	LSD0039,010 (A2-R1, a3)	LSD0040,002 (A1-R1, A3-R1)	NheI+ClaI
pSD0088	LSD0039,010 (A2-R1, a3)	LSD0042,013 (A1-R1, A3-R2)	NheI+ClaI
pSD0089	LSD0044,002 (A3-R1, A3-R2)	LSD0005,002 (A1-R1, A2-R1)	ClaI+XbaI
pSD0090	LSD0044,002 (A3-R1, A3-R2)	LSD0038,001 (A1-R1, a3)	ClaI+XbaI
pSD0091	LSD0044,002 (A3-R1, A3-R2)	LSD0039,010 (A2-R1, a3)	ClaI+XbaI
pSD0092	LSD0044,002 (A3-R1, A3-R2)	pSD0077 (A1-R1, A2-R1, a3)	ClaI+XbaI
pBC0247	pSD0077	LSD0050,003	NheI+BstBI
pBC0248	pSD0078	LSD0050,003	NheI+BstBI
pBC0249	pSD0079	LSD0050,003	NheI+BstBI
pBC0250	pSD0080	LSD0050,003	NheI+BstBI
pBC0251	pSD0082	LSD0050,003	NheI+BstBI
pBC0252	pSD0080	LSD0050,003	NheI+BstBI
pBC0253	pSD0087	LSD0050,003	NheI+BstBI
pBC0254	pSD0088	LSD0050,003	NheI+BstBI
pBC0255	pSD0089	LSD0050,003	NheI+BstBI
pBC0256	pSD0090	LSD0050,003	NheI+BstBI
pBC0257	pSD0092	LSD0050,003	NheI+BstBI
pNL0022	LSD0003,009	pSD0083	XbaI+AgeI
pNL0023	LSD0003,009	pSD0084	XbaI+AgeI
pNL0024	LSD0003,009	pSD0085	XbaI+AgeI
pNL0025	LSD0003,009	pSD0086	XbaI+AgeI
pNL0030	LSD0003,009	pSD0091	XbaI+AgeI
pBC0258	LSD0003,006	pBC0247	BamHI+ClaI
pBC0259	LSD0003,006	pBC0248	BamHI+ClaI
pBC0260	LSD0003,006	pBC0249	BamHI+ClaI
pBC0261	LSD0003,006	pBC0250	BamHI+ClaI
pBC0262	LSD0003,006	pBC0251	BamHI+ClaI
pBC0263	LSD0003,006	pBC0252	BamHI+ClaI
pBC0264	LSD0003,006	pBC0255	BamHI+ClaI
pBC0265	LSD0003,006	pNL0022	BamHI+ClaI
pBC0266	LSD0003,006	pNL0023	BamHI+ClaI
pBC0267	LSD0003,006	pNL0024	BamHI+ClaI
pBC0268	LSD0003,006	pNL0025	BamHI+ClaI

Ejemplo 23: Construcción de vectores de expresión de CFXTEN con tres o cuatro XTEN: el primer XTEN en el dominio B, el segundo XTEN en el extremo C y la tercera o cuarta inserción de XTEN dentro de los dominios A1 o A2 o A3

Se construyeron colecciones de proteínas de fusión de CFXTEN con tres inserciones de XTEN combinando clones de coagulación activa con inserciones de XTEN en los dominios A1, A2 o A3 y clones con XTEN insertado dentro del dominio B y en el extremo C. Se construyeron colecciones adicionales con un cuarto XTEN añadido en los dominios A1, A2 o A3 para seleccionar miembros de las 3 colecciones de XTEN. El diseño del esquema de clonación se resume en la tabla a continuación. Se preparó el ADN para los insertos y los vectores por digestión con enzimas de restricción y purificación en gel de agarosa. Después de ligar los insertos con los vectores correspondientes, la mezcla de ADN ligado se usó para transformar células hospedadoras de *E. coli* competentes DH5α. Los transformantes se cribaron

por RCA y secuenciación para cubrir aproximadamente 3-4 veces el tamaño potencial de la colección. Se identificaron clones únicos y se hicieron en miniprep. Entonces se usaron tres digestiones de restricción distintas para confirmar adicionalmente la integridad de cada XTEN. Las secuencias de aminoácidos y las de ADN codificantes para las proteínas de fusión de CFXTEN resultantes se enumeran en la tabla 21.

Tabla 20: Diseño de clonación para colecciones de FVIII con 3 inserciones de XTEN en sitios del dominio B, extremo C y dominio A1/A2/A3

ID de la colección	Componentes del inserto (región de XTEN)	Componentes del vector (región de XTEN)	Enzimas de restricción
LSD0049	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	BamHI+AgeI
LSD0050	LSD0003.009 (dominio B y extremo C)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	BamHI+AgeI
LSD0051	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	BamHI+AgeI
LSD0052	LSD0003.009 (dominio B y extremo C)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	BamHI+AgeI
LSD0053	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0054	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	LSD0003.009 (dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0055	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0056	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	LSD0003.009 (dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0057	pSD0001 (A2-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, dominio B y extremo C)	NheI+BamHI
LSD0058	pSD0003 (A2-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, dominio B y extremo C)	NheI+BamHI
LSD0059	pNL0005 (A2-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, dominio B y extremo C)	NheI+BamHI
LSD0060	pBC0246 (A2-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, dominio B y extremo C)	NheI+BamHI
LSD0061	pSD0009 (A3-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0062	pSD0010 (A3-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0063	pNL0004 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0064	pSD0063 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0065	pNL0002 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0066	pSD0043 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0067	pNL0003 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0068	pSD0044 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0069	pSD0009 (A3-R1)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0070	pSD0010 (A3-R1)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0071	pNL0004 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0072	pSD0063 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0073	pNL0002 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0074	pSD0043 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
LSD0075	pNL0003 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI

ID de la colección	Componentes del inserto (región de XTEN)	Componentes del vector (región de XTEN)	Enzimas de restricción
LSD0076	pSD0044 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
pSD0093	pNL0004 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, dominio B y extremo C)	PflMI+XbaI
pSD0094	pSD0063 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, dominio B y extremo C)	PflMI+XbaI
pSD0095	pNL0002 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, dominio B y extremo C)	PflMI+XbaI
pSD0096	pSD0043 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, dominio B y extremo C)	PflMI+XbaI
pSD0097	pNL0003 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, dominio B y extremo C)	PflMI+XbaI
pSD0098	pSD0044 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, dominio B y extremo C)	PflMI+XbaI
pCS0001	pBC0168 (A1)	LSD0055.021 (A3-R1, dominio B y extremo C)	BsiWI+BamHI
pCS0002	pBC0134 (A2_R2)	LSD0055.021 (A3-R1, dominio B y extremo C)	BsiWI+BamHI
pCS0003	pBC0179 (C1)	LSD0055.021 (A3-R1, dominio B y extremo C)	ApaI+XbaI
pCS0004	pBC0143 (C1)	LSD0055.021 (A3-R1, dominio B y extremo C)	ApaI+XbaI
pCS0005	pBC0182 (C2)	LSD0055.021 (A3-R1, dominio B y extremo C)	ApaI+XbaI
pCS0006	pBC0144 (C2)	LSD0055.021 (A3-R1, dominio B y extremo C)	ApaI+XbaI
pBC0269	pBC0165 (A1_R1)	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	BsiWI+BamHI
pBC0270	pBC0132 (A2_R1)	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	BsiWI+BamHI
pBC0271	pBC0138 (A3_R1)	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
pBC0272	pBC0176 (A3_R2)	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
pBC0273	pSD0001 (A2_R1)	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	BsiWI+BamHI
pBC0274	pSD0009 (A3_R1)	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
pBC0275	pNL0004 (A3_R2)	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
pBC0276	pBC0280 (A1_R1)	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	BsiWI+BamHI
pBC0277	pBC0281 (A2_R1)	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	BsiWI+BamHI
pBC0278	pBC0282 (A3_R1)	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
pBC0279	pBC0283 (A3_R2)	LSD0003.006 (dominio B y extremo C)	ClaI+XbaI
L09_01	pBC0284 (CT)	pBC0285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293 (dominio B y A3_R2)	XbaI+AgeI
L09_01	pSD0014 (CT)	pBC0285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293 (dominio B y A3_R2)	XbaI+ AgeI
L09_01	pSD0020 (CT)	pBC0285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293 (dominio B y A3_R2)	XbaI+AgeI

Tabla 21: Secuencias de ADN y aminoácidos de construcciones de FVIII-XTEN

Nombre de la construcción	Secuencia de aminoácidos divulgada como la SEQ ID NO:	Secuencia de ADN divulgada como la SEQ ID NO:
pBC0114	595	596
pBC0126	597	598
pBC0127	599	600
pBC0165	601	602
pBC0183	603	604
pBC0184	605	606
pBC0166	607	608
pBC0185	609	610
pBC0167	611	612
pBC0128	613	614
pBC0168	615	616
pBC0129	617	618
pBC0169	619	620
pBC0130	621	622
pBC0131	623	624
pBC0132	625	626
pBC0170	627	628
pBC0133	629	630
pBC0171	631	632
pBC0134	633	634
pBC0172	635	636
pBC0135	637	638
pBC0149	639	640
pBC0136	641	642
pBC0137	643	644

Nombre de la construcción	Secuencia de aminoácidos divulgada como la SEQ ID NO:	Secuencia de ADN divulgada como la SEQ ID NO:
pBC0138	645	646
pBC0139	647	648
pBC0 140	649	650
pBC0173	651	652
pBC0174	653	654
pBC0175	655	656
pBC0176	657	658
pBC0177	659	660
pBC0178	661	662
pBC0141	663	664
pBC0179	665	666
pBC0180	667	668
pBC0142	669	670
pBC0143	671	672
pBC0181	673	674
pBC0182	675	676
pBC0144	677	678
pBC0145	679	680
pBC0146	681	682
pSD0001	683	684
pSD0002	685	686
pSD0003	687	688
pSD0004	689	690
pSD0005	691	692
pSD0006	693	694
pSD0007	695	696
pSD0008	697	698
pSD0009	699	700
pSD0010	701	702
pSD0011	703	704
pSD0012	705	706
pSD0013	707	708
pSD0014	709	710
pSD0017	711	712
pSD0018	713	714
pSD0019	715	716
pSD0020	717	718
pSD0015	719	720
pSD0016	721	722
pSD0021	723	724
pSD0022	725	726
pSD0023	727	728
pSD0024	729	730
pSD0025	731	732
pSD0026	733	734
pSD0027	735	736
pSD0028	737	738
pSD0029	739	740
pSD0030	741	742
pSD0031	743	744
pSD0032	745	746
pSD0033	747	748
pSD0034	749	750
pSD0035	751	752
pSD0036	753	754
pSD0037	755	756
pSD0038	757	758
pSD0039	759	760
pSD0040	761	762
pSD0041	763	764

Nombre de la construcción	Secuencia de aminoácidos divulgada como la SEQ ID NO:	Secuencia de ADN divulgada como la SEQ ID NO:
pSD0042	765	766
pSD0043	767	768
pSD0044	769	770
pSD0062	771	772
pSD0063	773	774
pSD0045	775	776
pSD0046	777	778
pSD0047	779	780
pSD0048	781	782
pSD0049	783	784
pSD0050	785	786
pSD0051	787	788
pSD0052	789	790
pSD0053	791	792
pSD0054	793	794
pSD0055	795	796
pSD0056	797	798
pSD0057	799	800
pSD0058	801	802
pSD0059	803	804
pSD0060	805	806
pSD0061	807	808
LSD0001,002	809	810
LSD0001,005	811	812
LSD0001,006	813	814
LSD0001,011	815	816
LSD0001,012	817	818
LSD0001,013	819	820
LSD0001,016	821	822
LSD0001,021	823	824
LSD0002,001	825	826
LSD0002,002	827	828
LSD0002,014	829	830
LSD0003,004	831	832
LSD0003,006	833	834
LSD0003,009	835	836
LSD0003,014	837	838
LSD0004,010	839	840
LSD0004,011	841	842
LSD0004,014	843	844
LSD0004,016	845	846
LSD0004,022	847	848
LSD0003,016	849	850
LSD0005,002	851	852
LSD0005,004	853	854
LSD0005,005	855	856
LSD0005,011	857	858
LSD0005,018	859	860
LSD0006,002	861	862
LSD0006,005	863	864
LSD0006,007	865	866
LSD0006,011	867	868
LSD0007,002	869	870
LSD0007,004	871	872
LSD0007,013	873	874
LSD0008,001	875	876
LSD0008,002	877	878
LSD0008,006	879	880
LSD0008,009	881	882
LSD0008,017	883	884

Nombre de la construcción	Secuencia de aminoácidos divulgada como la SEQ ID NO:	Secuencia de ADN divulgada como la SEQ ID NO:
LSD0002,025	885	886
LSD0002,013	887	888
LSD0003,025	889	890
LSD0004,025	891	892
LSD0003,005	893	894
LSD0007,008	895	896
LSD0044,002	897	898
LSD0044,005	899	900
LSD0044,039	901	902
LSD0044,022	903	904
LSD0044,003	905	906
LSD0044,001	907	908
LSD0038,001	909	910
LSD0038,003	911	912
LSD0038,008	913	914
LSD0038,012	915	916
LSD0038,013	917	918
LSD0038,015	919	920
LSD0039,001	921	922
LSD0039,003	923	924
LSD0039,010	925	926
LSD0045,001	927	928
LSD0045,002	929	930
LSD0042,014	931	932
LSD0042,023	933	934
LSD0042,006	935	936
LSD0042,013	937	938
LSD0042,001	939	940
LSD0042,039	941	942
LSD0042,047	943	944
LSD0042,003	945	946
LSD0042,004	947	948
LSD0042,008	949	950
LSD0042,038	951	952
LSD0042,082	953	954
LSD0042,040	955	956
LSD0037,002	957	958
LSD0037,009	959	960
LSD0037,011	961	962
LSD0047,002	963	964
LSD0047,005	965	966
LSD0048,007	967	968
LSD0046,001	969	970
LSD0046,002	971	972
LSD0046,003	973	974
LSD0040,011	975	976
LSD0040,042	977	978
LSD0040,002	979	980
LSD0040,008	981	982
LSD0040,021	983	984
LSD0040,037	985	986
LSD0040,046	987	988
LSD0040,003	989	990
LSD0040,006	991	992
LSD0040,007	993	994
LSD0040,010	995	996
LSD0040,039	997	998
LSD0040,052	999	1000
LSD0041,001	1001	1002
LSD0041,004	1003	1004

Nombre de la construcción	Secuencia de aminoácidos divulgada como la SEQ ID NO:	Secuencia de ADN divulgada como la SEQ ID NO:
LSD0041,006	1005	1006
LSD0041,008	1007	1008
LSD0041,010	1009	1010
LSD0041,014	1011	1012
LSD0041,016	1013	1014
LSD0041,035	1015	1016
LSD0043,001	1017	1018
LSD0043,002	1019	1020
LSD0043,005	1021	1022
LSD0043,006	1023	1024
LSD0043,007	1025	1026
LSD0043,008	1027	1028
LSD0043,015	1029	1030
LSD0043,029	1031	1032
LSD0043,043	1033	1034
pSD0077	1035	1036
pSD0078	1037	1038
pSD0079	1039	1040
pSD0080	1041	1042
pSD0081	1043	1044
pSD0082	1045	1046
pSD0083	1047	1048
pSD0084	1049	1050
pSD0085	1051	1052
pSD0086	1053	1054
pSD0087	1055	1056
pSD0088	1057	1058
pSD0089	1059	1060
pSD0090	1061	1062
pSD0091	1063	1064
pSD0092	1065	1066
LSD0049,002	1067	1068
LSD0049,008	1069	1070
LSD0049,011	1071	1072
LSD0049,012	1073	1074
LSD0049,020	1075	1076
LSD0049,021	1077	1078
LSD0050,002	1079	1080
LSD0050,003	1081	1082
LSD0050,007	1083	1084
LSD0050,010	1085	1086
LSD0050,012	1087	1088
LSD0050,014	1089	1090
LSD0051,002	1091	1092
LSD0051,003	1093	1094
LSD0052,001	1095	1096
LSD0052,003	1097	1098
LSD0053,021	1099	1100
LSD0053,022	1101	1102
LSD0053,024	1103	1104
LSD0054,021	1105	1106
LSD0054,025	1107	1108
LSD0054,026	1109	1110
LSD0055,021	1111	1112
LSD0055,022	1113	1114
LSD0055,026	1115	1116
LSD0056,021	1117	1118
LSD0056,024	1119	1120
LSD0056,025	1121	1122
pNL0001	1123	1124

Nombre de la construcción	Secuencia de aminoácidos divulgada como la SEQ ID NO:	Secuencia de ADN divulgada como la SEQ ID NO:
pNL0002	1125	1126
pNL0003	1127	1128
pNL0004	1129	1130
pNL0005	1131	1132
pNL0006	1133	1134
pNL0007	1135	1136
pNL0008	1137	1138
pNL0009	1139	1140
pNL0010	1141	1142
pBC0244	1143	1144
pBC0245	1145	1146
pBC0246	1147	1148
pBC0247	1149	1150
pBC0248	1151	1152
pBC0249	1153	1154
pBC0250	1155	1156
pBC0251	1157	1158
pBC0252	1159	1160
pBC0253	1161	1162
pBC0254	1163	1164
pBC0255	1165	1166
pBC0256	1167	1168
pBC0257	1169	1170
pBC0259	1171	1172
pBC0260	1173	1174
pBC0262	1175	1176
pBC0263	1177	1178
pBC0264	1179	1180
pBC0266	1181	1182
pBC0267	1183	1184
pBC0268	1185	1186
pNL0016	1187	1188
pNL0017	1189	1190
pNL0018	1191	1192
pNL0022	1193	1194
pNL0023	1195	1196
pNL0024	1197	1198
pNL0025	1199	1200
pNL0030	1201	1202
LSD0057,001	1203	1204
LSD0057,004	1205	1206
LSD0057,005	1207	1208
LSD0057,010	1209	1210
LSD0058,003	1211	1212
LSD0058,005	1213	1214
LSD0058,006	1215	1216
LSD0059,002	1217	1218
LSD0059,003	1219	1220
LSD0059,005	1221	1222
LSD0059,006	1223	1224
LSD0060,001	1225	1226
LSD0060,003	1227	1228
LSD0060,004	1229	1230
LSD0061,002	1231	1232
LSD0061,007	1233	1234
LSD0061,008	1235	1236
LSD0061,012	1237	1238
LSD0062,001	1239	1240
LSD0062,002	1241	1242
LSD0062,006	1243	1244

Nombre de la construcción	Secuencia de aminoácidos divulgada como la SEQ ID NO:	Secuencia de ADN divulgada como la SEQ ID NO:
LSD0062,007	1245	1246
LSD0063,001	1247	1248
LSD0063,003	1249	1250
LSD0063,011	1251	1252
LSD0064,017	1253	1254
LSD0064,018	1255	1256
LSD0064,020	1257	1258
LSD0064,021	1259	1260
LSD0065,001	1261	1262
LSD0065,007	1263	1264
LSD0065,014	1265	1266
LSD0066,001	1267	1268
LSD0066,002	1269	1270
LSD0066,009	1271	1272
LSD0066,011	1273	1274
LSD0067,004	1275	1276
LSD0067,005	1277	1278
LSD0067,006	1279	1280
LSD0067,008	1281	1282
LSD0068,001	1283	1284
LSD0068,002	1285	1286
LSD0068,005	1287	1288
LSD0068,010	1289	1290
LSD0069,004	1291	1292
LSD0069,008	1293	1294
LSD0070,003	1295	1296
LSD0070,004	1297	1298
LSD0070,005	1299	1300
LSD0071,001	1301	1302
LSD0071,002	1303	1304
LSD0071,008	1305	1306
LSD0072,001	1307	1308
LSD0072,002	1309	1310
LSD0072,003	1311	1312
LSD0073,002	1313	1314
LSD0073,004	1315	1316
LSD0073,006	1317	1318
LSD0074,007	1319	1320
LSD0074,010	1321	1322
LSD0074,011	1323	1324
LSD0075,003	1325	1326
LSD0075,004	1327	1328
LSD0075,007	1329	1330
LSD0076,002	1331	1332
LSD0076,003	1333	1334
pSD0093	1335	1336
pSD0094	1337	1338
pSD0095	1339	1340
pSD0096	1341	1342
pSD0097	1343	1344
pSD0098	1345	1346
pSD0099	1347	1348
pSD0100	1349	1350
pSD0101	1351	1352
pSD0102	1353	1354
pSD0103	1355	1356
pSD0104	1357	1358
pCS0001	1359	1360
pCS0002	1361	1362
pCS0003	1363	1364

Nombre de la construcción	Secuencia de aminoácidos divulgada como la SEQ ID NO:	Secuencia de ADN divulgada como la SEQ ID NO:
pCS0004	1365	1366
pCS0005	1367	1368
pCS0006	1369	1370
pBC0269	1371	1372
pBC0270	1373	1374
pBC0271	1375	1376
pBC0272	1377	1378
pBC0273	1379	1380
pBC0274	1381	1382
pBC0275	1383	1384
pBC0276	1385	1386
pBC0277	1387	1388
pBC0278	1389	1390
pBC0279	1391	1392
pBC0280	1393	1394
pBC0281	1395	1396
pBC0282	1397	1398
pBC0283	1399	1400
pBC0284	1401	1402
pBC0285	1403	1404
pBC0286	1405	1406
pBC0287	1407	1408
pBC0288	1409	1410
pBC0289	1411	1412
pBC0290	1413	1414
pBC0291	1415	1416
pBC0292	1417	1418
pBC0293	1419	1420
pBC0294	1421	1422
pBC0295	1423	1424
pBC0296	1425	1426
pBC0297	1427	1428
pBC0298	1429	1430
pBC0299	1431	1432
pBC0300	1433	1434
pBC0301	1435	1436
pBC0302	1437	1438
pBC0303	1439	1440
pBC0304	1441	1442
pBC0305	1443	1444
pBC0306	1445	1446
pBC0307	1447	1448
pBC0308	1449	1450
pBC0309	1451	1452
pBC0310	1453	1454
pBC0311	1455	1456
pBC0312	1457	1458
pBC0313	1459	1460
pBC0314	1461	1462
pBC0315	1463	1464
pBC0316	1465	1466
pBC0317	1467	1468
pBC0318	1469	1470
pBC0319	1471	1472
pBC0320	1473	1474
pBC0321	1475	1476
PBC0322	1477	1478
PBC0323	1479	1480
pNL0040	1481	1482
pNL0041	1483	1484

Nombre de la construcción	Secuencia de aminoácidos divulgada como la SEQ ID NO:	Secuencia de ADN divulgada como la SEQ ID NO:
pNL0042	1485	1486
pNL0043	1487	1488

Ejemplo 24: Transfección de células de mamífero, expresión de FVIII-XTEN y evaluación de actividad de FVIII

Las células de mamífero incluyendo, aunque sin limitación, CHO, BHK, COS y HEK293, son adecuadas para su transformación con los vectores de los ejemplos, anteriores, para expresar y recuperar la proteína de fusión de FVIII-XTEN. Los siguientes son detalles para métodos usados para expresar las construcciones de BDD FVIII y de la proteína de fusión de FVIII-XTEN pBC0114, pBC0135, pBC0136, pBC0137, pBC0145, pBC0146 y pBC0149 por transfección transitoria, que incluye electroporación y métodos de transfección química (PEI).

Se revivieron células HEK293 adherentes adquiridas de la ATCC en el medio recomendado por el proveedor y se pasaron unas pocas generaciones antes de congelar múltiples viales en el medio con DMSO al 5 %. Un vial se revivió y se pasó una vez más antes de la transfección. Las células HEK293 se sembraron en placa 1-2 días antes de la transfección a una densidad de aproximadamente 7 x 10^5 por ml en un T175 por transfección, usando 35 ml de medio. En el día de la transfección, las células se trataron con tripsina, se desprendieron y se contaron, después se aclararon en el medio hasta que se consiguió una suspensión celular uniforme. Las células se contaron y se transfirió un volumen apropiado de células (basándose en el recuento celular anterior) a un tubo de centrífuga de 50 ml, de modo que hubiera aproximadamente 4 x 10^6 células por transfección. Las células se centrifugaron durante 5 min a 500 RCF, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 10 ml de D-PBS.

Electroporación: Para la electroporación, se añadió un volumen apropiado de tampón de resuspensión usando una micropipeta (apretada en el kit de 100 µl del sistema de transfección Neon™), de modo que había 110 µl de tampón disponibles por transfección. Se añadieron volúmenes separados de 110 µl de suspensión celular a cada tubo Eppendorf que contenía 11 µl de ADN plasmídico para cada una de las construcciones de FVIII-XTEN individuales para un total de 6 µg (el volumen de ADN puede ser menor, c.s. hasta 11 µl con H2O estéril). Se usó un dispositivo de transfección Neon™ para la transfección. El programa se ajustó para electroporación a 1100 v para una anchura de impulso de 20 ms, para un total de dos impulsos. Un tubo Neon™ (aportado en el kit de 100 µl del sistema de transfección Neon™) en la estación de pipeteo Neon™. Se añadió un volumen de 3 ml de tampón electrolítico E2 (aportado en el kit de 100 µl del sistema de transfección Neon™) al tubo Neon™. Se usaron pipetas Neon™ y puntas de 100 µl Neon™ para electroporar 100 µl de mezcla de ADN celular-plasmídico usando la estación de pipeteo Neon™. La electroporación se ejecutó y, cuando estuvo completa, la pipeta Neon™ se retiró de la estación y la pipeta con las células transfectadas se usó para transferir las células, con un movimiento circular, a una placa de Petri de 100 mm x 20 mm que contenía 10 ml de medio Opti-MEM I de suero reducido (1X, Invitrogen), de modo que las células transfectadas se distribuyeran uniformemente en la placa. Las células para cada transfección se incubaron a 37 °C para la expresión. En el día 3 después de la transfección, un volumen de un 10 % de disolución salina de Hepes 10 mM, $CaCl_2$ 5 mM y NaCl 4 M se añadió a cada cultivo celular y se mezcló suavemente durante 30 minutos. Cada cultivo celular se transfirió a un tubo de centrífuga cónico de 50 ml y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes para cada cultivo se colocaron en un nuevo tubo cónico de 50 ml y después se dividieron en alícuotas de 5 x 1 ml en tubos Eppendorf y 2 x 15 ml en tubos cónicos para ensayo o se congelaron rápidamente antes de ensayar la expresión de FVIII-XTEN en ELISA y el rendimiento en un ensayo de actividad de FVIII, como se describe en la presente memoria.

Transfección química: La transfección química puede conseguirse usando métodos convencionales en la técnica. En el presente ejemplo, se utiliza PEI, como se describe.

Se siembran células 293 en suspensión el día antes de la transfección a 7 x 10^5 células/ml en suficiente medio Freestyle 293 (Invitrogen) para proporcionar al menos 30 ml de volumen de trabajo, y se incuban a 37 °C. En el día de la transfección, una alícuota de 1,5 ml del medio de transfección se mantiene a temperatura ambiente, a la que se añaden 90 µl de 1 mg/ml de PEI y se agitan con vórtice brevemente. Se añade un volumen de 30 µl de ADN que codifica la construcción de FVIII-XTEN_AE288 (concentración de 1 mg/ml) a la disolución de PEI, que se agita con vórtice durante 30 s. La mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 5-15 min. La mezcla de ADN/PEI se añade a las células HEK293 y la suspensión se incuba a 37 °C usando condiciones de matraz de agitación preestablecidas. Aproximadamente cuatro horas después de la adición de la mezcla de ADN/PEI, se añade un volumen 1x de medio de expansión y las células se incuban a 37 °C durante 5 días. En el día de la recolección, se añade un volumen de un 10 % de disolución salina de Hepes 10 mM, $CaCl_2$ 5 mM y NaCl 4 M al cultivo celular y se mezcla suavemente durante 30 minutos. El cultivo celular se transfiere a un tubo de centrífuga cónico de 50 ml y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se coloca en un tubo cónico de 50 ml nuevo y después se divide en alícuotas de 5 x 1 ml en tubos Eppendorf y 2 x 15 ml en tubos cónicos para ensayo o se congelan rápidamente antes de ensayar la expresión de FVIII-XTEN en ELISA y/o el rendimiento en un ensayo de actividad de FVIII, como se describe en la presente memoria.

Generación de combinaciones estables y líneas celulares que producen FVIII-XTEN

Las combinaciones estables se generan cultivando células transfectadas durante 3-5 semanas en medio que contiene antibióticos de selección tales como puromicina, con cambio del medio cada 2-3 días. Las células estables pueden usarse para producción o generación de clones estables. Para la selección de líneas celulares estables durante el cribado principal, las células de las combinaciones estables de pases en curso o recuperadas de viales congelados se siembran en placas de 96 pocillos a una densidad diana de 0,5 células/pocillo. Aproximadamente 1 semana después de la siembra, el medio usado de los pocillos con grupos de células individuales observados al microscopio se ensaya para la expresión de FVIII por ensayo de actividad o medición de antígeno.

Para rondas adicionales de cribado, se siembran números normalizados de células en placas de múltiples pocillos. El medio usado se recoge y se ensaya para la concentración de FVIII por ELISA y ensayo de actividad de FVIII. Las células también se recogerían de las placas y se contarían usando Vi-Cell. Los clones se clasifican por (1) las concentraciones de FVIII de acuerdo con ELISA y la actividad; (2) las relaciones del valor de ELISA/recuento celular y el valor de actividad/recuento celular; y (3) la integridad y homogeneidad de los productos producidos por los clones como se mide por transferencia de Western. Se seleccionan varios clones para cada una de las construcciones del cribado principal para rondas adicionales de cribado.

Para la segunda ronda de cribado, las células en las placas de 96 pocillos para los mejores clones seleccionados del cribado principal se expanden en primer lugar en matraces T25 y después se siembran en placas de 24 pocillos duplicadas. El medio usado se recoge de las placas para la actividad de FVIII y la cuantificación de antígeno y las células se recogen y se cuentan por Vi-Cell. Los clones se clasifican y después se seleccionan de acuerdo con los valores por ELISA y ensayo de actividad, valor de ELISA/célula y relaciones de valor de actividad/recuento celular. Se preparan viales congelados para al menos 5-10 clones y de nuevo estos clones se cribaron y clasificaron de acuerdo con los valores por ELISA y la actividad, y las relaciones de valor de ELISA/recuento celular y valor de actividad/recuento celular, y la integridad del producto y la homogeneidad por transferencia de Western, y se seleccionan 2-3 clones para la evaluación de la productividad en matraces de agitación. Los clones finales se seleccionan basándose en la productividad específica y la calidad del producto.

Producción de FVIII-XTEN secretado en medio de cultivo celular por clones estables 293 en suspensión

Los clones celulares estables HEK293 seleccionados por los métodos anteriores se siembran en matraces de agitación a 1-2 x 10^5 células/ml en medio de expresión. El recuento celular, la viabilidad celular, la actividad de FVIII y los valores de expresión de antígeno se controlan diariamente. En el día en que la actividad de FVIII y las concentraciones de antígeno y la calidad del producto son óptimas, el cultivo se recoge por centrifugación/filtración estéril o filtración profunda/filtración estéril. El filtrado se usa inmediatamente para procesamiento por filtración el flujo tangencial (TFF) y purificación o se almacena en congelador a -80 °C para procesamiento por TFF y purificación posteriores.

Ejemplo 25: Purificación y caracterización de construcciones de CFXTEN

A continuación, siguen métodos ejemplares para la purificación y caracterización de construcciones de CFXTEN con uno o más XTEN.

Purificación de FVII-XTEN AE864 por cromatografía de afinidad por FVIII

Se filtra sobrenadante que contiene CFXTEN usando un filtro Cuno ZetaPlus Biocap y una cápsula Cuno BioAssure y posteriormente se concentra por filtración en flujo tangencial usando un cartucho Millipore Pellicon 2 Mini con un PCPM de a 30 000 Da. Usando el mismo cartucho de filtración en flujo tangencial, se diafiltra la muestra en histidina 10 mM, cloruro de calcio 20 mM, cloruro de sodio 300 mM y Tween 80 al 0,02 % a pH 7,0. La resina FVIIISelect (GE 17-5450-01) se une selectivamente a FVIII o FVIII con dominio B eliminado usando un ligando de proteína recombinante 13 kDa acoplado a una resina de cromatografía. La resina se equilibra con histidina 10 mM, cloruro de calcio 20 mM, cloruro de sodio 300 mM y Tween 80 al 0,02 % a pH 7,0 y se carga el sobrenadante. La columna se lava con histidina 20 mM, cloruro de calcio 20 mM, cloruro de sodio 300 mM y Tween 80 al 0,02 % a pH 7,0, entonces se lava con histidina 20 mM, cloruro de calcio 20 mM, cloruro de sodio 1,0 M y Tween 80 al 0,02 % a pH 7,0, y se eluye con histidina 20 mM, cloruro de calcio 20 mM, cloruro de sodio 1,5 M y Tween 80 al 0,02 % disuelto en etilenglicol al 50 % a pH 7,0.

Concentración e intercambio de tampón mediante filtración en flujo tangencial y diafiltración

Lotes de sobrenadante que hacen un total de al menos 10 l en volumen, de líneas celulares CHO estables que expresan CFXTEN se filtran usando un filtro Cuno ZetaPlus Biocap y una cápsula Cuno BioAssure. Posteriormente se concentran aproximadamente 20 veces por filtración en flujo tangencial usando un cartucho Millipore Pellicon 2 Mini con un PCPM de 30 000 Da. Usando el mismo cartucho de filtración en flujo tangencial, se diafiltra la muestra con histidina 10 mM, cloruro de calcio 20 mM, cloruro de sodio 300 mM y Tween 80 al 0,02 % a pH 7,0 Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM con 5 volúmenes de valor de intercambio de tampón. Las muestras se dividen en alícuotas de 50 ml y se congelan a -80 °C.

Purificación de CFXTEN por cromatografía de intercambio aniónico

Usando un sistema de FPLC Akta, la muestra se purifica usando una columna SuperQ-650M. La columna se equilibra en tampón A (0,02 mol/l de imidazol, 0,02 mol/l de hidrocloruro de éster etílico de glicina, 0,15 mol/l de NaCl, glicerol al 2,5 %, pH 6,9) y se carga la muestra. La muestra se eluye usando tampón B (5 mmol/l de histidina HCl (His/HCl), 1,15 mol/l de NaCl, pH 7,0). El cromatograma de 215 nm se usa para controlar el perfil de elución. Las fracciones eluidas se ensayan para FVIII por ELISA, SDS-PAGE o ensayo de actividad. Las fracciones del pico se combinan y se almacenan o someten a activación de trombina inmediatamente (O'Brien *et al*., Blood (1990) 75:1664-1672). Las fracciones se ensayan para la actividad de FVIII usando un ensayo de factor basado en aPTT. Se realiza un ensayo de Bradford para determinar la cantidad total de proteína en las fracciones de carga y elución.

Purificación de CFXTEN por cromatografía de interacción hidrófoba

Muestras de CFXTEN en tampón A (50 mmol/l de histidina, 1 mmol/l de CaCl2, NaCl 1 M y 0,2 g/l de Tween 80®, pH 7,0) se cargan en una resina de éter toyopearl 650M equilibrada en tampón A. La columna se lava con 10 volúmenes de columna de tampón A para eliminar el ADN, las formas plegadas incorrectamente y FVIII, y otras proteínas contaminantes. La CFXTEN se eluye con tampón B (25 mmol/l de histidina, 0,5 mmol/l de CaCl2 y 0,4 mol/l de NaCl, pH 7,0) como elución de una sola etapa (patente de Estados Unidos 6005082). Las fracciones se ensayan para la actividad de FVIII usando un ensayo de factor basado en aPTT. Se realiza un ensayo de Bradford para determinar la cantidad total de proteína en las fracciones de carga y elución.

Eliminación de proteína agregada de CFXTEN monomérica con cromatografía de intercambio aniónico

Usando un sistema de FPLC Akta, la muestra se purifica usando una columna macrocap Q. La columna se equilibra en tampón A (MES 20 mM, CaCl2 1 mM, pH 7,0) y se carga la muestra. La muestra se eluye usando un gradiente lineal de un 30 % a un 80 % de tampón B (MES 20 mM, CaCl2 1 mM, pH 7,0 + NaCl 500 mM) sobre 20 volúmenes de columna. El cromatograma de 215 nm se usa para controlar el perfil de elución. Las fracciones correspondientes a la parte inicial de la elución contienen principalmente proteína monomérica, mientras que la parte final de la elución contiene principalmente las especies agregadas. Las fracciones de la columna macrocapQ se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaño con columna BioSep G4000 de 60 cm para determinar lo que combinar para crear una muestra sin agregado.

Activación de FVIII por trombina

FVIII purificado en 5 mmol/l de histidina HCl (His/HCl), 1,15 mol/l de NaCl, pH 7,0 se trata con trombina a una relación de 1:4 de unidades de trombina humana a unidades de FVIII, y la muestra se incuba a 37 °C durante hasta 2 horas. Para controlar el proceso de activación, se extraen entonces alícuotas de esta muestra, y se precipitan en acetona mediante la adición de 4,5 volúmenes de acetona helada. La muestra se incuba en hielo durante 10 minutos, y el precipitado se recoge por centrifugación a 13 000 g en una microcentrífuga durante 3 minutos. La acetona se retira, y el precipitado se resuspende en 30 µl de tampón de muestra de SDS-PAGE reductor y se hierve durante 2 minutos. Las muestras entonces se ensayan por SDS-PAGE o transferencia de Western. La conversión de FVIII en FVIIIa se examina buscando la conversión de la cadena pesada en fragmentos de 40 y 50 kDa y la conversión de la cadena ligera en un fragmento de 70 kDa (O'Brien *et al*., Blood (1990) 75:1664-1672).

Análisis por SEC de CFXTEN

El FVII-XTEN purificado por cromatografía de afinidad e intercambio aniónico se analiza por cromatografía de exclusión por tamaño con columna BioSep G4000 de 60 cm. Una población monodispersada con un radio hidrodinámico de ~10 nm/PM aparente de ~1,7 MDa (fusión de XTEN-288) o ~12 nm/un PM aparente de 5,3 MDa (fusión de XTEN-864) es indicativa de una muestra sin agregación. Se espera que la CFXTEN tenga un peso molecular aparente de hasta o de aproximadamente 8 (para una fusión de XTEN-288 con FVIII) o de hasta o de aproximadamente ~15 (para una fusión de XTEN-864 con FVIII).

Determinación de la concentración basada en ELISA de CFXTEN

La determinación cuantitativa de concentraciones de antígeno de factor VIII/CFXTEN usando el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) de doble anticuerpo se realiza usando emparejamientos de anticuerpos verificados (kit de antígeno de FVIII VisuLize™, Affinity Biologicals, Ontario Canadá). Se prerrecubren pocillos en tiras con anticuerpo policlonal de oveja contra FVIII humano. Las muestras de plasma se diluyen y se aplican a los pocillos. El antígeno de FVIII que está presente se une al anticuerpo recubierto. Después de eliminar por lavado el material no unido, se aplica anticuerpo detector de oveja marcado con peroxidasa y se deja que se una al FVIII capturado. Los pocillos se lavan de nuevo y se aplica una disolución de TMB (el sustrato de peroxidasa tetrametilbenzidina) y se deja que reaccione durante un periodo fijo de tiempo. Se revela un color azul que cambia a amarillo tras interrumpir la reacción con ácido. El color formado se mide espectrofotométricamente en un lector de microplacas a 450 nm. La absorbancia a 450 nm es directamente proporcional a la cantidad de antígeno de FVIII capturado en el pocillo. El

ensayo se calibra usando el plasma calibrador proporcionado en el kit o sustituyendo un patrón de CFXTEN en una matriz apropiada.

Evaluación de la actividad de CFXTEN mediante un ensayo de sustrato cromógeno acoplado a FXa

Usando el factor VIII Chromogenix Coamatic (Chromogenix, cat. n.º 82258563) se evalúa la actividad de FVIII o CFXTEN que comprende FVIII de la siguiente manera. En presencia de iones de calcio y fosfolípidos, se activa el factor X en factor Xa mediante factor IXa. Esta activación se estimula enormemente por el factor VIII que actúa como cofactor en esta reacción. Usando cantidades óptimas de Ca^{2+}, fosfolípido y factor IXa, y un exceso de factor X, la tasa de activación de factor X se relaciona linealmente con la cantidad de factor VIII. El factor Xa hidroliza el sustrato cromógeno S-2765, liberando, por tanto, el grupo cromóforo, pNA. El color entonces se lee espectrofotométricamente a 405 nm. El factor Xa generado y, por tanto, la intensidad del color es proporcional a la actividad de factor VIII en la muestra. La hidrólisis de S-2765 por la trombina formada se evita mediante la adición del inhibidor sintético de trombina I-2581 junto con el sustrato. La actividad de una muestra desconocida se determina comparando A405 final de esa muestra con las de una curva patrón construida a partir de cantidades conocidas de FVIII. También determinando la cantidad de antígeno de FVIII presente en las muestras (mediante A280 o ELISA), se determina una actividad específica de una muestra para comprender la potencia relativa de una preparación particular de FVIII. Esto posibilita evaluar la eficacia relativa de diferentes estrategias de aislamiento o diseños de construcción para fusiones de CFXTEN para la actividad y clasificarlas.

Ensayos basados en aPTT para la determinación de la actividad de CFXTEN

CFXTEN actúan remplazando FVIII en la vía de coagulación intrínseca o activada por contacto. La actividad de esta vía de coagulación se evalúa usando un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). La actividad de FVIII se mide específicamente de la siguiente manera: se prepara una curva patrón diluyendo plasma de control normal (Pacific Hemostasis cat. n.º 100595) dos veces con plasma deficiente de FVIII (cat. n.º 100800) y después realizando 6 diluciones en serie de factor 4 de nuevo con plasma deficiente de factor VIII. Esto crea una curva patrón con puntos en 500, 130, 31, 7,8, 2,0, 0,5 y 0,1 UI/ml de actividad, donde una unidad de actividad se define como la cantidad de FVIIIC en 1 ml de plasma humano normal. También se incluye un plasma deficiente de FVIII para determinar el nivel de fondo de actividad en el plasma nulo. La muestra se prepara añadiendo CFXTEN a plasma deficiente de FVIII a una relación de 1:10 en volumen. Las muestras se ensayan usando un ensayo de aPTT de la siguiente manera. Las muestras se incuban a 37 °C en un espectrofotómetro de lector de placas Molecular Devices durante 2 minutos, punto en que se añade un volumen igual de reactivo de aPTT (Pacific Hemostasis cat. n.º 100402) y se realiza una incubación adicional de 3 minutos a 37 °C. Después de la incubación, el ensayo se activa añadiendo un volumen de cloruro de calcio (Pacific Hemostasis cat. n.º 100304). La turbidez se controla a 450 nm durante 5 minutos para crear perfiles de reacción. El tiempo de aPTT, o el tiempo hasta la aparición de actividad coagulante, se define como el primer momento donde la DO 405 nm aumentaba en 0,06 sobre la medida inicial. Se crea una curva patrón logarítmica lineal con el logaritmo de la actividad que relaciona la linealidad con el tiempo de aPTT. A partir de esto, se determina la actividad de la muestra en el pocillo de la placa y después se determina la actividad de la muestra multiplicando por 11 para considerar la dilución en el plasma deficiente de FVIII. También determinando la cantidad de antígeno de FVIII presente en las muestras (mediante A280 o ELISA), se puede determinar una actividad específica de una muestra para comprender la potencia relativa de una preparación particular de FVIII. Esto posibilita clasificar la eficacia relativa de diferentes estrategias de aislamiento o diseños de construcción para fusiones de CFXTEN.

Análisis de transferencia de Western de las proteínas expresadas de FVIII / FVIII-XTEN

Las muestras se procesaron en un gel de SDS homogéneo al 8 % y posteriormente se transfirieron a membrana de PVDF. Las muestras en los carriles 1-15 fueron: Patrones de PM, FVIII (42,5 ng), pBC0100B, pBC0114A, pBC0100, pBC0114, pBC0126, pBC0127 (8/5/11; n.º 9), pBC0128, pBC0135, pBC0136, pBC0137, pBC0145, pBC0149 y pBC0146, respectivamente. La membrana se bloqueó inicialmente con leche al 5 %, después se sondeó con anticuerpo monoclonal anti-FVIII, GMA-012, específico para el dominio A2 de la cadena pesada (Ansong C, Miles SM, Fay PJ.J Thromb Haemost. 2006 abril; 4(4):842-7). La inserción de XTEN288 en el dominio B se observó para pBC0136 (carril 8, FIG. 22) y pBC0137 (carril 9, FIG. 22), mientras que la inserción de XTEN288 en el extremo C se observó para pBC0146 (carril 12, FIG. 22). Todas las proteínas de FVIII-XTEN ensayadas revelaron la presencia de proteína monocatenaria con peso molecular de al menos 21 kDa mayor que el de la construcción básica pBC0114 o patrón de FVIII. Además, la inserción AE42 se observó para pBC0135 (carril 7, FIG. 22) y pBC0149 (carril 11, FIG. 22) con la cadena individual desplazándose a ~5 kDa más que la proteína fundamental pBC0114 y con la cadena pesada desplazándose a ~5 kDa más que la banda de 90 kDa de la proteína fundamental.

Ensayo de FVIII expresado por ELISA

Para verificar y cuantificar la expresión de proteínas de fusión de FVIII-XTEN de las construcciones por cultivo celular, se estableció un ensayo de ELISA. Se inmovilizaron anticuerpos de captura, SAF8C-AP (Affinity Biologicals), o GMA-8002 (Green Mountain Antibodies), o anticuerpos GMA011 (Green Mountain Antibodies) para FVIII-LC ELISA) o anticuerpos GMA016 en los pocillos de una placa de ELISA. Los pocillos entonces se incubaron con tampón de

bloqueo (PBS 1x/BSA al 3 %) para evitar la unión no específica de otras proteínas al anticuerpo anti-FVIII. Entonces se incubaron diluciones del patrón de FVIII (intervalo de ~50 ng-0,024 ng), controles de calidad y muestras de medio de cultivo celular durante 1,5 h en los pocillos para permitir la unión de la proteína de FVIII expresada al anticuerpo recubierto. Los pocillos entonces se lavaron ampliamente, y la proteína unida entonces se incuba con anticuerpo de detección anti-FVIII, SAF8C-biotinilado (Affinity Biologicals). Después se añade estreptavidina-HRP, que se une a la biotina conjugada al anticuerpo de detección de FVIII, al pocillo y se incuba durante 1 h. Finalmente, se añade sustrato OPD a los pocillos y se controla su hidrólisis por la enzima HRP con un lector de placas a 490 nm de longitud de onda. Entonces se calculan las concentraciones de muestras que contienen FVIII comparando la respuesta colorimétrica a cada dilución de cultivo con una curva patrón. Los resultados, en la tabla 22, a continuación, muestran que FVIII-XTEN de las diversas construcciones se expresan a 0,4 - 1 µg/ml en el medio de cultivo celular. Los resultados obtenidos por ELISA y los datos de actividad indican que las proteínas de fusión de FVIII-XTEN se expresaban muy bien usando los métodos de transfección descritos. Además, en las condiciones experimentales, los resultados demuestran que los valores de actividad específica de las proteínas de FVIII-XTEN eran similares o mayores que los de la construcción básica pBC0114 (que expresa BDD FVIII) y apoyan que la inserción de XTEN en el extremo C o el dominio B de FVIII provoca la conservación de la función de la proteína de FVIII.

Ensayo de actividad cromogénica para la proteína de fusión de CFXTEN

Las construcciones de BDD FVIII y la proteína de fusión de CFXTEN pBC0114, pBC0135, pBC0136, pBC0137, pBC0145, pBC0146 y pBC0149, en diversas configuraciones, incluyendo XTEN AE288 y AG288 insertados en el extremo C de la secuencia de FVIII BDD y proteínas de fusión de FVIII-XTEN con AE42 y AE288 insertados después del residuo 745 (o residuo 743) y antes del residuo 1640 (o residuo 1638) del dominio B (incluyendo construcciones con el sitio de procesamiento P1648 mutado en alanina), se expresaron en células Freestyle 293 transfectadas de forma transitoria, como se describe anteriormente, y se ensayaron para la actividad procoagulante. La actividad procoagulante de cada una de las proteínas de FVIII-XTEN presentes en medio de cultivo celular se evaluó usando un ensayo de factor VIII Chromogenix Coamatic®, un ensayo en que la activación del factor X se relacionaba linealmente con la cantidad de factor VIII en la muestra. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando el método de punto final, que se midió espectrofotométricamente a DO 405 nm. Se creó una curva patrón usando proteína de FVIII purificada a concentraciones de 250, 200, 150, 100, 75, 50, 37,5, 25, 12,5, 6,25, 3,125 y 1,56 mU/ml. Se prepararon diluciones de patrón de factor VIII, controles de calidad y muestras con tampón de ensayo y medio de cultivo de PEI para considerar el efecto del medio en el rendimiento del ensayo. Los controles positivos consisten en proteína de factor VIII purificada a concentraciones de 20, 40 y 80 mU/ml y medio de cultivo celular de la construcción básica de FVIII pBC0114, que carece de inserciones de XTEN. Los controles negativos consistían en tampón de ensayo o medio de cultivo de PEI en solitario. El medio de cultivo celular de las construcciones de FVIII-XTEN se obtuvo como se describe anteriormente, y se ensayaron en réplicas a diluciones de 1:50, 1:150 y 1:450 y se calculó la actividad de cada una en U/ml. Cada construcción de FVIII-XTEN mostraba actividad procoagulante que era al menos comparable y, en algunos casos, mayor que la del control positivo de construcción básica, y apoya que, en las condiciones de los experimentos, la unión de XTEN, incluyendo AE288 o AG288, en el extremo C de FVIII o la inserción de XTEN, incluyendo AE42 o AE288 dentro del dominio B provocaba la retención o incluso la potenciación de la actividad procoagulante de FVIII.

Tabla 22: Resultados de ELISA y ensayos cromogénicos de actividad de FVIII

Construcción de FVIII-XTEN	Actividad (UI/ml)	Concentración (µg/ml)	Actividad específica (UI/mg)	Descripción de la construcción
pBC0114	3,0	0,6	5000	Construcción básica de BDD FVIII usada para inserciones de XTEN
pBC0146	7,4	0,6	12759	Construcción de FVIII con XTEN AG288 insertado en el extremo C de FVIII
pBC0145	3,1	0,6	4844	Construcción de FVIII con XTEN AE288 insertado en el extremo C de FVIII
pBC0135	4,0	1,0	4124	Construcción de FVIII con XTEN AE42 insertado entre el residuo 745 y 1640
pBC0149	4,9	0,9	5581	Construcción de FVIII con XTEN AE42 insertado entre el residuo 745 y 1640 y con mutación de Arg1648 en Ala
pBC0136	2,7	0,4	7670	Construcción de FVIII con XTEN AE288 insertado entre el residuo 745 y 1640
pBC0137	1,9	0,3	6013	Construcción de FVIII con XTEN AE288 insertado entre el residuo 745 y 1640 y con mutación de Arg1648 en Ala

Ensayo de Coatest para ensayo de actividad de muestra de cultivo celular que contiene proteína de fusión de CFXTEN

Usando el ensayo de Coatest, se evalúa la actividad de FVIII o CFXTEN que comprende FVIII de la siguiente manera.

Matriz de ensayo: Todos los pocillos de la misma placa se ajustaron al mismo porcentaje de medio para controlar los efectos de la matriz. Las muestras de ensayo se diluyeron de modo que la lectura de DO405 estuviera dentro del intervalo lineal del patrón. El intervalo de concentraciones para el patrón de FVIII fue de 100 mU/ml a 0,78 mU/ml, preparado por diluciones en serie de factor cuatro del patrón de FVIII en tampón IX Coatest (DiaPharma) más el porcentaje predeterminado de medio de cultivo.

El envase de reactivo Coatest SP FVIII (DiaPharma) incluye la disolución madre de tampón Coatest 10x, factor IXa + factor X, fosfolípido, $CaCl_2$ y sustrato. La disolución Coatest 1x se preparó añadiendo un volumen 9X de ddH_2O fría a un volumen IX de la reserva. El medio de cultivo celular entonces se añadió a la disolución IX preparada a una relación predeterminada para normalizar el porcentaje de matriz en todos los pocillos de ensayo. El factor IXa + factor X, fosfolípido y sustrato se reconstituyeron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Procedimiento de ensayo de Coatest:

Los reactivos de ensayo se prepararon y mantuvieron en huelo hasta necesitarse. Se añadieron 25 µl de las muestras de ensayo diluidas y los patrones a una placa de 96 pocillos por duplicado. Se añadieron 50 µl de fosfolípido/factor IXa/factor X a cada pocillo y se mezclaron golpeando suavemente el lateral de la placa. Las placas se incubaron a 37 °C durante 5 min en un calientaplacas de 37 °C. Se añadieron 25 µl de $CaCl_2$ a cada pocillo y se mezclaron. Las placas se incubaron a 37 °C durante 5 min en un calientaplacas. Entonces se añadieron 50 µl de sustrato a cada pocillo, se mezclaron y las placas se incubaron a 37 °C durante 5-10 min adicionales hasta que el patrón superior reveló una lectura de DO405 de aproximadamente 1,5. Se añadieron 25 µl de ácido acético al 20 % a cada pocillo con mezcla para detener la reacción y los pocillos se leyeron a DO405 usando un espectrofotómetro SpectraMAX® plus (Molecular Devices). El análisis de los datos se realizó usando el programa SoftMax (versión 5.2). El LLOQ varió por ensayo, pero en general fue 0,0039 UI/ml.

Resultados: Los datos se presentan en las tablas 23-26. La tabla 23 presenta los resultados de proteínas de fusión de CFXTEN con XTEN insertado en sitios individuales elegidos basándose en criterios descritos en la presente memoria, incluyendo el ejemplo 34. El control positivo de FVIII pBC00114 mostró buena expresión y actividad de FVIII. De las 106 proteínas de fusión de un solo XTEN ensayadas, un 68 % retuvo actividad de FVIII medida, mostrando, un 30 %, actividad 3+ a 4+ en el ensayo de coagulación. Un treinta y uno por ciento de las proteínas de fusión ensayadas obtuvo resultados por debajo de los límites de cuantificación (lo que puede deberse a una escasa expresión, reflejada en los correspondientes resultados de ELISA de expresión). Las cuatro construcciones de inserción en el dominio B mostraron buena actividad, igual que las construcciones unidas al extremo C, lo que indica que estos son probablemente sitios de inserción favorables.

Los resultados de los datos de sitio de inserción individual guiaron la creación de construcciones de XTEN con 2 inserciones XTEN, cuyos resultados se presentan en la tabla 24. Globalmente, la tasa de positividad fue de un 67 %, mostrando, un 31 % de las proteínas de fusión, actividad 3+ a 4+ en el ensayo de coagulación.

Los resultados de los datos anteriores guiaron la creación de construcciones de XTEN con 3 inserciones XTEN, cuyos resultados se presentan en la tabla 25. Globalmente, un 92 % de las muestras tenía actividad de FVIII medible, mostrando completamente un 79 % actividad 3+ a 4+ en el ensayo de coagulación.

Se creó un número limitado de construcciones con 4 XTEN insertados en los dominios A1, A2 y A3 y se ensayaron, mostrando 4 de las 5 actividad de FVIII (tabla 26), lo que sugiere que la inserción de múltiples XTEN no compromete la capacidad de las proteínas de fusión resultantes de retener la actividad de FVIII.

Conclusiones: En las condiciones de los experimentos, los resultados respaldan que los criterios usados para seleccionar los sitios de inserción de XTEN son válidos, que la inserción de uno o más XTEN en los sitios seleccionados de FVIII es más probable que no provoque retención de la actividad procoagulante de la molécula de CFXTEN resultante, y que la inserción de tres XTEN parece provocar mayor proporción de proteínas de fusión que retienen altos niveles de actividad procoagulante de FVIII en comparación con construcciones con una o dos inserciones de XTEN.

Tabla 23: Resultados de ensayos de actividad de coagulación para CFXTEN que comprende un XTEN

Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Actividad	ELISA de expresión
pBC0114			+++	+++
3	A1	pBC0126	LLOQ*	LLOQ
3	A1	pBC0127	+	+
18	A1	pBC0165	++	++
22	A1	pBC0183	+++	++
26	A1	pBC0184	++	++

Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Actividad	ELISA de expresión
40	A1	pBC0166	++	++
60	A1	pBC0185	LLOQ	LLOQ
116	A1	pBC0167	LLOQ	LLOQ
130	A1	pBC0128	LLOQ	LLOQ
188	A1	pBC0168	++	++
216	A1	pBC0129	++	++
230	A1	pBC0169	LLOQ	LLOQ
333	A1	pBC0130	++	++
375	A2	pBC0131	LLOQ	+++
403	A2	pBC0132	++	++
442	A2	pBC0170	++	++
490	A2	pBC0133	+	++
518	A2	pBC0171	LLOQ	+
599	A2	pBC0134	++	++
713	A2	pBC0172	+	+++
745	B	pBC0135	+++	+++
745	B	pBC0149	+++	+++
745	B	pBC0136	++	++
745	B	pBC0137	+++	+++
1720	A3	pBC0138	+++	+++
1796	A3	pBC0139	+	++
1802	A3	pBC0140	+	++
1827	A3	pBC0173	LLOQ	LLOQ
1861	A3	pBC0174	LLOQ	LLOQ
1896	A3	pBC0175	LLOQ	LLOQ
1900	A3	pBC0176	+++	+++
1904	A3	pBC0177	+	+
1937	A3	pBC0178	LLOQ	LLOQ
2019	A3	pBC0141	LLOQ	+
2068	C1	pBC0179	++	++
2111	C1	pBC0180	LLOQ	LLOQ
2120	C1	pBC0142	LLOQ	+
2171	C2	pBC0143	++	+++
2188	C2	pBC0181	LLOQ	LLOQ
2227	C2	pBC0182	++	+++
2277	C2	pBC0144	++	++
2332	CT	pBC0145	+++	+++
2332	CT	pBC0146	+++	+++
403	A2	pSD0001	+++	+++
599	A2	pSD0002	+	+
403	A2	pSD0003	+++	+++
599	A2	pSD0004	+	+
745	B	pSD0005	+++	++
745	B	pSD0006	+++	+++
745	B	pSD0007	+++	++
745	B	pSD0008	+++	+++
1720	A3	pSD0009	+	+
1720	A3	pSD0010	++	++
2171	C2	pSD0011	+	++
2171	C2	pSD0012	+	++
2332	CT	pSD0013	+++	++
2332	CT	pSD0014	+++	+++
745	B	pSD0017	+++	+++
745	B	pSD0018	+++	+++
2332	CT	pSD0019	+++	+++
2332	CT	pSD0020	+++	+++
2332	CT	pSD0015	++	++
2332	CT	pSD0016	+++	+++
0	N term	pSD0021	+	+
32	A1	pSD0022	+++	+++
65	A1	pSD0023	LLOQ	LLOQ

Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Actividad	ELISA de expresión
81	A1	pSD0024	LLOQ	LLOQ
119	A1	pSD0025	LLOQ	LLOQ
211	A1	pSD0026	+	+
220	A1	pSD0027	+	+
224	A1	pSD0028	+	+
336	A1	pSD0029	++	+++
339	A1	pSD0030	++	+++
378	A2	pSD0031	LLOQ	++
399	A2	pSD0032	++	++
409	A2	pSD0033	++	++
416	A2	pSD0034	+	+
487	A2	pSD0035	LLOQ	+
494	A2	pSD0036	LLOQ	+
500	A2	pSD0037	LLOQ	+
603	A2	pSD0038	+	+
1656	A3	pSD0039	+++	+++
1656	A3	pNL009**	++++	ND
1711	A3	pSD0040	++	+
1725	A3	pSD0041	LLOQ	++
1749	A3	pSD0042	LLOQ	LLOQ
1905	A3	pSD0043	++	++
1910	A3	pSD0044	+	+
1900	A3	pSD0062	++	++
1900	A3	pSD0063	+++	++
18	A1	pSD0045	+++	+++
18	A1	pSD0046	+++	+++
22	A1	pSD0047	LLOQ	LLOQ
22	A1	pSD0048	LLOQ	LLOQ
26	A1	pSD0049	+++	+++
26	A1	pSD0050	+++	+++
40	A1	pSD0051	+++	+++
40	A1	pSD0052	+++	+++
216	A1	pSD0053	LLOQ	LLOQ
216	A1	pSD0054	LLOQ	LLOQ
375	A2	pSD0055	LLOQ	+
442	A2	pSD0056	LLOQ	LLOQ
442	A2	pSD0057	LLOQ	LLOQ
1796	A3	pSD0058	LLOQ	LLOQ
1796	A3	pSD0059	+	+
1802	A3	pSD0060	+	+
1802	A3	pSD0061	LLOQ	LLOQ
*LLOQ: por debajo de los límites de cuantificación ** pNL009 incluye una eliminación de 745-1656				

Tabla 24: Resultados de ensayos de actividad de coagulación para CFXTEN que comprende dos XTEN

Inserción 1		Inserción 2			
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Actividad
745	B	2332	CT	LSD0001,002	+++
745	B	2332	CT	LSD0001,005	+++
745	B	2332	CT	LSD0001,006	+++
745	B	2332	CT	LSD0001,011	+++
745	B	2332	CT	LSD0001,012	+++
745	B	2332	CT	LSD0001,013	+++
745	B	2332	CT	LSD0001,016	+++
745	B	2332	CT	LSD0001,021	+++
745	B	2332	CT	LSD0002,001	+++
745	B	2332	CT	LSD0002,002	+++
745	B	2332	CT	LSD0002,014	+++
745	B	2332	CT	LSD0003,004	+++
745	B	2332	CT	LSD0003,006	+++
745	B	2332	CT	LSD0003,009	+++

Inserción 1		Inserción 2			
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Actividad
745	B	2332	CT	LSD0003,014	+
745	B	2332	CT	LSD0004,010	+++
745	B	2332	CT	LSD0004,011	LLOQ
745	B	2332	CT	LSD0004,014	+++
745	B	2332	CT	LSD0004,016	+++
745	B	2332	CT	LSD0004,022	+++
745	B	2332	CT	LSD0003,016	+++
0745	B	2332	CT	pNL006	+++
0745	B	2332	CT	pNL007	+++
0745	B	2332	CT	pNL008	++
1656	a3	2332	CT	pNL010	+++
26	A1	403	A2	LSD0005,002	++
26	A1	403	A2	LSD0005,004	++
40	A1	403	A2	LSD0005,005	++
40	A1	403	A2	LSD0005,011	++
18	A1	403	A2	LSD0005,018	++
26	A1	599	A2	LSD0006,002	+
40	A1	599	A2	LSD0006,005	++
40	A1	599	A2	LSD0006,007	++
40	A1	599	A2	LSD0006,011	+++
40	A1	403	A2	LSD0007,002	+
40	A1	403	A2	LSD0007,004	+
26	A1	403	A2	LSD0007,013	++
26	A1	599	A2	LSD0008,001	++
40	A1	599	A2	LSD0008,002	++
26	A1	599	A2	LSD0008,006	+
18	A1	599	A2	LSD0008,009	++
40	A1	599	A2	LSD0008,017	+
745	B	2332	CT	LSD0002,025	+++
745	B	2332	CT	LSD0002,013	+++
745	B	2332	CT	LSD0003,025	+++
745	B	2332	CT	LSD0004,025	+++
745	B	2332	CT	LSD0003,005	++
26	A1	403	A2	LSD0007,008	++
1720	A3	1900	A3	LSD0044,002	LLOQ
1725	A3	1900	A3	LSD0044,005	LLOQ
1720	A3	1900	A3	LSD0044,039	LLOQ
1711	A3	1905	A3	LSD0044,022	LLOQ
1720	A3	1905	A3	LSD0044,003	LLOQ
1725	A3	1905	A3	LSD0044,001	LLOQ
1656	A3	26	A1	LSD0038,001	++
1656	A3	18	A1	LSD0038,003	++
1656	A3	18	A1	LSD0038,008	+++
1656	A3	40	A1	LSD0038,012	++
1656	A3	40	A1	LSD0038,013	++
1656	A3	26	A1	LSD0038,015	++
1656	A3	399	A2	LSD0039,001	+
1656	A3	403	A2	LSD0039,003	++
1656	A3	403	A2	LSD0039,010	++
1656	A3	1725	A3	LSD0045,001	+
1656	A3	1720	A3	LSD0045,002	++
1900	A3	18	A1	LSD0042,014	+
1900	A3	18	A1	LSD0042,023	+
1900	A3	26	A1	LSD0042,006	+
1900	A3	26	A1	LSD0042,013	++
1900	A3	40	A1	LSD0042,001	+
1900	A3	40	A1	LSD0042,039	+
1900	A3	26	A1	LSD0042,047	+
1905	A3	18	A1	LSD0042,003	+
1905	A3	40	A1	LSD0042,004	LLOQ

Inserción 1		Inserción 2			
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Actividad
1905	A3	26	A1	LSD0042,008	LLOQ
1905	A3	26	A1	LSD0042,038	LLOQ
1905	A3	40	A1	LSD0042,082	LLOQ
1910	A3	26	A1	LSD0042,040	LLOQ
18	A1	399	A2	LSD0037,002	++
26	A1	399	A2	LSD0037,009	+
40	A1	399	A2	LSD0037,011	++
18	A1	403	A2	LSD0047,002	++
18	A1	403	A2	LSD0047,005	+
18	A1	403	A2	LSD0048,007	+
1656	A3	1900	A3	LSD0046,001	++
1656	A3	1900	A3	LSD0046,002	+
1656	A3	1905	A3	LSD0046,003	+
1711	A3	40	A1	LSD0040,011	LLOQ
1711	A3	26	A1	LSD0040,042	LLOQ
1720	A3	26	A1	LSD0040,002	+
1720	A3	40	A1	LSD0040,008	+
1720	A3	18	A1	LSD0040,021	+
1720	A3	26	A1	LSD0040,037	LLOQ
1720	A3	18	A1	LSD0040,046	+
1725	A3	26	A1	LSD0040,003	LLOQ
1725	A3	40	A1	LSD0040,006	LLOQ
1725	A3	26	A1	LSD0040,007	LLOQ
1725	A3	18	A1	LSD0040,010	LLOQ
1725	A3	40	A1	LSD0040,039	LLOQ
1725	A3	18	A1	LSD0040,052	+
1720	A3	403	A2	LSD0041,001	+
1720	A3	399	A2	LSD0041,004	LLOQ
1711	A3	403	A2	LSD0041,006	LLOQ
1720	A3	403	A2	LSD0041,008	LLOQ
1725	A3	403	A2	LSD0041,010	LLOQ
1725	A3	403	A2	LSD0041,014	LLOQ
1725	A3	399	A2	LSD0041,016	LLOQ
1711	A3	403	A2	LSD0041,035	LLOQ
1900	A3	399	A2	LSD0043,001	LLOQ
1900	A3	403	A2	LSD0043,002	LLOQ
1905	A3	403	A2	LSD0043,005	LLOQ
1900	A3	399	A2	LSD0043,006	LLOQ
1900	A3	403	A2	LSD0043,007	LLOQ
1900	A3	403	A2	LSD0043,008	LLOQ
1905	A3	399	A2	LSD0043,015	LLOQ
1905	A3	403	A2	LSD0043,029	LLOQ
1910	A3	403	A2	LSD0043,043	LLOQ

Tabla 25: Resultados de ensayos de actividad de coagulación para CFXTEN que comprende tres XTEN

Inserción 1		Inserción 2		Inserción 3			
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Actividad
26	A1	403	A2	1656	A3	pSD0077	+++
26	A1	403	A2	1720	A3	pSD0078	++
26	A1	403	A2	1900	A3	pSD0079	++
26	A1	1656	A3	1720	A3	pSD0080	+++
26	A1	1656	A3	1900	A3	pSD0081	LLOQ
26	A1	1720	A3	1900	A3	pSD0082	+
403	A2	1656	A3	1720	A3	pSD0083	+++
403	A2	1656	A3	1900	A3	pSD0084	+++
403	A2	1720	A3	1900	A3	pSD0085	+
1656	A3	1720	A3	1900	A3	pSD0086	+++
18	A1	745	B	2332	CT	LSD0049,002	+++
26	A1	745	B	2332	CT	LSD0049,008	+++

Inserción 1		Inserción 2		Inserción 3			
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Actividad
26	A1	745	B	2332	CT	LSD0049,011	+++
40	A1	745	B	2332	CT	LSD0049,012	+++
40	A1	745	B	2332	CT	LSD0049,020	+++
18	A1	745	B	2332	CT	LSD0049,021	+++
40	A1	745	B	2332	CT	LSD0050,002	+++
18	A1	745	B	2332	CT	LSD0050,003	+++
26	A1	745	B	2332	CT	LSD0050,007	LLOQ
18	A1	745	B	2332	CT	LSD0050,010	+++
26	A1	745	B	2332	CT	LSD0050,012	+++
40	A1	745	B	2332	CT	LSD0050,014	+++
403	A2	745	B	2332	CT	LSD0051,002	+++
399	A2	745	B	2332	CT	LSD0051,003	+++
403	A2	745	B	2332	CT	LSD0052,001	+++
399	A2	745	B	2332	CT	LSD0052,003	+++
1725	A3	745	B	2332	CT	LSD0053,021	LLOQ
1720	A3	745	B	2332	CT	LSD0053,022	+++
1711	A3	745	B	2332	CT	LSD0053,024	+++
1720	A3	745	B	2332	CT	LSD0054,021	+++
1711	A3	745	B	2332	CT	LSD0054,025	++
1725	A3	745	B	2332	CT	LSD0054,026	+++
1900	A3	745	B	2332	CT	LSD0055,021	+++
1905	A3	745	B	2332	CT	LSD0055,022	+++
1900	A3	745	B	2332	CT	LSD0055,026	+++
1900	A3	745	B	2332	CT	LSD0056,021	+++
1900	A3	745	B	2332	CT	LSD0056,024	+++
1910	A3	745	B	2332	CT	LSD0056,025	+++
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0294*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0295*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0296*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0297*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0298*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0299*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0300*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0301*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0302*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0303*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0304*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0305*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0306*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0307*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0308*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0309*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0310*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0311*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0312*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0313*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0314*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0315*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0316*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0317*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0318*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0319*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0320*	
0018	A1	0745	B	2332	CT	pBC0269*	
0403	A2	0745	B	2332	CT	pBC0270*	
1720	A3	0745	B	2332	CT	pBC0271*	
1900	A3	0745	B	2332	CT	pBC0272*	
0403	A2	0745	B	2332	CT	pBC0273*	
1720	A3	0745	B	2332	CT	pBC0274*	

Inserción 1		Inserción 2		Inserción 3			
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Actividad
1900	A3	0745	B	2332	CT	pBC0275*	
0018	A1	0745	B	2332	CT	pBC0276*	
0403	A2	0745	B	2332	CT	pBC0277*	
1720	A3	0745	B	2332	CT	pBC0278*	
1900	A3	0745	B	2332	CT	pBC0279*	
*Construcción con mutación R1648A							

Tabla 26: Resultados de ensayos de actividad de coagulación para CFXTEN que comprende cuatro XTEN

Inserto de XTEN 1	Inserto de XTEN 2	Inserto de XTEN 3	Inserto de XTEN 4	Inserto de XTEN 5	Inserto de XTEN 6	ID de construcción	Actividad
26	403	1656	1720	-	-	pSD0087	+++
26	403	1656	1900	-	-	pSD0088	+++
26	403	1720	1900	-	-	pSD0089	LLOQ
26	1656	1720	1900	-	-	pSD0090	++
403	1656	1720	1900	-	-	pSD0091	++
0040	0403	745	2332	-	-	LSD0058,006*	++
0018	0409	745	2332	-	-	LSD0059,002*	+
0040	0409	745	2332	-	-	LSD0059,006*	+
0040	0409	745	2332	-	-	LSD0060,001*	+
0018	0409	745	2332	-	-	LSD0060,003*	+
0040	1720	745	2332	-	-	LSD0061,002*	+
0026	1720	745	2332	-	-	LSD0061,007*	++
0018	1720	745	2332	-	-	LSD0061,008*	++
0018	1720	745	2332	-	-	LSD0061,012*	++
0018	1720	745	2332	-	-	LSD0062,001*	++
0026	1720	745	2332	-	-	LSD0062,002*	++
0018	1720	745	2332	-	-	LSD0062,006*	++
0018	1900	745	2332	-	-	LSD0063,001*	++
0018	1900	745	2332	-	-	LSD0064,017*	++
0026	1900	745	2332	-	-	LSD0064,020*	++
0040	1900	745	2332	-	-	LSD0064,021*	++
0040	1905	745	2332	-	-	LSD0065,001*	+
0018	1905	745	2332	-	-	LSD0065,014*	+
0040	1905	745	2332	-	-	LSD0066,001*	+
0026	1905	745	2332	-	-	LSD0066,002*	+
0018	1905	745	2332	-	-	LSD0066,009*	++
0018	1905	745	2332	-	-	LSD0066,011*	++
0018	1910	745	2332	-	-	LSD0067,004*	++
0018	1910	745	2332	-	-	LSD0067,005*	+
0040	1910	745	2332	-	-	LSD0067,006*	+
0026	1910	745	2332	-	-	LSD0067,008*	+
0018	1910	745	2332	-	-	LSD0068,001*	+
0026	1910	745	2332	-	-	LSD0068,002*	+
0040	1910	745	2332	-	-	LSD0068,005*	+
0018	1910	745	2332	-	-	LSD0068,010*	++
0409	1720	745	2332	-	-	LSD0069,004*	+
0403	1720	745	2332	-	-	LSD0069,008*	+
0409	1720	745	2332	-	-	LSD0070,003*	+
0403	1720	745	2332	-	-	LSD0070,004*	++
0403	1720	745	2332	-	-	LSD0070,005*	++
0403	1900	745	2332	-	-	LSD0071,001*	++
0403	1900	745	2332	-	-	LSD0071,002*	+
0409	1900	745	2332	-	-	LSD0071,008*	++
0403	1900	745	2332	-	-	LSD0072,001*	++
0403	1900	745	2332	-	-	LSD0072,002*	+
0409	1900	745	2332	-	-	LSD0072,003*	+
0409	1905	745	2332	-	-	LSD0073,002*	+
0403	1905	745	2332	-	-	LSD0073,004*	+
0403	1905	745	2332	-	-	LSD0073,006*	+

Inserto de XTEN 1	Inserto de XTEN 2	Inserto de XTEN 3	Inserto de XTEN 4	Inserto de XTEN 5	Inserto de XTEN 6	ID de construcción	Actividad
0403	1905	745	2332	-	-	LSD0074,007*	++
0409	1905	745	2332	-	-	LSD0074,010*	+
0403	1905	745	2332	-	-	LSD0074,011*	+
0409	1910	745	2332	-	-	LSD0075,004*	+
0403	1910	745	2332	-	-	LSD0075,007*	+
0403	1910	745	2332	-	-	LSD0076,002*	+
0403	1910	745	2332	-	-	LSD0076,003*	+
0403	1910	745	2332	-	-	pSD0093*	+
1720	1900	745	2332	-	-	pSD0094*	++
1720	1905	745	2332	-	-	pSD0095*	+
1720	1910	745	2332	-	-	pSD0097*	+
1720	1910	745	2332	-	-	pSD0098*	+
0403	1656	1720	2332	-	-	pNL0022	+
0403	1656	1900	2332	-	-	pNL0023	+
0403	1720	1900	2332	-	-	pNL0024	LLOQ
1656	1720	1900	2332	-	-	pNL0025	+
0018	0403	1656	2332	-	-	pBC0247	++
0018	0403	1720	2332	-	-	pBC0248	+
0018	0403	1900	2332	-	-	pBC0249	+
0018	1656	1720	2332	-	-	pBC0250	+
0018	1656	1900	2332	-	-	pBC0251	++
0018	1720	1900	2332	-	-	pBC0252	LLOQ
0018	0403	0745	2332	-	-	LSD57,005	++
0018	0745	1720	2332	-	-	LSD62,001	++
0018	0745	1900	2332	-	-	pBC0262	++
0403	0745	1720	2332	-	-	LSD70,004	+
0403	0745	1900	2332	-	-	pBC0266	+
0745	1720	1900	2332	-	-	pBC0268	+
0188	1900	0745	2332	-	-	pCS0001*	ND
0599	1900	0745	2332	-	-	pCS0002*	ND
2068	1900	0745	2332	-	-	pCS0003*	ND
2171	1900	0745	2332	-	-	pCS0004*	ND
2227	1900	0745	2332	-	-	pCS0005*	ND
2277	1900	0745	2332	-	-	pCS0006*	ND
0403	1656	1720	1900	2332	-	pNL0030	LLOQ
0018	0403	1656	1720	2332	-	pBC0253	+
0018	0403	1656	1900	2332	-	pBC0254	+
0018	0403	1720	1900	2332	-	pBC0255	LLOQ
0018	1656	1720	1900	2332	-	pBC0256	+
0018	0403	0745	1720	2332	-	pBC0259*	+
0018	0403	0745	1900	2332	-	pBC0260*	+
0018	0745	1720	1900	2332	-	pBC0263	+
0403	0745	1720	1900	2332	-	pBC0267	LLOQ
0018	0403	1656	1720	1900	2332	pBC0257	LLOQ
0018	0403	0745	1720	1900	2332	pBC0264	LLOQ
*Construcción con mutación R1648A							

Ejemplo 26: Determinación de radios de XTEN y parámetros relacionados

Para cuantificar los radios hidrodinámicos de los componentes de XTEN de las proteínas de fusión de CFXTEN y la manera en que el valor de múltiples XTEN frente a un solo XTEN varía, se creó una serie de fórmulas basándose en datos derivados empíricamente de los ensayos de cromatografía de exclusión por tamaño de diversas proteínas de fusión que comprenden uno o más XTEN. Se cree que la incorporación de múltiples XTEN en una CFXTEN proporciona un radio hidrodinámico total mayor del componente de XTEN en comparación con CFXTEN con menos XTEN, teniendo aún, aproximadamente el mismo total de aminoácidos de XTEN. El radio máximo de un solo polipéptido de XTEN se calcula (a partir de ahora en la presente memoria "radio de XTEN") de acuerdo con la fórmula dada por la ecuación II:

$$\text{Radio de XTEN} = (\text{longitud de } \sqrt{\text{XTEN}}\ 0{,}2037) + 3{,}4627 \qquad \text{II}$$

La suma del máximo de los radios de XTEN para todos los segmentos de XTEN en una CFXTEN se calcula (a partir de ahora en la presente memoria "suma de radios de XTEN") de acuerdo con la fórmula dada por la ecuación III:

$$\text{Suma de radios de XTEN} = \sum_{i=1}^{n} Radio\ de\ XTEN_i \qquad \text{III}$$

en la que: n = el número de segmentos de XTEN

e i es un iterador

La relación de la suma de radios de XTEN de una CFXTEN que comprende múltiples XTEN respecto al radio de XTEN para un solo XTEN de una longitud equivalente (en residuos aminoacídicos totales respecto a la CFXTEN) se calcula (a partir de ahora en la presente memoria "relación de radios de XTEN") de acuerdo con la fórmula dada por la ecuación IV:

$$\text{Relación de radios de XTEN} = \frac{\sum_{i=1}^{n} Radio\ de\ XTEN_i}{(\sqrt{\sum_{i=1}^{n} Longitud\ de\ XTEN_i} + 0{,}2037) + 3{,}4627} \qquad \text{IV}$$

en la que: n = el número de segmentos de XTEN

e i es un iterador

Resultados: La ecuación II se aplicó a XTEN de longitudes de 144, 288, 576 y 864. Los resultados se presentan en la tabla 27. La ecuación IV se aplicó a diversas proteínas de fusión de CFXTEN descritas en la presente memoria con dos, tres o cuatro XTEN. La relación de radios de XTEN tiene un valor de 1 para todas las CFXTEN que contienen un solo XTEN. La relación de radios de XTEN se presenta en la tabla 28. La relación de radios de XTEN para pSD0092, que contiene 5 inserciones de XTEN, tiene un valor de 3,31. Colectivamente, los resultados indican que la inclusión de múltiples XTEN aumenta la relación de radios de XTEN hasta valores mayores de 2, provocando cuatro inserciones valores mayores que tres inserciones.

Tabla 27: Resultados de cálculos de radios para CFXTEN que comprende XTEN

Longitud de XEN	Radio de XTEN
42	4,8
144	5,9
288	6,9
576	8,4
864	9,5

Tabla 28: Resultados de cálculos de radios para CFXTEN que comprende XTEN

Inserción 1		Inserción 2		Inserción 3		Inserción 4			
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Relación de radios de XTEN
40	A1							pBC0166	1,00
745	B	2332	CT					LSD0001,002	1,67
745	B	2332	CT					LSD0001,005	1,71
745	B	2332	CT					LSD0001,006	1,71
745	B	2332	CT					LSD0001,011	1,71
745	B	2332	CT					LSD0001,012	1,71
745	B	2332	CT					LSD0001,013	1,67
745	B	2332	CT					LSD0001,016	1,67
745	B	2332	CT					LSD0001,021	1,67
745	B	2332	CT					LSD0002,001	1,67

Inserción 1		Inserción 2		Inserción 3		Inserción 4			
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Relación de radios de XTEN
745	B	2332	CT					LSD0002,002	1,67
745	B	2332	CT					LSD0002,004	1,71
745	B	2332	CT					LSD0002,008	1,67
745	B	2332	CT					LSD0002,014	1,67
745	B	2332	CT					LSD0003,001	1,67
745	B	2332	CT					LSD0003,004	1,66
745	B	2332	CT					LSD0003,006	1,67
745	B	2332	CT					LSD0003,009	1,67
745	B	2332	CT					LSD0003,014	1,66
745	B	2332	CT					LSD0003,018	1,67
745	B	2332	CT					LSD0004,010	1,66
745	B	2332	CT					LSD0004,011	1,67
745	B	2332	CT					LSD0004,014	1,66
745	B	2332	CT					LSD0004,016	1,66
745	B	2332	CT					LSD0004,022	1,66
745	B	2332	CT					LSD0003,016	1,67
26	A1	403	A2					LSD0005,002	1,71
26	A1	403	A2					LSD0005,004	1,71
40	A1	403	A2					LSD0005,005	1,71
40	A1	403	A2					LSD0005,011	1,71
18	A1	403	A2					LSD0005,018	1,71
26	A1	599	A2					LSD0006,002	1,71
40	A1	599	A2					LSD0006,005	1,71
40	A1	599	A2					LSD0006,007	1,71
40	A1	599	A2					LSD0006,011	1,71
40	A1	403	A2					LSD0007,002	1,71
40	A1	403	A2					LSD0007,004	1,71
26	A1	403	A2					LSD0007,013	1,71
26	A1	599	A2					LSD0008,001	1,71

Inserción 1		Inserción 2		Inserción 3		Inserción 4			
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Relación de radios de XTEN
40	A1	599	A2					LSD0008,002	1,71
26	A1	599	A2					LSD0008,006	1,71
18	A1	599	A2					LSD0008,009	1,71
40	A1	599	A2					LSD0008,017	1,71
745	B	2332	CT					LSD0002,025	1,71
745	B	2332	CT					LSD0002,013	1,67
745	B	2332	CT					LSD0003,025	1,67
745	B	2332	CT					LSD0004,025	1,67
745	B	2332	CT					LSD0003,005	1,66
26	A1	403	A2					LSD0007,008	1,71
1720	A3	1900	A3					LSD0044,002	1,71
1725	A3	1900	A3					LSD0044,005	1,71
1720	A3	1900	A3					LSD0044,039	1,71
1711	A3	1905	A3					LSD0044,022	1,71
1720	A3	1905	A3					LSD0044,003	1,71
1725	A3	1905	A3					LSD0044,001	1,71
1656	A3	26	A1					LSD0038,001	1,71
1656	A3	18	A1					LSD0038,003	1,71
1656	A3	18	A1					LSD0038,008	1,71
1656	A3	40	A1					LSD0038,012	1,71
1656	A3	40	A1					LSD0038,013	1,71
1656	A3	26	A1					LSD0038,015	1,71
1656	A3	399	A2					LSD0039,001	1,71
1656	A3	403	A2					LSD0039,003	1,71
1656	A3	403	A2					LSD0039,010	1,71
1656	A3	1725	A3					LSD0045,001	1,71
1656	A3	1720	A3					LSD0045,002	1,71
1900	A3	18	A1					LSD0042,014	1,71
1900	A3	18	A1					LSD0042,023	1,71

Inserción 1		Inserción 2		Inserción 3		Inserción 4			
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Relación de radios de XTEN
1900	A3	26	A1					LSD0042,006	1,71
1900	A3	26	A1					LSD0042,013	1,71
1900	A3	40	A1					LSD0042,001	1,71
1900	A3	40	A1					LSD0042,039	1,71
1900	A3	26	A1					LSD0042,047	1,71
1905	A3	18	A1					LSD0042,003	1,71
1905	A3	40	A1					LSD0042,004	1,71
1905	A3	26	A1					LSD0042,008	1,71
1905	A3	26	A1					LSD0042,038	1,71
1905	A3	40	A1					LSD0042,082	1,71
1910	A3	26	A1					LSD0042,040	1,71
18	A1	399	A2					LSD0037,002	1,71
26	A1	399	A2					LSD0037,009	1,71
40	A1	399	A2					LSD0037,011	1,71
18	A1	403	A2					LSD0047,002	1,71
18	A1	403	A2					LSD0047,005	1,71
18	A1	403	A2					LSD0048,007	1,71
1656	A3	1900	A3					LSD0046,001	1,71
1656	A3	1900	A3					LSD0046,002	1,71
1656	A3	1905	A3					LSD0046,003	1,71
1711	A3	40	A1					LSD0040,011	1,71
1711	A3	26	A1					LSD0040,042	1,71
1720	A3	26	A1					LSD0040,002	1,71
1720	A3	40	A1					LSD0040,008	1,71
1720	A3	18	A1					LSD0040,021	1,71
1720	A3	26	A1					LSD0040,037	1,71
1720	A3	18	A1					LSD0040,046	1,71
1725	A3	26	A1					LSD0040,003	1,71
1725	A3	40	A1					LSD0040,006	1,71

Inserción 1		Inserción 2		Inserción 3		Inserción 4			
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Relación de radios de XTEN
1725	A3	26	A1					LSD0040,007	1,71
1725	A3	18	A1					LSD0040,010	1,71
1725	A3	40	A1					LSD0040,039	1,71
1725	A3	18	A1					LSD0040,052	1,71
1720	A3	403	A2					LSD0041,001	1,71
1720	A3	399	A2					LSD0041,004	1,71
1711	A3	403	A2					LSD0041,006	1,71
1720	A3	403	A2					LSD0041,008	1,71
1725	A3	403	A2					LSD0041,010	1,71
1725	A3	403	A2					LSD0041,014	1,71
1725	A3	399	A2					LSD0041,016	1,71
1711	A3	403	A2					LSD0041,035	1,71
1900	A3	399	A2					LSD0043,001	1,71
1900	A3	403	A2					LSD0043,002	1,71
1905	A3	403	A2					LSD0043,005	1,71
1900	A3	399	A2					LSD0043,006	1,71
1900	A3	403	A2					LSD0043,007	1,71
1900	A3	403	A2					LSD0043,008	1,71
1905	A3	399	A2					LSD0043,015	1,71
1905	A3	403	A2					LSD0043,029	1,71
1910	A3	403	A2					LSD0043,043	1,71
26	A1	403	A2	1656	A3			pSD0077	2,30
26	A1	403	A2	1720	A3			pSD0078	2,30
26	A1	403	A2	1900	A3			pSD0079	2,30
26	A1	1656	A3	1720	A3			pSD0080	2,30
26	A1	1656	A3	1900	A3			pSD0081	2,30
26	A1	1720	A3	1900	A3			pSD0082	2,30
403	A2	1656	A3	1720	A3			pSD0083	2,30
403	A2	1656	A3	1900	A3			pSD0084	2,30
403	A2	1720	A3	1900	A3			pSD0085	2,30
1656	A3	1720	A3	1900	A3			pSD0086	2,30
26	A1	403	A2	1656	A3	1720	A3	pSD0087	2,83
26	A1	403	A2	1656	A3	1900	A3	pSD0088	2,83
26	A1	403	A2	1720	A3	1900	A3	pSD0089	2,83
26	A1	1656	A3	1720	A3	1900	A3	pSD0090	2,83
403	A2	1656	A3	1720	A3	1900	A3	pSD0091	2,83
26	A1	403	A2	1656	A3	1720	A3	pSD0092	2,83

Inserción 1		Inserción 2		Inserción 3		Inserción 4			
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Construcción	Relación de radios de XTEN
18	A1	745	B	2332	CT			LSD0049,002	2,24
26	A1	745	B	2332	CT			LSD0049,008	2,24
26	A1	745	B	2332	CT			LSD0049,011	2,24
40	A1	745	B	2332	CT			LSD0049,012	2,24
40	A1	745	B	2332	CT			LSD0049,020	2,24
18	A1	745	B	2332	CT			LSD0049,021	2,24
40	A1	745	B	2332	CT			LSD0050,002	2,24
18	A1	745	B	2332	CT			LSD0050,003	2,24
26	A1	745	B	2332	CT			LSD0050,007	2,24
18	A1	745	B	2332	CT			LSD0050,010	2,24
26	A1	745	B	2332	CT			LSD0050,012	2,24
40	A1	745	B	2332	CT			LSD0050,014	2,24
403	A2	745	B	2332	CT			LSD0051,002	2,24
399	A2	745	B	2332	CT			LSD0051,003	2,24
403	A2	745	B	2332	CT			LSD0052,001	2,24
399	A2	745	B	2332	CT			LSD0052,003	2,24
1725	A3	745	B	2332	CT			LSD0053,021	2,24
1720	A3	745	B	2332	CT			LSD0053,022	2,24
1711	A3	745	B	2332	CT			LSD0053,024	2,24
1720	A3	745	B	2332	CT			LSD0054,021	2,24
1711	A3	745	B	2332	CT			LSD0054,025	2,24
1725	A3	745	B	2332	CT			LSD0054,026	2,24
1900	A3	745	B	2332	CT			LSD0055,021	2,24
1905	A3	745	B	2332	CT			LSD0055,022	2,24
1900	A3	745	B	2332	CT			LSD0055,026	2,24
1900	A3	745	B	2332	CT			LSD0056,021	2,24
1900	A3	745	B	2332	CT			LSD0056,024	2,24
1910	A3	745	B	2332	CT			LSD0056,025	2,24

Ejemplo 27: Interferencia de unión de FVIII-XTEN a anticuerpo anti-FVIII

La capacidad del XTEN insertado en diferentes ubicaciones de proteínas de fusión d CFXTEN de afectar a la unión de anticuerpos anti-FVIII se determinó por ensayos de ELISA emparedados. Se utilizaron dos anticuerpos anti-FVIII; es decir, GMA-8021 (Green Mountain Antibodies, Burlington, VT) y ESH8 (American Diagnostica Inc., Stamford, CT), que se unen a los dominios A2 y C2, respectivamente, como anticuerpos de captura. Una proteína FVIII-His-Myc que no contiene XTEN se usó como patrón de calibración y control positivo para todos los ELISA. Se crearon diez proteínas de fusión de CFXTEN con inserciones de XTEN individuales en los dominios A1, A2 o A3 que contenían adicionalmente las marcas de afinidad de His y Myc. Las concentraciones de proteína de cada muestra de ensayo se normalizaron al 100 % basándose en un ELISA de captura de anti-His-detección de anti-Myc ejecutado simultáneamente en la misma placa que el ELISA de captura de anticuerpo anti-FVIII-detección de anti-Myc.

En resumen, se recubrieron pocillos apropiados en una placa de 96 pocillos con anticuerpo GMA-8021, ESH8 o anti-His durante una noche a 4 °C, después se lavaron y se bloquearon con BSA. Se introdujeron volúmenes iguales del control respectivo o proteínas de fusión en pocillos duplicados y se permitió que interactuaran con el anticuerpo GMA-8021, ESH8 o anti-His recubierto durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la incubación, el material no unido se eliminó por lavado y se añadió un anticuerpo de conejo de detección anti-Myc y se incubó durante una hora adicional a temperatura ambiente. La placa entonces se lavó y se introdujo un anticuerpo secundario de burro anticonejo conjugado con peroxidasa y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó de nuevo, seguido de la adición de sustrato TMB y se permitió que la reacción prosiguiera durante 5-20 min. Se introdujo H2SO4 para detener la reacción y se leyó la absorbancia mediante espectrofotómetro a 450 nm.

Resultados: Los resultados se presentan en la tabla 29. Colectivamente, los resultados demuestran que los dos anticuerpos contra las proteínas de fusión de CFXTEN con XTEN insertado en el dominio A2 mostraban unión reducida de FVIII en comparación con CFXTEN con XTEN insertado en el dominio A1 o A3 cuando el anticuerpo de captura anti-FVIII era GMA-8021 (con afinidad de unión por el dominio A2). Por el contrario, no hubo patrón discernible de inhibición o potenciación de la unión por ninguna de las CFXTEN cuando el anticuerpo de captura anti-FVIII era ESH8, con afinidad de unión por el dominio C2.

Tabla 29: Interferencia de unión de FVIII-XTEN a anticuerpo anti-FVIII

Muestra ensayada	Inserción de XTEN (dominio, sitio, XTEN)	Concentración en aFVIII/Myc ÷ concentración en aHis/Myc		
		His/Myc	GMA-8021/Myc (dominio A2)	ESH8/Myc (dominio C2)
FVIII-His-Myc	Ninguno	100%	92%	104%
FVIII-XTEN-His-Myc	A2, 403, AE144	100%	103% ± 1%	141% ± 24%
	A2, 403, AG144	100%	104% ± 6%	129% ± 12%
	A2, 399, AE144	100%	100% ± 8%	140% ± 18%
	A3, 1656, AG144	100%	153%	158%
	A1, 18, AE144	100%	129%	130%
	A1, 18, AG144	100%	150%	131%
	A1, 26, AE144	100%	155%	87%
	A1, 26, AG144	100%	157%	147%
	A1, 40, AE144	100%	137%	147%
	A1, 40, AG144	100%	164% ± 0%	153% ± 18%
aFVIII/Myc = condición de anticuerpo GMA-8021/Myc o ESH8/Myc; aHis/Myc = condición de anticuerpo anti-His/Myc				

Ejemplo 28: Ensayo de actividad de proteínas de fusión de CFXTEN en presencia de inhibidores de FVIII

Procedimiento de valoración de ensayo de inhibidores:

Se adquirieron anticuerpos seleccionados que inhiben la actividad procoagulante de FVIII de fuentes comerciales. Los anticuerpos están dirigidos a dominios seleccionados de FVIII (por ejemplo, A2, A3, C1, C2) e inhiben la actividad procoagulante dependiente de FVIII. Para establecer la concentración óptima de inhibidores de FVIII a utilizar en el ensayo, se realizó un experimento de valoración inicial usando cantidades variables de cada anticuerpo inhibidor incubado a 37 °C durante 2 h con el vector fundamental que expresa FVIII de tipo silvestre con una doble marca de His/Myc, y una segunda muestra con anticuerpo y al menos una proteína de fusión de CFXTEN. Las muestras entonces se utilizaron en un ensayo de coagulación para determinar la actividad de FVIII. La actividad se midió mediante el procedimiento de ensayo de Coatest descrito en la presente memoria. La concentración que producía inhibición óptima de la actividad de FVIII se determinó para cada anticuerpo individualmente.

Procedimiento de ensayo de inhibidores:

Los anticuerpos inhibidores de FVIII se usaron entonces a su concentración óptima para ensayo de muestras de ensayo. CFXTEN y muestras de control positivo se incubaron individualmente con cada anticuerpo a 37 °C durante 2 h y las muestras entonces se recogieron y se utilizaron en el ensayo de actividad de Coatest, junto con alícuotas sin tratar de la CFXTEN y el control positivo. En algunos casos, se ensayaron construcciones de CFXTEN con una mutación R1648A para determinar el efecto, si lo hay, de esta mutación sobre la resistencia a inhibidores medida por la retención de la actividad de FVIII.

Resultados:

Los resultados del experimento de valoración se muestran en la FIG. 26. Los datos indican un desplazamiento a la derecha de un orden de magnitud de aproximadamente 0,7 en la cantidad de anticuerpo requerida para inhibir la actividad procoagulante de la CFXTEN LSD0049.002 hasta un nivel de un 50 %, en comparación con el control positivo de FVIII, lo que indica que la CFXTEN con tres inserciones de XTEN (en los puntos de inserción correspondientes al residuo aminoacídico 18, 745 y 2332 del BDD-FVIII) tenía unión inferior con el anticuerpo en comparación con FVIII, reflejado en la retención de la actividad de coagulación.

Los resultados de los ensayos de Coatest se presentan en las tablas 30 y 31, para los anticuerpos inhibidores de FVIII GMA8008 y GMA8021, respectivamente. Todas las construcciones de proteína de fusión de CFXTEN no tratadas ensayadas mostraron actividad procoagulante, igual que el control positivo de FVIII pBC00114. La muestra de control positivo preincubada con anticuerpos inhibidores de FVIII provocó una aguda disminución en la actividad de coagulación medida hasta 0,05-0,15 (5-15 %) con respecto a la muestra no tratada, igual que la mayoría de las construcciones de CFXTEN tratadas con el anticuerpo GMA8008 contra el dominio C2. Sin embargo, tres proteínas de fusión de CFXTEN retuvieron al menos dos veces la actividad remanente relativa en comparación con el control de FVIII; LSD0049.020, LSD0053.024 y LSD0056.025, cada uno con tres insertos de XTEN.

Las muestras de CFXTEN mostraron un grado inferior de inhibición con el anticuerpo GMA8021 contra el dominio A2 en comparación con muestras no tratadas que se redujo adicionalmente por los números adicionales de insertos de XTEN (datos tabulados mostrados en la tabla 30). La FIG. 29 muestra el gráfico de la mediana de los valores de la relación con el control de la actividad retenida que muestra una relación lineal entre los números de XTEN insertados y la inhibición reducida para el anticuerpo GMA8021 con respecto a la inhibición del control de FVIII. Asimismo, las medias ± E.T. para la relación con los valores de control fueron 2,26 ± 0,12 para 1 XTEN, 3,48 + 0,26 para 2 XTEN y 5,70 ± 0,29 para 3 XTEN inserciones. La CFTXEN con al menos tres insertos de XTEN tratada con el anticuerpo GMA8021 obtuvo una retención al menos 4,5 a 9,2 veces mayor de la actividad de FVIII en comparación con el control de FVIII. Además, en aquellas CFXTEN con tres inserciones de XTEN, las construcciones con un grado mayor de separación (en números de residuos aminoacídicos) entre dos inserciones cualesquiera parecían producir un grado mayor de actividad procoagulante y, por tanto, menos unión por el anticuerpo inhibidor de FVIII, en comparación con inserciones agrupadas más estrechamente; por ejemplo, en el lado C terminal del dominio B. Los resultados del ensayo de las construcciones con la mutación R1648A parecían ser comparables con aquellas sin la mutación.

Conclusiones: Los resultados respaldan que, en las condiciones de los experimentos, la inserción de XTEN en FVIII produjo protección contra la unión por inhibidores de FVIII, con retención de la actividad procoagulante, y que la inclusión de múltiples insertos de XTEN aumentaba la resistencia a, en particular, al anticuerpo inhibidor del dominio A2. Finalmente, parece tener efecto que haya una separación espacial entre los insertos de XTEN.

Tabla 30: Resultados de ensayo de coagulación con CFXTEN tratada con anticuerpo GMA8008 contra dominio C2

Nombre de la construcción	Actividad remanente relativa	Relación con el control	Inserción de XTEN 1	Inserción de XTEN 2	Inserción de XTEN 3	Mutaciones
pBC0114 CT	0,05-0,15	1				
pBC0149	0,1	0,8	0745_AE42_1			
pSD0045	0,3	1,1	0018_AE144_5A			
pSD0046	0,3	1,0	0018_AG144_F			
pSD0050	0,2	0,9	0026_AG144_F			
pSD0051	0,3	1,3	0040_AE144_5A			
pSD0052	0,2	1,0	0040_AG144_F			
pSD0001	0,2	0,9	0403_AE144_2A			
pBC0136	0,2	1,2	0745_AE288_1			
pBC0137	0,2	1,1	0745_AE288_1			R1648A
pSD0013	0,1	0,9	2332_AE144_6B			
pSD0014	0,1	0,8	2332_AG144_1			
pBC0145	0,1	0,6	2332_AE288_1			
pSD0019	0,1	0,5	2332_AE288_1			
pBC0146	0,1	0,7	2332_AG288_1			
pSD0015	0,1	0,8	2332_AE864			
LSD0038,008	0,1	0,9	0018_AG144_F	1656_AG144_C		
LSD0038,013	0,1	0,6	0040_AG144_F	1656_AG144_C		
LSD003,09	0,1	0,9	0745_AE144_3B	2332_AE288_1		
LSD003,06	0,0	0,8	0745_AE144_3B	2332_AE288_1		R1648A
LSD0046,001	0,0	0,6	1656_AG144_C	1900_AG144_C		
PSD077	0,1	1,0	0026_AG144_F	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	
PSD080	0,1	1,0	0026_AG144_F	1656_AG144_C	1720_AG144_C	
PSD083	0,1	0,8	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	1720_AG144_C	
PSD084	0,1	0,9	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	1900_AE144_4A	
LSD0050,010	0,1	0,7	0018_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0049,021	0,0	0,6	0018_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049,002	0,1	0,9	0018_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049,008	0,1	0,9	0026_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049,011	0,1	0,9	0026_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049,020	0,2	2,6	0040_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0050,002	0,0	0,2	0040_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0053,024	0,2	2,5	1711_AE144_4A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0054,021	0,2	1,5	1720_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0055,021	0,2	1,6	1900_AE144_4A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0056,021	0,2	1,6	1900_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0056,025	0,3	2,0	1910_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	

proporción de actividad remanente relativa a la muestra sin tratar correspondiente

La relación de la actividad remanente relativa (relativa a su propio control) en comparación con el control positivo de FVIII pBC0114

Tabla 31: Resultados de ensayo de coagulación con CFXTEN tratada con anticuerpo GMA8021 contra dominio A2

Nombre de la construcción	Actividad remanente relativa	Relación con el control	Inserción de XTEN 1	Inserción de XTEN 2	Inserción de XTEN 3	Mutaciones
pBC0114	0,05-0,15	1				
pBC0149	0,2	1,3	0745_AE42_1			
pSD0045	0,3	2,7	0018_AE144_5A			
pSD0046	0,2	2,1	0018_AG144_F			
pSD0050	0,2	2,4	0026_AG144_F			
pSD0051	0,3	3,1	0040_AE144_5A			
pSD0052	0,3	2,7	0040_AG144_F			
pSD0001	0,2	1,6	0403_AE144_2A			
pBC0136	0,3	2,4	0745_AE288_1			
pBC0137	0,3	2,4	0745_AE288_1			R1648A
pSD0013	0,2	1,8	2332_AE144_6B			
pSD0014	0,2	2,1	2332_AG144_1			
pBC0145	0,3	2,1	2332_AE288_1			
pSD0019	0,3	2,3	2332_AE288_1			
pBC0146	0,3	2,1	2332_AG288_1			
pSD0015	0,3	2,8	2332_AE864			
LSD0038,008	0,4	3,0	0018_AG144_F	1656_AG144_C		
LSD0038,013	0,4	3,0	0040_AG144_F	1656_AG144_C		
LSD003,09	0,3	3,6	0745_AE144_3B	2332_AE288_1		
LSD003,06	0,3	3,4	0745_AE144_3B	2332_AE288_1		R1648A
LSD0046,001	0,2	4,4	1656_AG144_C	1900_AG144_C		
PSD077	0,4	5,8	0026_AG144_F	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	
PSD080	0,4	5,7	0026_AG144_F	1656_AG144_C	1720_AG144_C	
PSD083	0,3	5,0	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	1720_AG144_C	
PSD084	0,3	4,5	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	1900_AE144_4A	
LSD0050,010	0,4	6,7	0018_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0049,021	0,4	6,7	0018_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049,002	0,5	9,2	0018_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049,008	0,4	5,9	0026_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049,011	0,4	5,6	0026_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049,020	0,3	5,0	0040_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0050,002	0,3	6,2	0040_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0053,024	0,3	4,5	1711_AE144_4A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0054,021	0,5	5,2	1720_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0055,021	0,5	5,4	1900_AE144_4A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0056,021	0,5	5,1	1900_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0056,025	0,5	4,8	1910_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	

proporción de actividad remanente relativa a la muestra sin tratar correspondiente

La relación de la actividad remanente relativa (relativa a su propio control) en comparación con el control positivo de FVIII pBC0114

Ejemplo 29: Purificación de proteínas de las proteínas de fusión de CFXTEN pBC0145 y pBC0146

Dos construcciones de CFXTEN con XTEN C terminal se utilizaron para establecer un método de purificación. Tanto para pBC0145 con un XTEN C terminal de 288 aminoácidos de la familia AE (véase la secuencia en la tabla 21) como para pBC0146 con un XTEN C terminal de 288 aminoácidos de la familia AG (véase la secuencia en la tabla 21), se usó una etapa de filtración en flujo tangencial (TFF) para intercambiar el tampón del medio condicionado aclarado del cultivo celular. Los productos entonces se capturaron usando una resina de cromatografía de intercambio aniónico fuerte, y después se purificaron adicionalmente usando cromatografía de afinidad en VIIISelect (GE Healthcare). Se aplicó una cromatografía de exclusión por tamaño adicional (GE Healthcare) a FVIII-pBC0146 como tercera etapa de refinado para eliminar las especies de alto peso molecular. La pureza de ambas proteínas de fusión se consideró aceptable por HPLC-SEC y se confirmó adicionalmente por análisis de SDS-PAGE de las dos construcciones de CFXTEN que muestra productos de CFXTEN a los tamaños esperados. La actividad específica de ambas moléculas fue comparable a FVIII con el dominio B eliminado, medida por ensayo de coagulación de aPTT y determinación por ELISA de la concentración de FVIII.

Ejemplo 30: Farmacocinética de las proteínas de fusión de CFXTEN pBC0145 y pBC0146 en ratones HemA y FVIII/VWF DKO

Ratones macho con inactivación de FVIII (HemA) o ratones con doble inactivación (DKO) de FVIII/VWF, de 8-12 semanas de edad, se trataron con una sola administración intravenosa de BDD-FVIII recombinante, las proteínas de fusión purificadas de CFXTEN pBC0145 o pBC0146 (del ejemplo 23) a 200 UI/kg de dosis (n = 4/punto temporal). En los puntos temporales seleccionados, se recogieron muestras de sangre mediante muestro de la cava vena. En ratones HemA, se recogieron muestras de sangre a los 5 min, 1, 4, 8, 16, 20, 24, 32 y 48 horas después de la dosis para rBDD-FVIII, y a los 5 min, 8, 16, 24, 32, 48, 55 y 72 horas después de la dosis para las proteínas de fusión pBC0145 y pBC0146. En los ratones FVIII/VWF DKO, se recogieron muestras de sangre a los 5 min, 30 min y 1 h después de la dosis para rBDD-FVIII, y a los 5 min, 4, 8, 16 y 24 h después de la dosis para las proteínas de fusión pBC0145 y pBC0146. La actividad de FVIII en plasma se midió por ensayo cromogénico de FVIII y el perfil PK se analizó por el programa WinNonlin.

Resultados: Como se muestra en la tabla 32 y la FIG. 24, la CFXTEN con la inserción de XTEN AE en el extremo C (pBC0145) mostró prolongación de 1,6 veces y 14,1 veces de la semivida de FVIII (T1/2) en comparación con rBDD FVIII en ratones HemA y ratones FVIII/VWF DKO, respectivamente. La CFXTEN con la inserción de XTEN AG en el extremo C (pBC0146) tuvo una semivida prolongada 1,4 veces y 14,4 veces en comparación con rBDD-FVIII en ratones HemA y ratones FVIII/VWF DKO, respectivamente. La magnitud de la prolongación de la semivida de FVIII conferida por la inserción de XTEN fue mucho más pronunciada en los ratones FVIII/VWF DKO en comparación con los ratones HemA, demostrada por la semivida de FVIII 14 veces más larga tanto de FVIII-AE-XTEN como de FVIII-AG-XTEN en comparación con rBDD-FVIII. Además, en comparación con rBDD-FVIII, FVIII con inserción de AE o AG-XTEN C terminal también tuvo recuperación de FVIII significativamente mejorada en el intervalo de 5 min, eliminación y volumen de distribución reducidos, y ABC aumentada en los ratones DKO. En las condiciones del experimento, la CFXTEN con inserciones de XTEN C terminales demostró gran potencial sobre la prolongación de la semivida de FVIII y, cuando se combinaba con otras inserciones dentro de los dominios de FVIII, podía prolongar potencialmente más la semivida de FVIII.

Tabla 32: Parámetros farmacocinéticos de CFXTEN en ratones HemA y FVIII/VWF DKO

Cepa de ratón	Tratamiento	Recuperación en 5 min (%)	$T_{1/2}$ (h)	MRT (h)	Cl (ml/h/kg)	Vss (ml/kg)	ABC_D (hkgmUI/ml/mUI)	Aumento factorial de $T_{1/2}$	Cepa de ratón
HemA	pBC0145	73	11,88	16,47	3,81	62,74	0,26	1,6	HemA
	pBC0146	64	10,54	13,31	5,66	75,34	0,18	1,4	
	rBDD-FVIII	89	7,58	11,02	4,33	47,68	0,23		
FVIII/VWF DKO	pBC0145	74	3,38	3,76	13,06	63,68	0,0765	13,9	FVIII/VWF DKO
	pBC0146	61	3,45	3,61	17,40	86,63	0,0575	14,2	
	rBDD-FVIII	23	0,24	0,24	460,62	161,51	0,0022		
En comparación con rBDD-FVIII									

ES 2 935 489 T3

Ejemplo 31: Cultivo celular y concentración del medio de cultivo celular para las proteínas de fusión de CFXTEN pSD0050 y pSD0062

Las variantes de construcción de CFXTEN pSD0050 con un AG XTEN dentro del dominio de 144 aminoácidos insertado después del residuo aminoacídico 26 de BDD FVIII, pSD0062 con un AE XTEN dentro del dominio de 144 aminoácidos insertado después del residuo 1900 de BDD FVIII (nota: la numeración de aminoácidos se basa en FVIII de longitud completa), así como una construcción que codifica rBDD-FVIII, se transfectaron en células HEK293F (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando polietilenimina (PEI, Polysciences Inc. Warrington, PA). Las células transfectadas de forma transitoria se cultivaron en medio 293 Free Style (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 4 días y entonces 50-100 ml de medio de cultivo celular se concentraron de 10 a 20 veces mediante columna Centricon Spin (100 kDa de punto de corte de PM) hasta alcanzar 10-30 UI/ml de actividad de FVIII. Los materiales concentrados entonces se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80 °C para futuro análisis *in vitro* y estudios farmacocinéticos *in vivo*.

Ejemplo 32: Farmacocinética de las proteínas de fusión de CFXTEN pSD0050 y pSD0062 en ratones HemA y FVIII/VWF DKO

Ratones macho HemA o con doble inactivación (DKO) de FVIII/VWF, de 8-12 semanas de edad, se trataron con una sola administración intravenosa de concentrados de cultivo celular del ejemplo 31 que contenían BDD-FVIII recombinante, la CFXTEN pBD0050 o pBD062 a 100-300 UI/kg (n = 3/grupo). En puntos temporales seleccionados, se recogieron muestras de sangre mediante exanguinaciones retroorbitales del mismo conjunto de ratones. En ratones HemA, se recogieron muestras de sangre a los 5 min, 24 h y 48 h después de la dosis, mientras que en ratones FVIII/VWF DKO se recogieron muestras de sangre a los 5 min, 8 h y 16 h. La actividad de FVIII de muestras de plasma y concentrados de cultivo celular se analizó mediante un ensayo cromogénico de FVIII, y el perfil PK de rBDD FVIII y variantes de FVIII-XTEN se analizó usando el programa WinNonlin.

Resultados: Los perfiles PK de las dos variantes de inserción dentro del dominio de CFXTEN pSD0050 y pSD0062 y rBDD-FVIII en ratones HemA y ratones FVIII/VWF DKO se muestran en la FIG. 25 y la tabla 33. En ratones HemA, se observó una recuperación inicial comparable al intervalo de 5 min para las tres moléculas de FVIII de ensayo. Ambas proteínas de fusión de CFXTEN demostraron semivida dos veces más larga en comparación con BDD-FVIII de tipo silvestre. En ratones FVIII-VWF DKO, a causa de la pérdida de protección de VWF, rBDD-FVIII tuvo una semivida en plasma de solamente 15 min. En el caso de las dos CFXTEN, sin embargo, la semivida se prolongó hasta 3,15 h y 3,83 h, respectivamente; valores que son comparables con la CFXTEN con inserciones de XTEN C terminal de 288 (ejemplo 24), lo que sugiere que puede no ser necesaria prolongación adicional de la longitud de XTEN en un punto de inserción dado. En las condiciones experimentales, los resultados del estudio demuestran claramente que la inserción dentro del dominio de un XTEN con 144 residuos aminoacídicos no solamente conservaba la actividad de FVIII, sino que también proporcionaba beneficio de semivida de FVIII similar a las variantes de inserción de XTEN de 288 aminoácidos C terminal, lo que sugiere que la combinación de las inserciones dentro del dominio de FVIII y C terminales puede permitir prolongación adicional de la semivida de FVIII.

Tabla 33: Parámetros farmacocinéticos de CFXTEN en ratones HemA y FVIII/VWF DKO

Cepa de ratón	Tratamiento	Recuperación en 5 min (%)	$T_{1/2}$ (h)	MRT (h)	Cl (ml/h/kg)	Vss (ml/kg)	ABC_D (hkgmUI/ml/mUI)	Aumento factorial de $T_{1/2}$
HemA	pSD0050	40	14,12	14,25	5,27	75,03	0,19	2,3
	pSD0062	43	12,96	14,79	4,24	62,67	0,24	2,1
	rBDD-FVIII	47	6,19	2,62	6,35	16,62	0,16	
FVIII/VWF DKO	pSD0050	34	3,15	2,59	21,73	56,28	0,05	~12
	pSD0062	35	3,83	3,71	18,51	68,69	0,05	~15
	rBDD-FVIII	23	~0,25					
En comparación con rBDD-FVIII								

Ejemplo 33: Análisis farmacocinéticos de polipéptidos de fusión de CFXTEN en ratas

La farmacocinética de diversas proteínas de fusión de CFXTEN, en comparación con FVIII en solitario, se ensayó en ratas Sprague-Dawley. La CFXTEN y el FVIII se administran a ratas Sprague-Dawley hembra (n = 3) IV mediante un catéter en la vena yugular a 3-10 µg/rata. Se recogen muestras de sangre (0,2 ml) en tubos heparinizados enfriados previamente en los puntos temporales antes de la dosis, 0,08, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 horas, y se procesaron en plasma. La cuantificación de los artículos de ensayo se realiza por ensayo de ELISA usando un anticuerpo anti-FVIII tanto para la captura como para la detección. Se realiza un análisis no compartimentado en WinNonLin con todos los puntos temporales incluidos en el ajuste para determinar los parámetros PK. Se espera que los resultados muestran semivida terminal y área bajo la curva aumentadas, y un volumen reducido de distribución para la CFXEN en comparación con FVIII en solitario, y los resultados se usan junto con los resultados de ensayos de coagulación y farmacodinámicos para seleccionar aquellas configuraciones de proteína de fusión con propiedades deseadas.

Ejemplo 34: Análisis de FVIII para sitios de inserción de XTEN

La selección de sitios de inserción de XTEN dentro de la molécula de factor VIII se realizó prediciendo las ubicaciones de sitios permisivos dentro de estructuras de bucle o elementos estructurales expuestos en superficie flexibles de otro modo. Para estos análisis, se usaron las coordenadas atómicas de dos estructuras cristalográficas de rayos X determinadas independientemente de FVIII (Shen BW, *et al*. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. Blood. (2008) febrero 1; 111(3):1240-1247; Ngo JC, *et al*. Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. Structure (2008)16(4):597-606), así como las de factor VIII y factor VIIIa derivadas de simulación dinámica molecular (MDS) (Venkateswarlu, D. Structural investigation of zymogenic and activated forms of human blood coagulation factor VIII: a computational molecular dynamics study. BMC Struct Biol. (2010) 10:7). Se analizaron coordenadas atómicas en formato de Protein Data Bank (PDB) para identificar regiones del FVIII/FVIIIa que se ha predicho que tendrán un área superficial accesible a disolvente de alto grado usando los algoritmos ASAView (Ahmad S, *et al*. ASAView: database and tool for solvent accessibility representation in proteins. BMC Bioinformatics (2004) 5:51) y GetArea (Rychkov G, Petukhov M. Joint neighbors approximation of macromolecular solvent accessible surface area. J Comput Chem (2007) 28(12):1974-1989). El conjunto resultante de sitios se priorizó entonces basándose en la fluctuación posicional atómica predicha elevada basada en los resultados publicados del estudio de MDS. Se despriorizaron sitios dentro de las regiones peptídicas ácidas que flanquean los dominios A1, A2 y A3, así como aquellos que parecían, por inspección visual, estar en zonas distintas de los bucles expuestos en superficie. El conjunto resultante de sitios potenciales se evaluó basándose en la conservación de secuencias entre especies, clasificándose los sitios en las regiones de alta conservación de secuencia entre 20 especies de vertebrados de forma más favorable. Adicionalmente, también se consideraron sitios de unión a receptor de eliminación putativos, sitios de interacción de FVIII con otras moléculas (tales como vWF, FIX), límites de dominios y exones en la selección de sitios de fusión. Finalmente, sitios que están dentro de una cercana proximidad a mutaciones implicadas en hemofilia A enumeradas en la base de datos Haemophilia A Mutation, Search, Test and Resource Site (HAMSTeRS) se eliminaron (Kemball-Cook G, *et al.* The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS versión 4. Nucleic Acids Res. (1998) 26(1):216-219). Basándose en estos criterios, se propuso la construcción de 42 variantes de FVIII-XTEN para inserciones de XTEN. De estas, tres representan inserciones de XTEN dentro de la secuencia del dominio B residual, dos representan prolongaciones en el extremo C de la molécula de factor VIII y 37 representan inserciones de XTEN dentro de elementos estructurales entre dominios y dentro de dominios estructuralmente definidos; es decir, los residuos 3, 18, 22, 26, 40, 60, 116, 130, 188, 216, 230, 333, 375, 403, 442, 490, 518, 599, 713, 745, 1720, 1796, 1802, 1827, 1861, 1896, 1900, 1904, 1937, 2019, 2068, 2111, 2120, 2171, 2188, 2227, 2277 y 2332.

Ejemplo 35: Análisis funcional de construcciones de FVIII-XTEN

Dos proteínas de fusión de FVIII-XTEN, FVIII-AE288 (F8X-40) y FVIII-AG288 (F8X-41), contienen un AE288_1 XTEN o un AG288_1 XTEN, respectivamente, fusionado en el extremo C del dominio C2 de FVIII. Para determinar si la actividad de FVIII se retenía después de la fusión del XTEN, se transfectaron células HEK293 por separado con estas dos construcciones de fusión de FVIII-XTEN usando polietilenimina (PEI) en medio sin suero. A los 3 o 5 días después de la transfección, el sobrenadante de cultivo celular se ensayó para la actividad de FVIII mediante un ensayo cromogénico de dos fases. El FVIII recombinante purificado, calibrado frente al patrón internacional de la OMS, se usó para establecer la curva patrón en el ensayo cromogénico. Los productos de proteína de fusión de ambas construcciones F8X-40 y F8X-41 se expresaron a niveles comparables con los de construcciones de BDD-FVIII de tipo silvestre. (Tabla 34).

Tabla 34. Concentración de FVIII de proteínas de fusión de FVIII-XTEN en cultivo celular de transfección transitoria

Moléculas de FVIII		FVIII 066[a]	pBC 0114[a]	F8X-40	H8X-41
Actividad de FVIII (UI/ml)	Muestra A	6,42	6,68	7,47	3,32[b]
	Muestra B	7,13	7,61	8,25	No realizado
a. Tanto FVIII 066 como pBC 0114 contienen FVIII con el dominio B eliminado sin fusión de XTEN. b. La muestra F8X-41 era de una transfección de 3 días mientras que las otras muestras eran de una transfección transitoria de 5 días.					

Ejemplo 36: Análisis funcional de construcciones de FVIII-XTEN: Actividad de FVIII y propiedades PK

El potencial de prolongación de la semivida de las construcciones F8X-40 y F8X-41 se evaluó en ratones con doble inactivación de FVIII y factor de Von Willebrand mediante inyección hidrodinámica de ADN plasmídico, sirviendo una construcción de ADNc de FVIIIFc como control positivo. Los ratones se dividieron aleatoriamente en 3 grupos con 4 ratones por grupo. El ADN plasmídico que codifica la proteína de fusión de BDD FVIIIFc, F8X-40 o F8X-41, que comparten, todos, la misma cadena principal del vector de ADN, se administró a los ratones en los grupos respectivos. Se inyectaron aproximadamente 100 microgramos del ADN plasmídico apropiado en cada ratón mediante inyección hidrodinámica, y se recogieron muestras de plasma sanguíneo a las 24 horas y 48 horas después de la inyección. La actividad de FVIII plasmática se midió mediante un ensayo cromogénico de dos fases usando FVIII recombinante calibrado como patrón. Como se muestra en la FIG. 23, muestras de los grupos F8X-40 y F8X-41 mostraron mayores

concentraciones de FVIII en plasma que las de BDD FVIIIFc, lo que sugiere que la fusión de FVIII con XTEN prolonga la semivida de FVIII *in vivo.* Tomados conjuntamente, estos datos respaldan la conclusión de que las proteínas de fusión de FVIII-XTEN retenían la actividad de FVIII en transfección transitoria y mostraban semivida en circulación prolongada en un modelo animal.

Ejemplo 37: Evaluación farmacodinámica de CFXTEN en modelos animales

La actividad farmacológica *in vivo* de proteínas de fusión de CFXTEN se evalúa usando una diversidad de modelos preclínicos de hemorragia incluyendo, aunque sin limitación, los de hemofilia, cirugía, traumatismo, trombocitopenia/disfunción plaquetaria, hemorragia inducida por clopidogrel/heparina e inyección hidrodinámica. Estos modelos se desarrollan en múltiples especies incluyendo ratones, ratas, conejos y perros usando métodos equivalentes a los usados y publicados para otras estrategias de FVIII. Se proporcionan composiciones de CFXTEN en un tampón acuoso compatible con administración *in vivo* (por ejemplo: disolución salina tamponada con fosfato o disolución salina tamponada con Tris). Las composiciones se administran a las dosis, frecuencia de dosificación, pauta posológica y vía de administración apropiadas que se optimizan para el modelo particular. Las determinaciones de eficacia incluyen medición de la actividad de FVIII, ensayo de coagulación de una fase, ensayo cromogénico de FVIII, tiempo de protrombina parcial activada (aPTT), tiempo de hemorragia, tiempo de coagulación de sangre completa (WBCT), tromboelastografía (TEG o ROTEM), entre otros.

En un ejemplo de un modelo de PD, se administran CFXTEN y FVIII a ratones HemA genéticamente deficientes o inducidos de forma experimental. En diversos puntos temporales después de la administración, se miden los niveles de FVIII y CFXTEN mediante ELISA, la actividad de FVIII y CFXTEN se mide mediante kits de actividad de FVIII disponibles en el mercado y el tiempo de coagulación se mide mediante un ensayo de aPTT. Globalmente, los resultados pueden indicar que las construcciones de CFXTEN pueden ser más eficaces en inhibir la hemorragia en comparación con FVIII y/o equivalentes en potencia a la dosificación comparable de FVIII con intervalos de dosificación menos frecuentes o más convenientes.

En un modelo de PD de ratón de sobrecarga hemorrágica, se administran CFXTEN y FVIII a ratones HemA genéticamente deficientes o inducidos de forma experimental y se mide el efecto de la sobrecarga hemostática. La sobrecarga hemostática puede incluir sobrecarga por transacción de la cola, sobrecarga por hemartrosis, hemorragia articular o sobrecarga de la vena safena entre otras. En diversos puntos temporales después de la administración, se miden los niveles de FVIII y CFXTEN mediante ELISA, la actividad de FVIII y CFXTEN se mide mediante kit de actividad de FVIII disponible en el mercado, se mide el tiempo de hemorragia y el tiempo de coagulación se mide mediante un ensayo de aPTT. Globalmente, se espera que los resultados indiquen que las construcciones de CFXTEN sean más eficaces en inhibir la hemorragia en comparación con FVIII y/o equivalentes en potencia a una dosificación comparable de FVIII con intervalos de dosificación menos frecuentes o más convenientes, y los resultados se usan junto con los resultados de coagulación y otros ensayos para seleccionar aquellas configuraciones de proteína de fusión con propiedades deseadas.

En un modelo de PD de perro, se administran CFXTEN y FVIII a perros hemofílicos genéticamente deficientes. En diversos puntos temporales después de la administración, se miden los niveles de FVIII y CFXTEN mediante ELISA, la actividad de FVIII y CFXTEN se mide mediante kit de actividad de FVIII disponible en el mercado y el tiempo de coagulación se mide mediante un ensayo de aPTT. Globalmente, los resultados indican que las construcciones de CFXTEN pueden ser más eficaces en inhibir la hemorragia en comparación con FVIII y/o equivalentes en potencia a una dosificación comparable de FVIII con dosificación menos frecuente o más conveniente, y los resultados se usan junto con los resultados de coagulación y otros ensayos para seleccionar aquellas configuraciones de proteína de fusión con propiedades deseadas.

En un modelo de PD de perro de sobrecarga hemorrágica, se administran CFXTEN y FVIII a perros hemofílicos genéticamente deficientes y se mide el efecto sobre la sobrecarga hemorrágica. La sobrecarga hemostática incluye tiempo de hemorragia cuticular entre otras. En diversos puntos temporales después de la administración, se miden los niveles de FVIII y CFXTEN mediante ELISA, la actividad de FVIII y CFXTEN se mide mediante kit de actividad de FVIII disponible en el mercado, se mide el tiempo de hemorragia y el tiempo de coagulación se mide mediante un ensayo de aPTT. Globalmente, los resultados indican que las construcciones de CFXTEN pueden ser más eficaces en inhibir la hemorragia en comparación con FVIII y/o equivalentes en potencia a una dosificación comparable de FVIII con intervalos de dosificación menos frecuentes o más convenientes, y los resultados se usan junto con los resultados de coagulación y otros ensayos para seleccionar aquellas configuraciones de proteína de fusión con propiedades deseadas.

Modelos preclínicos adicionales de hemorragia incluyen, aunque sin limitación, los de hemofilia, cirugía, traumatismo, trombocitopenia/disfunción plaquetaria, hemorragia inducida por clopidogrel/heparina e inyección hidrodinámica. Estos modelos pueden desarrollarse en múltiples especies incluyendo ratones, ratas, conejos y perros usando métodos equivalentes a los usados y publicados para otras estrategias de FVIII. Globalmente, los resultados indican que las construcciones de CFXTEN pueden ser más eficaces en inhibir la hemorragia en comparación con FVIII y/o equivalentes en potencia a una dosificación comparable de FVIII con intervalos de dosificación menos frecuentes o

más convenientes, y los resultados se usan junto con los resultados de coagulación y otros ensayos para seleccionar aquellas configuraciones de proteína de fusión con propiedades deseadas.

Ejemplo 38: CFXTEN con secuencias de escisión

XTEN C terminal liberable por FXIa

Se crea una proteína de fusión de CFXTEN que consiste en una proteína de XTEN fusionada en el extremo C de FVIII con una secuencia de escisión del sitio de liberación de XTEN colocada entre los componentes de FVIII y XTEN, como se representa en la FIG. 12. Se proporcionan secuencias ejemplares en la tabla 51. En este caso, la secuencia de escisión del sitio de liberación se incorpora en la CFXTEN que contiene una secuencia de aminoácidos que se reconoce y escinde por la proteasa FXIa (EC 3.4.21.27, Uniprot P03951). Específicamente, la secuencia de aminoácidos KLTRAET (SEQ ID NO: 1688) se corta después de la arginina de la secuencia por la proteasa FXIa. FXI es la proteasa procoagulante ubicada inmediatamente antes de FVIII en la vía de coagulación intrínseca o activada por contacto. FXIa activo se produce a partir de FXI por escisión proteolítica del zimógeno por FXIIa. La producción de FXIa está muy controlada y se produce únicamente cuando es necesaria la coagulación para la hemostasia apropiada. Por lo tanto, mediante la incorporación de la secuencia de escisión KLTRAET (SEQ ID NO: 1688), el dominio de XTEN se elimina únicamente de FVIII simultáneamente con la activación de la vía de coagulación intrínseca y cuando se requiere coagulación fisiológicamente. Esto crea una situación donde la proteína de fusión de CFXTEN se procesa de una manera adicional durante la activación de la vía intrínseca.

XTEN C terminal liberable por FIIa (trombina)

Se crea una proteína de fusión de CFXTEN que consiste en una proteína de XTEN fusionada en el extremo C de FVIII con una secuencia de escisión del sitio de liberación de XTEN colocada entre los componentes de FVIII y XTEN, como se representa en la FIG. 12. En este caso, el sitio de liberación contiene una secuencia de aminoácidos que se reconoce y escinde por la proteasa FIIa (EC 3.4.21.5, Uniprot P00734). Específicamente, la secuencia LTPRSLLV (SEQ ID NO: 1618) [Rawlings N.D., *et al.* (2008) *Nucleic Acids Res.*, 36: D320], se corta después de la arginina en la posición 4 en la secuencia. FIIa activo se produce por escisión de FII por FXa en presencia de fosfolípidos y calcio y es posterior al factor IX en la vía de coagulación. Una vez activado, su función natural en la coagulación es escindir el fibrinógeno (FIG. 2), que entonces, a su vez, empieza la formación del coágulo. La actividad de FIIa está muy controlada y se produce únicamente cuando es necesaria la coagulación para la hemostasia apropiada. Por lo tanto, mediante la incorporación de la secuencia LTPRSLLV (SEQ ID NO: 1618), el dominio de XTEN se elimina únicamente de FVIII simultáneamente con la activación de la vía de coagulación extrínseca o intrínseca, y cuando se requiere coagulación fisiológicamente. Esto crea una situación donde la fusión de CFXTEN se procesa de una manera adicional durante la activación de la coagulación.

XTEN C terminal liberable por elastasa-2

Se crea una proteína de fusión de CFXTEN que consiste en una proteína de XTEN fusionada en el extremo C de FVIII con una secuencia de escisión del sitio de liberación de XTEN colocada entre los componentes de FVIII y XTEN, como se representa en la FIG. 12. Se proporcionan secuencias ejemplares en la tabla 51. En este caso, el sitio de liberación contiene una secuencia de aminoácidos que se reconoce y escinde por la proteasa elastasa-2 (EC 3.4.21.37, Uniprot P08246). Específicamente, la secuencia LGPVSGVP (SEQ ID NO: 1689) [Rawlings N.D., *et al.* (2008) *Nucleic Acids Res.*, 36: D320], se corta después de la posición 4 en la secuencia. La elastasa se expresa de forma constitutiva por neutrófilos y está presente todo el tiempo en la circulación. Su actividad está muy controlada por las serpinas y, por lo tanto, es mínimamente activa la mayor parte del tiempo. Por lo tanto, según circula la CFXTEN de larga duración, una fracción de la misma se escinde, creando una combinación de FVIII de duración más corta a usar en la coagulación. En una característica deseable de la composición de la enseñanza, esto crea un depósito de profármaco en circulación que libera constantemente una cantidad profiláctica de FVIII.

XTEN C terminal liberable por MMP-12

Se crea una proteína de fusión de CFXTEN que consiste en una proteína de XTEN fusionada en el extremo C de FVIII con una secuencia de escisión del sitio de liberación de XTEN colocada entre los componentes de FVIII y XTEN, como se representa en la FIG. 12. Se proporcionan secuencias ejemplares en la tabla 51. En este caso, el sitio de liberación contiene una secuencia de aminoácidos que se reconoce y escinde por la proteasa MMP-12 (EC 3.4.24.65, Uniprot P39900). Específicamente, la secuencia GPAGLGGA (SEQ ID NO: 1690) [Rawlings N.D., *et al.* (2008) *Nucleic Acids Res.*, 36: D320], se corta después de la posición 4 de la secuencia. MMP-12 se expresa de forma constitutiva en sangre completa. Por lo tanto, según circula la CFXTEN de larga duración, una fracción de la misma se escinde, creando una combinación de FVIII de duración más corta a usar en la coagulación. En una característica deseable de la composición de la enseñanza, esto crea un depósito de profármaco en circulación que libera constantemente una cantidad profiláctica de FVIII.

XTEN C terminal liberable por MMP-13

Se crea una proteína de fusión de CFXTEN que consiste en una proteína de XTEN fusionada en el extremo C de FVIII con una secuencia de escisión del sitio de liberación de XTEN colocada entre los componentes de FVIII y XTEN, como se representa en la FIG. 12. Se proporcionan secuencias ejemplares en la tabla 51. En este caso, el sitio de liberación contiene una secuencia de aminoácidos que se reconoce y escinde por la proteasa MMP-13 (EC 3.4.24.-, Uniprot P45452). Específicamente, la secuencia GPAGLRGA (SEQ ID NO: 1691) [Rawlings N.D., *et al.* (2008) *Nucleic Acids Res*., 36: D320], se corta después de la posición 4. MMP-13 se expresa de forma constitutiva en sangre completa. Por lo tanto, según circula la CFXTEN de larga duración, una fracción de la misma se escinde, creando una combinación de FVIII de duración más corta a usar en la coagulación. En una característica deseable de la composición de la enseñanza, esto crea un depósito de profármaco en circulación que libera constantemente una cantidad profiláctica de FVIII.

XTEN C terminal liberable por MMP-17

Se crea una proteína de fusión de CFXTEN que consiste en una proteína de XTEN fusionada en el extremo C de FVIII con una secuencia de escisión del sitio de liberación de XTEN colocada entre los componentes de FVIII y XTEN, como se representa en la FIG. 12. Se proporcionan secuencias ejemplares en la tabla 51. En este caso, el sitio de liberación contiene una secuencia de aminoácidos que se reconoce y escinde por la proteasa MMP-20 (EC.3.4.24.-, Uniprot Q9ULZ9). Específicamente, la secuencia APLGLRLR (SEQ ID NO: 1692) [Rawlings N.D., *et al.* (2008) *Nucleic Acids Res*., 36: D320], se corta después de la posición 4 en la secuencia. MMP-17 se expresa de forma constitutiva en sangre completa. Por lo tanto, según circula la CFXTEN de larga duración, una fracción de la misma se escinde, creando una combinación de FVIII de duración más corta a usar en la coagulación. En una característica deseable de la composición de la enseñanza, esto crea un depósito de profármaco en circulación que libera constantemente una cantidad profiláctica de FVIII.

XTEN C terminal liberable por MMP-20

Se crea una proteína de fusión de CFXTEN que consiste en una proteína de XTEN fusionada en el extremo C de FVIII con una secuencia de escisión del sitio de liberación de XTEN colocada entre los componentes de FVIII y XTEN, como se representa en la FIG. 12. Se proporcionan secuencias ejemplares en la tabla 51. En este caso, el sitio de liberación contiene una secuencia de aminoácidos que se reconoce y escinde por la proteasa MMP-20 (EC.3.4.24.-, Uniprot 060882). Específicamente, la secuencia PALPLVAQ (SEQ ID NO: 1693) [Rawlings N.D., *et al.* (2008) *Nucleic Acids Res*., 36: D320], se corta después de la posición 4 (representada por la flecha). MMP-20 se expresa de forma constitutiva en sangre completa. Por lo tanto, según circula la CFXTEN de larga duración, una fracción de la misma se escinde, creando una combinación de FVIII de duración más corta a usar en la coagulación. En una característica deseable de la composición de la enseñanza, esto crea un depósito de profármaco en circulación que libera constantemente una cantidad profiláctica de FVIII.

Optimización de la tasa de liberación de XTEN

Pueden crearse variantes de los ejemplos anteriores en que la tasa de liberación del XTEN incorporado en el extremo C, el extremo N o XTEN interno se altera. Como la tasa de liberación de XTEN por una proteasa de liberación de XTEN depende de la secuencia del sitio de liberación de XTEN, variando la secuencia de aminoácidos en el sitio de liberación de XTEN se puede controlar la tasa de liberación de XTEN. La especificidad de secuencia de muchas proteasas es bien conocida en la técnica, y está documentada en varias bases de datos. En este caso, la especificidad de aminoácidos de las proteasas se cartografía usando colecciones combinatorias de sustratos [Harris, J. L., *et al*. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97: 7754] o siguiendo la escisión de mezclas de sustratos como se ilustra en [Schellenberger, V., *et al*. (1993) *Biochemistry*, 32: 4344]. Una alternativa es la identificación de secuencias de escisión por proteasa óptimas por presentación en fagos [Matthews, D., *et al*. (1993) Science, 260: 1113]. Se preparan construcciones con secuencias variantes y se ensayan para la liberación de XTEN usando ensayos convencionales para la detección de los polipéptidos XTEN.

Ejemplo 39: Diseños de ensayos clínicos en seres humanos para evaluar CFXTEN que comprende FVIII

Kogenate® FS es factor VIII de coagulación humano recombinante, destinado a promover la hemostasia en sujetos con hemofilia A. Debido a su corta semivida, Kogenate se dosifica por vía intravenosa en días alternos para profilaxis y de cada 8 a cada 12 h en tratamiento de hemorragias hasta que se consigue hemostasia. Se cree que la fusión de uno o más XTEN a FVIII mejora la semivida de la proteína, posibilitando una frecuencia de dosificación reducida usando dichas composiciones de proteína de fusión que contiene CFXTEN.

Se diseñan ensayos clínicos de modo que la eficacia y las ventajas de CFXTEN, con respecto a Kogenate u otras preparaciones de FVIII disponibles en el mercado, pueden verificarse en seres humanos. Dichos estudios comprenden tres fases. En primer lugar, se realiza un estudio de fase I de la seguridad y la farmacocinética en pacientes adultos para determinar la dosis tolerada máxima y la farmacocinética y farmacodinámica en seres humanos (sujetos normales o pacientes con hemofilia), así como para definir las toxicidades potenciales y los acontecimientos adversos a rastrear

en futuros estudios. Se realizan estudios de fase I en que dosis crecientes individuales de composiciones de CFXTEN se administran por la vía (por ejemplo, subcutánea, intramuscular o intravenosa) y se miden los parámetros bioquímicos, PK y clínicos a intervalos definidos. Esto permite la determinación de la dosis eficaz mínima y la dosis tolerada máxima y establece las concentraciones de umbral y máxima en la dosificación y el fármaco en circulación que constituyen la ventana terapéutica para los componentes respectivos, así como la biodisponibilidad cuando se administran por vía intramuscular o subcutánea. A partir de esta información, se obtiene la dosis y pauta posológica que permite la administración menos frecuente de las composiciones de CFXTEN, que aún retiene la respuesta farmacológica. Después de ello, se realizan ensayos clínicos en pacientes con la afección, que verifican la eficacia de las composiciones de CFXTEN en las condiciones de dosis, que puede realizarse en comparación con un control positivo tal como Kogenate para establecer las propiedades potenciadas de las composiciones de CFXTEN.

Se realizan ensayos clínicos de fase II y III en pacientes que padecen cualquier enfermedad en que puede esperarse que el factor VIII proporcione beneficio clínico. Por ejemplo, la CFXTEN se usa en ensayos clínicos para el tratamiento de indicaciones aprobadas para el uso de factor VIII; dichas indicaciones incluyen episodios hemorrágicos en pacientes de hemofilia A con inhibidores del factor VIII, prevención de hemorragia en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes de hemofilia A con inhibidores de factor VIII, tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con deficiencia congénita de factor VIII, y prevención de hemorragia en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con deficiencia congénita de factor VIII. La CFXTEN también puede estar indicada para su uso en poblaciones de pacientes adicionales. Se realiza un estudio de dosis de fase II en pacientes de hemofilia A donde se miden parámetros farmacodinámicos, de coagulación, hemorrágicos y otros fisiológicos, PK, de seguridad y clínicos y criterios de valoración clínicos apropiados para ensayos como una función de la dosificación de las composiciones de proteínas de fusión, produciendo información de intervalo de dosis sobre dosis que es apropiada para un ensayos posterior de fase III, además de recoger datos de seguridad relacionados con acontecimientos adversos. Los parámetros PK se correlacionan con los datos de parámetros fisiológicos, clínicos y de seguridad para establecer la ventana terapéutica y la pauta posológica terapéutica para la composición de CFXTEN, lo que permite al médico establecer los intervalos de dosis apropiados para la composición. En un ensayo, pacientes de hemofilia A con inhibidores del factor VIII se evaluarían para establecer las dosis y la pauta posológica de composiciones farmacéuticas de CFXTEN que provocan conseguir y mantener la hemostasia y prevenir o atenuar los episodios hemorrágicos. Finalmente, se realiza un estudio de fase III de eficacia, en el que a los pacientes se les administra la composición farmacéutica de CFXTEN y un control positivo (tal como un Kogenate disponible en el mercado) usando una pauta posológica considerada apropiada dadas las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de las composiciones respectivas derivadas de los hallazgos de la fase II, con todos los agentes administrados durante un periodo de tiempo apropiadamente prolongado para conseguir los criterios de valoración del estudio. Los parámetros que se controlan incluyen ensayo de aPTT, ensayos de coagulación de una o dos fases, control de episodios hemorrágicos, o la aparición de episodios hemorrágicos espontáneos; parámetros que se rastrean con respecto a los grupos de placebo o de control positivo. Los resultados de eficacia se determinan usando métodos estadísticos convencionales. También se siguen marcadores de toxicidad y acontecimientos adversos en este estudio para verificar que el compuesto es seguro cuando se usa de la manera descrita. En otro ensayo de fase III, pacientes de hemofilia A con inhibidores del factor VIII se evaluarían para establecer la eficacia de composiciones farmacéuticas de CFXTEN en conseguir y mantener la hemostasia y prevenir o atenuar los episodios hemorrágicos.

Ejemplo 40: Cromatografía analítica de exclusión por tamaño de proteínas de fusión de XTEN con cargas diversas

Se realizaron análisis de cromatografía de exclusión por tamaño sobre proteínas de fusión que contenían diversas proteínas terapéuticas y proteínas recombinantes no estructuradas de longitud creciente. Un ensayo ejemplar usó una columna TSKGel-G4000 SWXL (7,8 mm x 30 cm) en que se separaron 40 µg de proteína de fusión de glucagón purificada a una concentración de 1 mg/ml a un caudal de 0,6 ml/min en fosfato 20 mM pH 6,8, NaCl 114 mM. Los perfiles del cromatograma se controlaron usando DO 214 nm y DO 280 nm. La calibración de la columna para todos los ensayos se realizó usando un patrón de calibración de exclusión por tamaño de BioRad; los marcadores incluyen tiroglobulina (670 kDa), gammaglobulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina de pollo (44 kDa), mioglobulina equina (17 kDa) y vitamina B12 (1,35 kDa). Los perfiles cromatográficos representativos de glucagón-Y288, glucagón-Y144, glucagón-Y72, glucagón-Y36 se muestran como una superposición en la FIG. 21. Los datos muestran que el peso molecular aparente de cada compuesto es proporcional a la longitud de la secuencia de XTEN adherida. Sin embargo, los datos también muestran que el peso molecular aparente de cada construcción es significativamente más grande que el esperado para una proteína globular (como se muestra por la comparación con las proteínas de patrón procesadas en el mismo ensayo). Basándose en los análisis de SEC para todas las construcciones evaluadas, incluyendo una composición de CFXTEN, los pesos moleculares aparentes, el factor de peso molecular aparente (expresado como la relación del peso molecular aparente al peso molecular calculado) y el radio hidrodinámico (R_H en nm) se muestran en la tabla 35. Los resultados indican que la incorporación de diferentes XTEN de 576 aminoácidos o mayores confiere un peso molecular aparente para la proteína de fusión de aproximadamente 339 kDa a 760, y que el XTEN de 864 aminoácidos o mayor confiere un peso molecular aparente mayor de aproximadamente 800 kDa. Los resultados de aumentos proporcionales en el peso molecular aparente al peso molecular real fueron coherentes para proteínas de fusión creadas con XTEN de varias familias de motivo diferentes; es decir, AD, AE, AF, AG y AM, con aumentos de al menos cuatro veces y relaciones tan altas como de aproximadamente 17 veces. Adicionalmente, la

incorporación de compañeros de fusión de XTEN con 576 aminoácidos o más en proteínas de fusión con las diversas cargas (y 288 residuos en el caso de glucagón fusionado a Y288) produjo un radio hidrodinámico de 7 nm o mayor, mucho más allá del tamaño de poro glomerular de aproximadamente 3-5 nm. Por consiguiente, se espera que proteínas de fusión que comprenden cultivo y XTEN tienen eliminación renal reducida, lo que contribuye a una semivida terminal aumentada y mejora del efecto terapéutico o biológico con respecto a una proteína de carga biológica sin fusionar correspondiente.

Tabla 35: Análisis por SEC de diversos polipéptidos

Nombre de la construcción	XTEN o compañero de fusión	Proteína terapéutica	PM real (kDa)	PM aparente (kDa)	Factor de peso molecular aparente	R_H (nm)
AC14	Y288	Glucagón	28,7	370	12,9	7,0
AC28	Y144	Glucagón	16,1	117	7,3	5,0
AC34	Y72	Glucagón	9,9	58,6	5,9	3,8
AC33	Y36	Glucagón	6,8	29,4	4,3	2,6
AC89	AF120	Glucagón	14,1	76,4	5,4	4,3
AC88	AF108	Glucagón	13,1	61,2	4,7	3,9
AC73	AF144	Glucagón	16,3	95,2	5,8	4,7
AC53	AG576	GFP	74,9	339	4,5	7,0
AC39	AD576	GFP	76,4	546	7,1	7,7
AC41	AE576	GFP	80,4	760	9,5	8,3
AC52	AF576	GFP	78,3	526	6,7	7,6
AC398	AE288	FVII	76,3	650	8,5	8,2
AC404	AE864	FVII	129	1900	14,7	10,1
AC85	AE864	Exendina-4	83,6	938	11,2	8,9
AC114	AM875	Exendina-4	82,4	1344	16,3	9,4
AC143	AM875	hGH	100,6	846	8,4	8,7
AC227	AM875	IL-1ra	95,4	1103	11,6	9,2
AC228	AM1318	IL-1ra	134,8	2286	17,0	10,5

Ejemplo 41: Farmacocinética de polipéptidos prolongados fusionados a GFP en macacos

La farmacocinética de GFP-L288, GFP-L576, GFP-XTEN_AF576, GFP-XTEN_Y576 y XTEN_AD836-GFP se ensayó en macacos para determinar el efecto de la composición y longitud de los polipéptidos no estructurados sobre los parámetros PK. Se analizaron muestras de sangre en diferentes momentos después de la inyección y la concentración de GFP en plasma se midió por ELISA usando un anticuerpo policlonal contra GFP para la captura y una preparación biotinilada del mismo anticuerpo policlonal para la detección. Los resultados se resumen en la FIG. 19. Muestran un aumento sorprendente en la semivida con la longitud creciente de la secuencia de XTEN. Por ejemplo, se determinó una semivida de 10 h para GFP-XTEN_L288 (con 288 residuos aminoacídicos en el XTEN). La duplicación de la longitud del compañero de fusión polipeptídico no estructurado a 576 aminoácidos aumentó la semivida a 20-22 h para múltiples construcciones de proteína de fusión; es decir, GFP-XTEN_L576, GFP-XTEN_AF576, GFP-XTEN_Y576. Un aumento adicional de la longitud del compañero de fusión polipeptídico no estructurado a 836 residuos produjo una semivida de 72-75 h para XTEN_AD836-GFP. Por tanto, aumentar la longitud del polímero en 288 residuos desde 288 a 576 residuos aumentaba la semivida *in vivo* en aproximadamente 10 h. Sin embargo, aumentar la longitud del polipéptido en 260 residuos desde 576 residuos a 836 residuos aumentaba la semivida en más de 50 h. Estos resultados muestran que hay un umbral sorprendente de longitudes del polipéptido no estructurado que provoca una ganancia mayor proporcional en la semivida *in vivo*. Por tanto, se espera que proteínas de fusión que comprenden polipéptidos no estructurados prolongados tengan la propiedad de farmacocinética potenciada en comparación con polipéptidos de longitudes más cortas.

Ejemplo 42: Estabilidad en suero de XTEN

Se incubó una proteína de fusión que contenía XTEN_AE864 fusionado al extremo N de GFP en plasma de mono y lisado de riñón de rata durante hasta 7 días a 37 °C. Se extrajeron muestras en tiempo 0, día 1 y día 7 y se analizaron por SDS PAGE seguida de detección usando análisis de Western y detección con anticuerpos contra GFP como se muestra en la FIG. 20. La secuencia de XTEN_AE864 mostraba signos insignificantes de degradación durante 7 días en plasma. Sin embargo, XTEN_AE864 se degradaba rápidamente en lisado de riñón de rata durante 3 días. La estabilidad *in vivo* de la proteína de fusión se ensayó en muestras de plasma en las que el GFP_AE864 inmunoprecipitaba y se analizó por SDS PAGE como se describe anteriormente. Las muestras que se extrajeron hasta 7 días después de la inyección mostraron muy pocos signos de degradación. Los resultados demuestran la resistencia de CFXTEN a la degradación debida a proteasas séricas; un factor en la potenciación de las propiedades farmacocinéticas de las proteínas de fusión de CFXTEN.

Ejemplo 43: Aumento de la solubilidad y la estabilidad de una carga peptídica por unión a XTEN

Para evaluar la capacidad de XTEN de potenciar las propiedades fisicoquímicas de solubilidad y estabilidad, se prepararon y evaluaron proteínas de fusión de glucagón más XTEN de longitud más corta. Estos artículos de ensayo se prepararon en disolución salina tamponada con Tris a pH neutro y la caracterización de la disolución de Gcg-XTEN fue por HPLC de fase inversa y cromatografía de exclusión por tamaño para afirmar que la proteína era homogénea y no se agregaba en disolución. Los datos se presentan en la tabla 36. Con fines comparativos, se midió el límite de solubilidad de glucagón sin modificar en el mismo tampón a 60 µM (0,2 mg/ml), y el resultado demuestra que para todas las longitudes de XTEN añadidas, se obtenía un aumento sustancial en la solubilidad. De forma importante, en la mayoría de los casos, las proteínas de fusión de glucagón-XTEN se prepararon para conseguir concentraciones diana y no se evaluaron para determinar los límites de solubilidad máxima para la construcción dada. Sin embargo, en el caso de glucagón unido al AF-144 XTEN, se determinó el límite de solubilidad, con el resultado de que se conseguía un aumento de 60 veces en la solubilidad, en comparación con glucagón no unido a XTEN. Además, se evaluó la CFXTEN de glucagón-AF144 para la estabilidad, y se descubrió que era estable en formulación líquida durante al menos 6 meses en condiciones refrigeradas y durante aproximadamente un mes a 37 °C (datos no mostrados).

Los datos respaldan la conclusión de que la unión de polipéptidos XTEN de longitud corta a una proteína biológicamente activa tal como glucagón puede potenciar notablemente las propiedades de solubilidad de la proteína mediante la proteína de fusión resultante, así como conferir estabilidad a las concentraciones de proteína más altas.

Tabla 36: Solubilidad de construcciones de glucagón-XTEN

Artículo de ensayo	Solubilidad
Glucagón	60 µM
Glucagón-Y36	> 370 µM
Glucagón-Y72	> 293 µM
Glucagón-AF108	> 145 µM
Glucagón-AF120	> 160 µM
Glucagón-Y144	> 497 µM
Glucagón-AE144	> 467 µM
Glucagón-AF144	> 3600 µM
Glucagón-Y288	> 163 µM

Ejemplo 44: Análisis de secuencias para la estructura secundaria mediante algoritmos de predicción

Las secuencias de aminoácidos pueden evaluarse para la estructura secundaria mediante determinados programas informáticos o algoritmos, tales como el algoritmo bien conocido de Chou-Fasman (Chou, P. Y., *et al*. (1974) *Biochemistry*, 13: 222-45) y el método de Garnier-Osguthorpe-Robson o "GOR" (Garnier J, Gibrat JF, Robson B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. Methods Enzymol 266:540-553). Para una secuencia dada, los algoritmos pueden predecir si existe alguna estructura secundaria o no en absoluto, expresada como total y/o porcentaje de residuos de la secuencia que forman, por ejemplo, hélices alfa o láminas beta o el porcentaje de residuos de la secuencia que se ha predicho que provocarán una formación de enrollamiento aleatorio.

Se han evaluado varias secuencias representativas de "familias" de XTEN usando dos herramientas de algoritmo para los métodos de Chou-Fasman y GOR para evaluar el grado de estructura secundaria en estas secuencias. La herramienta de Chou-Fasman se proporcionó por William R. Pearson y la Universidad de Virginia, en el sitio de internet "Biosupport", URL ubicada en internet en .fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc1 como existía el 19 de junio de 2009. La herramienta de GOR se proporcionó por Pole Informatique Lyonnais en el sitio de internet de Network Protein Sequence Analysis, URL ubicada en internet en .npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl como existía el 19 de junio de 2008.

Como primera etapa en los análisis, se analizó una sola secuencia de XTEN por los dos algoritmos. La composición AE864 es un XTEN con 864 residuos aminoacídicos creado a partir de múltiples copias de cuatro motivos de secuencia de 12 aminoácidos que consiste en los aminoácidos G, S, T, E, P y A. Los motivos de secuencia se caracterizan por el hecho de que hay repetitividad limitada dentro de los motivos y dentro de la secuencia global porque la secuencia de dos aminoácidos consecutivos cualesquiera no se repitan más de dos veces en un motivo de 12 aminoácidos cualquiera, y porque tres aminoácidos contiguos de la longitud completa del XTEN no son idénticos. Se analizaron partes sucesivamente más largas de la secuencia AF 864 desde el extremo N por los algoritmos de Chou-Fasman y GOR (el último requiere una longitud mínima de 17 aminoácidos). Las secuencias se analizaron introduciendo las secuencias en formato FASTA en las herramientas de predicción y ejecutando el análisis. Los resultados de los análisis se presentan en la tabla 37.

Los resultados indican que, mediante los cálculos de Chou-Fasman, los XTEN cortos de las familias AE y AG, de hasta al menos 288 residuos aminoacídicos, no tienen hélices alfa o láminas beta, pero las cantidades de porcentaje predicho de enrollamiento aleatorio por el algoritmo de GOR varían de un 78-99 %. Con longitudes crecientes de XTEN de 504 residuos a más de 1300, el XTEN analizado por el algoritmo de Chou-Fasman obtuvo porcentajes predichos de hélices alfa o láminas beta de un 0 a aproximadamente un 2 %, mientras que los porcentajes calculados de enrollamiento aleatorio aumentaron hasta un 94-99 %. Aquellos XTEN con hélices alfa o láminas beta fueron aquellas secuencias con uno o más casos de tres residuos de serina contiguos, que provocaron formación de lámina beta prevista. Sin embargo, incluso estas secuencias tenían todavía aproximadamente un 99 % de formación de enrollamiento aleatorio.

Los datos proporcionados en la presente memoria sugieren que 1) el XTEN creado a partir de múltiples motivos de secuencia de G, S, T, E, P y A que tienen repetitividad limitada en cuanto a aminoácidos contiguos se prevé que tengan cantidades muy bajas de hélices alfa y láminas beta; 2) que aumentar la longitud del XTEN no aumenta apreciablemente la probabilidad de formación de hélices alfa o láminas beta; y 3) que aumentar progresivamente la longitud de la secuencia de XTEN por adición de oligómeros no repetitivos de 12 monómeros que consisten en los aminoácidos G, S, T, E, P y A provoca un porcentaje aumentado de formación de enrollamiento aleatorio. Los resultados indican además que se espera que las secuencias de XTEN definidas en la presente memoria (incluyendo, por ejemplo, XTEN creados a partir de motivos de secuencia de G, S, T, E, P y A) que tienen repetitividad limitada (incluyendo aquellos con no más de dos aminoácidos contiguos idénticos en un motivo cualquiera) tengan estructura secundaria muy limitada. Cualquier orden o combinación de motivos de secuencia de la tabla 3 puede usarse para crear un polipéptido XTEN que producirá una secuencia de XTEN que estará sustancialmente desprovista de estructura secundaria, aunque no se prefieren tres serinas contiguas. La propiedad desfavorable de tres serinas contiguas, sin embargo, puede mejorarse aumentando la longitud del XTEN. Se espera que dichas secuencias tengan las características descritas en las realizaciones de CFXTEN de la enseñanza divulgadas en la presente memoria.

Tabla 37: Cálculos de predicción de CHOU-FASMAN y GOR de secuencias polipeptídicas

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO:	N.º de residuos	Cálculo de Chou-Fasman	Cálculo de GOR
AE36: LCW0402_002	1489	36	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	94,44%
AE36: LCW0402_003	1490	36	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	94,44%
AG36: LCW0404_001	1491	36	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	77,78%
AG36: LCW0404_003	1492	36	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	83,33 %
AE42_1	1493	42	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	90,48%
AE42_1	1494	42	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	90,48%
AG42_1	1495	42	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	88,10%
AG42_2	1496	42	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	88,10%
AE144	1497	144	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	98,61%
AG144_1	1498	144	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	91,67%
AE288	1499	288	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	99,31%
AG288_2	1500	288	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	92,71
AF504	1501	504	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	94,44%
AD 576	1502	576	Residuos totales: H: 7 E: 0 porcentaje: H: 1,2 E: 0,0	99,65%
AE576	1503	576	Residuos totales: H: 2 E: 0 porcentaje: H: 0,4 E: 0,0	99,65%
AG576	1504	576	Residuos totales: H: 0 E: 3 porcentaje: H: 0,4 E: 0,5	99,31%
AF540	1505	540	Residuos totales: H: 2 E: 0 porcentaje: H: 0,4 E: 0,0	99,65

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO:	N.º de residuos	Cálculo de Chou-Fasman	Cálculo de GOR
AD836	1506	836	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	98,44%
AE864	1507	864	Residuos totales: H: 2 E: 3 porcentaje: H: 0,2 E: 0,4	99,77%
AF864	1508	875	Residuos totales: H: 2 E: 0 porcentaje: H: 0,2 E: 0,0	95,20%
AG864	1509	864	Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0,0 E: 0,0	94,91%
AM875	1510	875	Residuos totales: H: 7 E: 3 porcentaje: H: 0,8 E: 0,3	98,63%
AM1318	1511	1318	Residuos totales: H: 7 E: 0 porcentaje: H: 0,7 E: 0,0	99,17%
AM923	1512	924	Residuos totales: H: 4 E: 3 porcentaje: H: 0,4 E: 0,3	98,70%
AE912	1513	913	Residuos totales: H: 8 E: 3 porcentaje: H: 0,9 E: 0,3	99,45%
BC 864	1514		Residuos totales: H: 0 E: 0 porcentaje: H: 0 E: 0	99,77%
H: hélice alfa E: lámina beta				

Ejemplo 45: Análisis de secuencias polipeptídicas para la repetitividad

En este ejemplo, se evaluaron diferentes polipéptidos, incluyendo varias secuencias de XTEN, para la repetitividad en la secuencia de aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos polipeptídicas pueden evaluarse para la repetitividad cuantificando el número de veces que aparece una subsecuencia más corta dentro del polipéptido global. Por ejemplo, un polipéptido de 200 residuos aminoacídicos de longitud tiene un total de 165 "bloques" de 36 aminoácidos solapantes (u "oligómeros de 36 monómeros") y 198 "subsecuencias" de 3 monómeros, pero el número de subsecuencias de 3 monómeros únicas dependerá de la cantidad de repetitividad dentro de la secuencia. Para los análisis, se evaluaron diferentes secuencias polipeptídicas para la repetitividad determinando la puntuación de subsecuencia obtenida por la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\text{Puntuación de subsecuencia} = \frac{\sum_{i=1}^{m} Recuento_i}{m} \qquad \text{I}$$

en la que: m = (longitud de aminoácidos del polipéptido) - (longitud de aminoácidos de la subsecuencia) + 1; y $recuento_i$ = número acumulado de apariciones de cada subsecuencia única dentro la $secuencia_i$

En los análisis del presente ejemplo, la puntuación de subsecuencia para los polipéptidos de la tabla 38 se determinaron usando la ecuación anterior en un programa informático usando el algoritmo representado en la FIG. 27, en el que la longitud de subsecuencia se estableció en 3 aminoácidos. La puntuación de subsecuencia resultante es un reflejo del grado de repetitividad dentro del polipéptido.

Los resultados, mostrados en la tabla 38, indican que los polipéptidos no estructurados que consisten en 2 o 3 tipos de aminoácidos tienen altas puntuaciones de subsecuencia, mientras que aquellos que consisten en los motivos de 12 aminoácidos de los seis aminoácidos G, S, T, E, P y A con un bajo grado de repetitividad interna, tienen puntuaciones de subsecuencia de menos de 10 y, en algunos casos, menos de 5. Por ejemplo, la secuencia L288 tiene dos tipos de aminoácidos y tiene secuencias muy repetitivas cortas, produciendo una puntuación de subsecuencia de 50,0. El polipéptido J288 tiene tres tipos de aminoácidos, pero también tiene secuencias repetitivas cortas, produciendo una puntuación de subsecuencia de 33,3. Y576 también tiene tres tipos de aminoácidos, pero no está hecho de repeticiones internas, reflejado en la puntuación de subsecuencia de 15,7 sobre los 200 primeros aminoácidos. W576 consiste en cuatro tipos de aminoácidos, pero tiene un grado mayor de repetitividad interna, por ejemplo, "GGSG" (SEQ ID NO: 1694), provocando una puntuación de subsecuencia de 23,4. El AD576 consiste en cuatro tipos de motivos de 12 aminoácidos, que cosiste cada uno en cuatro tipos de aminoácidos. A causa del bajo grado de repetitividad interna de los motivos individuales, la puntuación de subsecuencia global sobre los 200 primeros aminoácidos es 13,6. Por el contrario, los XTEN que consisten en cuatro motivos contienen seis tipos de aminoácidos, cada uno con un bajo grado de repetitividad interna tienen puntuaciones de subsecuencia inferiores; es decir, AE864 (6,1), AF864 (7,5) y AM875 (4,5), mientras que XTEN que consisten en cuatro motivos que contienen cinco tipos de aminoácidos fueron intermedios; es decir, AE864, con una puntuación de 7,2.

Conclusiones: Los resultados indican que la combinación de motivos de subsecuencia de 12 aminoácidos, consistiendo cada uno en cuatro a seis tipos de aminoácidos que no son no repetitivos, en un polipéptido XTEN más

largo produce una secuencia global que es sustancialmente no repetitiva, como se indica por las puntuaciones de subsecuencia global de menos de 10 y, en muchos casos, menos de 5. Esto es a pesar del hecho de que cada motivo de subsecuencia puede usarse múltiples veces en la secuencia. Por el contrario, polímeros creados a partir de números más pequeños de tipos de aminoácidos produjeron puntuaciones de subsecuencia mayores, consistiendo los polipéptidos en dos tipos de aminoácidos que tienen puntuaciones mayores que los que consisten en tres tipos de aminoácidos.

Tabla 38: Cálculos de puntuación de subsecuencia de secuencias polipeptídicas

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO:	Puntuación
J288	1515	33,3
K288	1516	46,9
L288	1517	50,0
Y288	1518	26,8
Q576	1519	18,5
U576	1520	18,1
W576	1521	23,4
Y576	1522	15,7
AE288	1523	6,0
AG288_1	1524	6,9
AD576	1525	13,6
AE576	1526	6,1
AF540	1527	8,8
AF504	1528	7,0
AE864	1529	6,1
AF864	1530	7,5
AG864	1531	7,2
AG868	1532	7,5
AM875	1533	4,5
AE912	1534	4,5
AM923	1535	4,5
AM1296	1536	4,5

Ejemplo 46: Cálculo de puntuaciones de TEPITOPE

Las puntuaciones de TEPITOPE de secuencias peptídicas de 9 monómeros pueden calcularse añadiendo potenciales de bolsillo como se describe por Sturniolo [Sturniolo, T., *et al.* (1999) Nat Biotechnol, 17: 555]. En el presente ejemplo, se calcularon puntuaciones de Tepitope separadas para alelos HLA individuales. La tabla 39 muestra como ejemplo los potenciales de bolsillo para HLA0101B, que existe en alta frecuencia en la población caucásica. Para calcular la puntuación de TEPITOPE de un péptido con la secuencia P1-P2-P3-P4-P5-P6-P7-P8-P9, se añadieron los correspondientes potenciales de bolsillo individuales de la tabla 39. La puntuación de HLA0101B de un péptido de 9 monómeros con la secuencia FDKLPRTSG (SEQ ID NO: 1695) es la suma de 0, -1,3, 0, 0,9, 0, -1,8, 0,09, 0, 0.

Para evaluar las puntuaciones de TEPITOPE para péptidos largos, se puede repetir el proceso para todas las subsecuencias de 9 monómeros de las secuencias. Este proceso puede repetirse para las proteínas codificadas por otros alelos HLA. Las tablas 40-43 dan potenciales de bolsillo para los productos proteínicos de alelos HLA que existen en alta frecuencia en la población caucásica.

Las puntuaciones de TEPITOPE calculadas por este método varían de aproximadamente -10 a +10. Sin embargo, péptidos de 9 monómeros que carecen de un aminoácido hidrófobo (FKLMVWY (SEQ ID NO: 1696)) en la posición P1 tienen puntuaciones de TEPITOPE calculadas en el intervalo de -1009 a -989. Este valor es biológicamente significativo y refleja el hecho de que un aminoácido hidrófobo sirve como residuo de anclaje para la unión de HLA y péptidos que carecen de un residuo hidrófobo en P1 se consideran sin unión a HLA. Como la mayoría de secuencias de XTEN carecen de residuos hidrófobos, todas las combinaciones de subsecuencias de 9 monómeros tendrán puntuaciones de TEPITOPE en el intervalo de -1009 a -989. Este método confirma que los polipéptidos XTEN puede tener pocos o ningún epítopo de linfocitos T previsto.

Tabla 39: Potencial de bolsillo para el alelo HLA0101B.

Aminoácido	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	-2,4	-	-2,7	-2	-	-1,9
E	-999	0,1	-1,2	-0,4	-	-2,4	-0,6	-	-1,9
F	0	0,8	0,8	0,08	-	-2,1	0,3	-	-0,4
G	-999	0,5	0,2	-0,7	-	-0,3	-1,1	-	-0,8
H	-999	0,8	0,2	-0,7	-	-2,2	0,1	-	-1,1
I	-1	1,1	1,5	0,5	-	-1,9	0,6	-	0,7
K	-999	1,1	0	-2,1	-	-2	-0,2	-	-1,7
L	-1	1	1	0,9	-	-2	0,3	-	0,5
M	-1	1,1	1,4	0,8	-	-1,8	0,09	-	0,08
N	-999	0,8	0,5	0,04	-	-1,1	0,1	-	-1,2
P	-999	-0,5	0,3	-1,9	-	-0,2	0,07	-	-1,1
C	-999	1,2	0	0,1	-	-1,8	0,2	-	-1,6
R	-999	2,2	0,7	-2,1	-	-1,8	0,09	-	-1
S	-999	-0,3	0,2	-0,7	-	-0,6	-0,2	-	-0,3
T	-999	0	0	-1	-	-1,2	0,09	-	-0,2
V	-1	2,1	0,5	-0,1	-	-1,1	0,7	-	0,3
W	0	-0,1	0	-1,8	-	-2,4	-0,1	-	-1,4
Y	0	0,9	0,8	-1,1	-	-2	0,5	-	-0,9

Tabla 40: Potencial de bolsillo para el alelo HLA0301B.

Aminoácido	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	2,3	-	-2,4	-0,6	-	-0,6
E	-999	0,1	-1,2	-1	-	-1,4	-0,2	-	-0,3
F	-1	0,8	0,8	-1	-	-1,4	0,5	-	0,9
G	-999	0,5	0,2	0,5	-	-0,7	0,1	-	0,4
H	-999	0,8	0,2	0	-	-0,1	-0,8	-	-0,5
I	0	1,1	1,5	0,5	-	0,7	0,4	-	0,6
K	-999	1,1	0	-1	-	1,3	-0,9	-	-0,2
L	0	1	1	0	-	0,2	0,2	-	-0
M	0	1,1	1,4	0	-	-0,9	1,1	-	1,1
N	-999	0,8	0,5	0,2	-	-0,6	-0,1	-	-0,6
P	-999	-0,5	0,3	-1	-	0,5	0,7	-	-0,3
C	-999	1,2	0	0	-	-0,3	-0,1	-	-0,2
R	-999	2,2	0,7	-1	-	1	-0,9	-	0,5
S	-999	-0,3	0,2	0,7	-	-0,1	0,07	-	1,1
T	-999	0	0	-1	-	0,8	-0,1	-	-0,5
V	0	2,1	0,5	0	-	1,2	0,2	-	0,3
W	-1	-0,1	0	-1	-	-1,4	-0,6	-	-1
Y	-1	0,9	0,8	-1	-	-1,4	-0,1	-	0,3

Tabla 41: Potencial de bolsillo para el alelo HLA0401B.

Aminoácido	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	1,4	-	-1,1	-0,3	-	-1,7
E	-999	0,1	-1,2	1,5	-	-2,4	0,2	-	-1,7
F	0	0,8	0,8	-0,9	-	-1,1	-1	-	-1
G	-999	0,5	0,2	-1,6	-	-1,5	-1,3	-	-1
H	-999	0,8	0,2	1,1	-	-1,4	0	-	0,08
I	-1	1,1	1,5	0,8	-	-0,1	0,08	-	-0,3
K	-999	1,1	0	-1,7	-	-2,4	-0,3	-	-0,3
L	-1	1	1	0,8	-	-1,1	0,7	-	-1
M	-1	1,1	1,4	0,9	-	-1,1	0,8	-	-0,4
N	-999	0,8	0,5	0,9	-	1,3	0,6	-	-1,4
P	-999	-0,5	0,3	-1,6	-	0	-0,7	-	-1,3

Aminoácido	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
C	-999	1,2	0	0,8	-	-1,5	0	-	0,5
R	-999	2,2	0,7	-1,9	-	-2,4	-1,2	-	-1
S	-999	-0,3	0,2	0,8	-	1	-0,2	-	0,7
T	-999	0	0	0,7	-	1,9	-0,1	-	-1,2
V	-1	2,1	0,5	-0,9	-	0,9	0,08	-	-0,7
W	0	-0,1	0	-1,2	-	-1	-1,4	-	-1
Y	0	0,9	0,8	-1,6	-	-1,5	-1,2	-	-1

Tabla 42: Potencial de bolsillo para el alelo HLA0701B.

Aminoácido	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	-1,6	-	-2,5	-1,3	-	-1,2
E	-999	0,1	-1,2	-1,4	-	-2,5	0,9	-	-0,3
F	0	0,8	0,8	0,2	-	-0,8	2,1	-	2,1
G	-999	0,5	0,2	-1,1	-	-0,6	0	-	-0,6
H	-999	0,8	0,2	0,1	-	-0,8	0,9	-	-0,2
I	-1	1,1	1,5	1,1	-	-0,5	2,4	-	3,4
K	-999	1,1	0	-1,3	-	-1,1	0,5	-	-1,1
L	-1	1	1	-0,8	-	-0,9	2,2	-	3,4
M	-1	1,1	1,4	-0,4	-	-0,8	1,8	-	2
N	-999	0,8	0,5	-1,1	-	-0,6	1,4	-	-0,5
P	-999	-0,5	0,3	-1,2	-	-0,5	-0,2	-	-0,6
C	-999	1,2	0	-1,5	-	-1,1	1,1	-	-0,9
R	-999	2,2	0,7	-1,1	-	-1,1	0,7	-	-0,8
S	-999	-0,3	0,2	1,5	-	0,6	0,4	-	-0,3
T	-999	0	0	1,4	-	-0,1	0,9	-	0,4
V	-1	2,1	0,5	0,9	-	0,1	1,6	-	2
W	0	-0,1	0	-1,1	-	-0,9	1,4	-	0,8
Y	0	0,9	0,8	-0,9	-	-1	1,7	-	1,1

Tabla 43: Potencial de bolsillo para el alelo HLA1501B.

Aminoácido	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	-0,4	-	-0,4	-0,7	-	-1,9
E	-999	0,1	-1,2	-0,6	-	-1	-0,7	-	-1,9
F	-1	0,8	0,8	2,4	-	-0,3	1,4	-	-0,4
G	-999	0,5	0,2	0	-	0,5	0	-	-0,8
H	-999	0,8	0,2	1,1	-	-0,5	0,6	-	-1,1
I	0	1,1	1,5	0,6	-	0,05	1,5	-	0,7
K	-999	1,1	0	-0,7	-	-0,3	-0,3	-	-1,7
L	0	1	1	0,5	-	0,2	1,9	-	0,5
M	0	1,1	1,4	1	-	0,1	1,7	-	0,08
N	-999	0,8	0,5	-0,2	-	0,7	0,7	-	-1,2
P	-999	-0,5	0,3	-0,3	-	-0,2	0,3	-	-1,1
C	-999	1,2	0	-0,8	-	-0,8	-0,3	-	-1,6
R	-999	2,2	0,7	0,2	-	1	-0,5	-	-1
S	-999	-0,3	0,2	-0,3	-	0,6	0,3	-	-0,3
T	-999	0	0	-0,3	-	-0	0,2	-	-0,2
V	0	2,1	0,5	0,2	-	-0,3	0,3	-	0,3
W	-1	-0,1	0	0,4	-	-0,4	0,6	-	-1,4
Y	-1	0,9	0,8	2,5	-	0,4	0,7	-	-0,9

Ejemplo 46: Evaluación de la inserción de XTEN en bucles permisivos.

Inserción de XTEN AE42-4

La construcción y expresión de FVIII con inserciones de XTEN AE42 se describieron en el ejemplo 17 y 24. Por tanto, cuando el residuo X indica el sitio de inserción y el residuo Z indica el siguiente residuo en la secuencia polipeptídica de FVIII nativo, el polipéptido resultante de la inserción de XTEN AE42 contendría la secuencia:

X-GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS-Z (SEQ ID NO: 1697)

Se seleccionaron 16 sitios diferentes en la secuencia de FVIII para la inserción de XTEN AE42, y estos se denominaron lote 1. Unos 21 sitios adicionales seleccionados para la inserción de XTEN AE42 se denominaron lote 2. Colectivamente, los sitios del lote 1 y el lote 2 representan 12 sitios en el dominio A1, 7 sitios en el dominio A2, 10 sitios en el dominio A3, 4 sitios en el dominio C1 y 3 sitios en el dominio C2. Las ubicaciones de los sitios del lote 1 y 2 en la estructura 3-D de FVIII se representan en la FIG. 32.

La ubicación de estos sitios de inserción del lote 1 y el lote 2 produce 37 construcciones denominadas pSD0001-pSD0004, pSD0009- pSD0012, pSD0023- pSD0032, pSD0034- pSD0063 [los intervalos anteriores incluyen todos los números intermedios también], cuyas secuencias se exponen en la tabla 21 y cuyos sitios de inserción se exponen en la tabla 23.

Ensayos *in vitro*

Para evaluar la tolerabilidad de FVIII a la inserción de XTEN AE42-4, la actividad de FVIII en muestras de medio de cultivo de cultivos celulares de FVIII-XTEN se analizó usando un ensayo cromogénico de FVIII. Los niveles de expresión de antígeno se analizaron por ELISA de FVIII-HC (cadena pesada de FVIII) y FVIII-LC (cadena ligera de FVIII).

Medición de actividad de FVIII por ensayo cromogénico

La actividad de FVIII se midió usando el kit de FVIII COATEST® SP de DiaPharma (lote n.º N089019) y todas las incubaciones se realizaron en un calientaplacas a 37 °C con agitación. Las recolecciones de cultivo celular de medios de transfección transitoria de las variantes de FVIII-XTEN AE42-4 de placas se 6 pocillos se diluyeron al intervalo de actividad de FVIII deseado usando tampón COATEST® de FVIII 1x. Se prepararon patrones de FVIII en tampón COATEST® de FVIII 1x que contenía medio de transfección simulado con concentración de medio de cultivo coincidente como muestra de ensayo. El intervalo de patrón de factor VIII recombinante (rFVIII) fue de 100 mUI/ml a 0,78 mUI/ml. Los patrones, muestras de cultivo celular diluidas y un control de ensayo de plasma humano normal combinado se añadieron a placas de 96 pocillos Immulon® 2HB por duplicado (25 µl/pocillo).

Se añadió mezcla recién preparada de IXa/FX/fosfolípido (50 µl), 25 µl de CaCl2 25 mM y 50 µl de sustrato de FXa secuencialmente en cada pocillo, con incubación de 5 minutos entre cada adición. Después de incubar con el sustrato, se añadieron 25 µl de ácido acético al 20 % para terminar la reacción de color, y se midió la absorbancia a 405 nm con un instrumento SpectraMAX® plus (Molecular Devices).

El análisis de los datos se realizó usando el programa informático SoftMax Pro (versión 5.2). El nivel mínimo de cuantificación (LLOQ) fue 39 mUI/ml. Los resultados se presentan en la tabla 22.

Medición de la expresión por ELISA de FVIII-HC y FVIII-LC

La expresión de variantes se cuantificó usando ELISA. Los niveles de expresión de antígeno de FVIII de construcciones de ADN correspondientes a inserciones de XTEN en los dominios A1 y A2 de FVIII se analizaron por ELISA de FVIII-LC. Los niveles de expresión de antígeno de FVIII de construcciones de ADN correspondientes a inserciones de XTEN en los dominios A3, C1 y C2 de FVIII se analizaron por ELISA de FVIII-HC. Los resultados se presentan en la tabla 22.

Los antígenos de FVIII-XTEN en medio de cultivo celular después de la recolección se capturaron por anticuerpos GMA011 (Green Mountain Antibodies) para ELISA de FVIII-LC) o por anticuerpos GMA016 (Green Mountain Antibodies) para ELISA de FVIII-HC. Se recubrieron placas de 96 pocillos Immulon® 2HB con 100 µl/pocillos de anticuerpo anti-FVIII (2 µg/ml) por incubación durante una noche a 4 °C. Las placas entonces se lavaron cuatro veces con disolución salina tamponada con fosfato con Tween-20 (PBST) y se bloquearon con tampón de bloqueo (PBST con suero de caballo inactivado por calor al 10 %) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las recolecciones de cultivo celular de medios de transfección transitoria de variantes de FVIII-XTEN de una placa de 6 pocillos se diluyeron al intervalo de antígeno de FVIII deseado usando tampón de bloqueo 1x. Se prepararon patrones de FVIII en tampón de bloqueo de FVIII 1x que contenía medio de transfección simulado con concentración de medio coincidente como muestras de ensayo. El intervalo del patrón de rFVIII fue de 50 ng/ml a 0,39 ng/ml.

Los patrones, muestras de cultivo celular diluidas y un control de ensayo de plasma humano normal combinado se añadieron a placas de 96 pocillos Immulon® 2HB por duplicado (100 µl/pocillo) y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Después de lavar cuatro veces con PBST, se añadieron 100 µl de HRP-anticuerpo de oveja anti-hFVIII (Affinity Biologicals, F8C-EIC-D) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después de otros cuatro lavados con PBST, se añadieron 100 µl de sustrato TMB Super Sensitive (BioFX) a cada pocillo, seguido de 5-10 min

de desarrollo de color. Para terminar la reacción de color, se añadieron 50 µl de H2SO4 a cada pocillo, y se midió la absorbancia a 450 nm con un instrumento SpectraMAX plus (Molecular Devices).

El análisis de los datos se realizó usando el programa informático SoftMax Pro (versión 5.4). El nivel mínimo de cuantificación (LLOQ) fue 0,0039 µg/ml. Los resultados se presentan en la tabla 22.

Se agruparon sitios permisivos en que se insertaron secuencias de XTEN sin eliminar la actividad procoagulante de la proteína recombinante, o la capacidad de las proteínas recombinantes de expresarse en la célula hospedadora dentro de bucles en cada uno de los tres dominios A de FVIII. La FIG. 36 muestra la ubicación de sitios de inserción en las proteínas de FVIII recombinante que mostraban actividad de FVIII en los dominios A1, A2 y A3. La FIG. 33 muestra una representación estructural que representa la ubicación de sitios de inserción en las proteínas de FVIII recombinante que mostraban actividad de FVIII.

Los sitios permisivos se agruparon en bucles superficiales altamente flexibles expuestos al disolvente (bucles permisivos de XTEN). Los bucles del dominio A1 estaban ubicados en una región correspondiente a aproximadamente las posiciones de los aminoácidos 15 a 45, y 201 a 232, respectivamente, en la secuencia de FVIII humano maduro (FIG. 30). Los bucles del dominio A2 estaban ubicados en una región correspondiente a aproximadamente las posiciones de los aminoácidos 395 a 421, y 577 a 635, respectivamente, en la secuencia de FVIII humano maduro (FIG. 30). Los bucles del dominio A3 estaban ubicados en una región correspondiente a aproximadamente las posiciones de los aminoácidos 1705 a 1732, y 1884 a 1917, respectivamente, en la secuencia de FVIII humano maduro (FIG. 30). Las FIG. 37A and 37B muestran la ubicación de los bucles permisivos de XTEN con respecto a elementos de estructura secundaria en la estructura tridimensional de FVIII.

Ejemplo 47: CFXTEN con inserciones de XTEN que tiene 144 aminoácidos

El análisis de los datos preliminares presentados anteriormente (ejemplo 46) sugirió la existencia de regiones definidas dentro de las secuencias polipeptídicas lineales y las estructuras 3-D de los dominios A de FVIII que pueden acomodar la inserción de secuencias de XTEN. Para ensayar esta hipótesis y definir además los límites de regiones putativas que puedan acomodar la inserción de secuencias de XTEN sin pérdida de actividad de FVIII, se eligieron 23 sitios de inserción adicionales no presentes en el lote 1 o 2 y se denominaron lote 3.

Las construcciones del lote 3 se generaron mediante la inserción de un polipéptido XTEN AE de 144 residuos, que comprende los residuos aminoacídicos Gly (G), Ala (A), Pro (P), Ser (S), Thr (T) y Glu (E), o un polipéptido XTEN AG de 144 residuos, que comprende los residuos aminoacídicos Gly (G), Ala (A), Pro (P), Ser (S) y Thr (T). Se generaron cinco versiones diferentes del polipéptido AE de 144 residuos y se denominaron XTEN-AE144-2A, XTEN-AE144-3B, XTEN-AE144-4A, XTEN-AE144-5A, XTEN-AE144-6B. Las secuencias de aminoácidos son como se exponen en la tabla 4. Se generaron cinco versiones diferentes del polipéptido de 144 residuos y se denominaron XTEN-AG144-1, XTEN-AG144-A, XTEN-AG144-B, XTEN-AG144-C y XTEN-AG144-F. Las secuencias de aminoácidos son como se exponen en la tabla 4.

La secuencia de ADN que codifica el XTEN de 144 residuos se introdujo mediante síntesis química de segmentos de ADN (DNA 2.0, Redwood City, CA) que abarcan los sitios de restricción únicos más cercanos dentro del vector fundamental en cada lado del sitio de inserción.

Las secuencias de ADN correspondientes a los péptidos de XTEN 144 se insertaron de modo que la construcción de ADN resultante codificara una proteína de FVIII en que la secuencia proteínica de XTEN 144 se inserte inmediatamente después del residuo indicado en la selección de sitio, y flanqueado por sitios *Asc*I y *Xho*I.

Además de estos sitios, los sitios del lote 1 y 2 en que la inserción del polipéptido XTEN AE42 no anulaba la actividad procoagulante de FVIII se modificaron por escisión del segmento de ADN que codifica el polipéptido AE42 con las enzimas de restricción *Asc*I y *Xho*I, y la introducción de secuencias codificantes de XTEN AE144 y XTEN AG144 en los mismos sitios. La ubicación de estos sitios de inserción del lote 1, lote 2 y lote se resumen en la tabla III. La FIG. 34 presenta una representación estructural de FVIII que muestra la ubicación de los sitios de inserción de XTEN 144.

Se creó un total de 48 construcciones con insertos de 144 XTEN. Las construcciones son pSD0001-pSD0004, pSD0009-pSD0012, pSD0023-63 [los intervalos anteriores incluyen todos los números intermedios también], cuyas secuencias se exponen en la tabla 21 y cuyos sitios de inserción se detallan en la tabla 22.

Expresión de variantes de FVIII-XTEN 144

Las variantes de FVIII con inserciones de XTEN 144 se transfectaron en células HEK293F (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando polietileneimina (PEI, Polysciences Inc. Warrington, PA) o reactivo de transfección Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células transfectadas de forma transitoria se cultivaron en medio 293 Free Style o una mezcla de medio 293 Free Style y CD Opti CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA). El medio de cultivo celular se recogió 3-5 días

después de la transfección y se analizó para la expresión de FVIII por ensayo cromogénico de actividad de FVIII y ELISA de FVIII realizados como se describe en la presente memoria.

Los medios de cultivo celular de transfección transitoria se concentraron 10 veces en columnas de centrifugación Centricon® (punto de corte de 100 kDa). El material concentrado entonces se congeló rápidamente y se almacenó a -80 °C para futuro análisis *in vitro* y estudios PK *in vivo*.

Ensayos *in vitro*

Para evaluar la tolerabilidad de FVIII a inserciones, la actividad de FVIII en muestras de medio de cultivo de cultivos celulares se analizó usando un ensayo cromogénico de FVIII. Los niveles de expresión de antígeno se analizaron por ELISA de FVIII-HC (cadena pesada de FVIII) y FVIII-LC (cadena ligera de FVIII).

Medición de actividad de FVIII por ensayo cromogénico y medición de la expresión por ELISA de FVIII-HC y FVIII-LC

Se realizaron métodos de ensayo cromogénico y de ELISA como se describe. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 23.

Se agruparon sitios permisivos en que se insertaron secuencias de XTEN sin eliminar la actividad procoagulante de la proteína recombinante, o la capacidad de las proteínas recombinantes de expresarse en la célula hospedadora dentro de bucles en cada uno de los tres dominios A de FVIII. Se descubrió que las mistas regiones de bucles permisivos de XTEN que toleraban las secuencias de XTEN más cortas insertadas toleraban la inserción de las secuencias de XTEN más largas. La FIG. 38 muestra la ubicación de sitios de inserción de XTEN 144 en las proteínas de FVIII recombinante que mostraban actividad de FVIII en los dominios A1, A2 y A3. La FIG. 35 muestra una representación estructural que representa la ubicación de sitios de inserción en las proteínas de FVIII recombinante que mostraban actividad de FVIII.

Estas observaciones indican que dos regiones dentro de cada uno de los dominios A de FVIII podían acomodar la inserción de secuencias de XTEN sin pérdida de actividad de cofactor FVIII. Una representación estructural de estos llamados bucles permisivos de XTEN (FIG. 40 y 41) demuestra que ocupan posiciones estructuralmente análogas en cada uno de los dominios A y se proyectan desde una cara de la molécula de FVIII. Los bucles permisivos de XTEN identificados corresponden a bucles muy flexibles ubicados entre hebras beta en las estructuras tridimensionales de los dominios A1, A2 y A3, como se muestra en las FIG. 37A y 37B.

La evaluación *in vivo* de inserciones de XTEN 144 sobre la prolongación de la semivida de FVIII, determinada por farmacocinética, se describe en el ejemplo 32.

Ejemplo 48: Rescate o potenciación de la expresión de FVIII por inserción de una secuencia de XTEN dentro de la región peptídica ácida a3 de FVIII.

Se transfectaron células HEK293 adherentes (como se describe en el ejemplo 24) con construcciones de ADN de FVIII-XTEN en que la secuencia codificante de un factor VIII con el dominio B eliminado contenía de 2 a 4 inserciones de XTEN de 144 residuos aminoacídicos cada una, de composición y ubicación de inserción como se indica en la tabla 44, a continuación. A los 5 días después de la transfección, los sobrenadantes de cultivo celular se ensayaron para la actividad de FVIII mediante el ensayo cromogénico (como se describe en el ejemplo 25). Los resultados se muestran en la tabla 44.

Tabla 44. Niveles de expresión de actividad de FVIII para variantes de CFXTEN que contienen un XTEN en la posición 1720 y uno, dos o tres inserciones de XTEN adicionales.

Nombre de la construcción	Dominio, posición y tipo de inserción de XTEN					Actividad (mUI/ml)
	A1	A2	a3	A3-1	A3-2	
LSD0040,002	26 AG144			1720 AG144		175
LSD0041,008		403 AE144		1720 AG144		279
LSD0045,002			1656 AG144	1720 AG144		2598
PSD080,002	26 AG144		1656 AG144	1720 AG144		1081
PSD083,001		403 AE144	1656 AG144	1720 AG144		789
PSD082,001	26 AG144			1720 AG144	1900 AE144	<LLOQ

Nombre de la construcción	Dominio, posición y tipo de inserción de XTEN					Actividad (mUI/ml)
	A1	A2	a3	A3-1	A3-2	
PSD090,003	26 AG144		1656 AG144	1720 AG144	1900 AE144	316

Con fines de comparación, todas las construcciones de FVIII-XTEN tenían una inserción de AG144 XTEN en la posición del aminoácido 1720 (numerado con respecto al factor VIII de longitud completa) dentro del dominio A3. Los niveles de expresión de variantes de FVIII-XTEN se determinaron por ensayo cromogénico y se expresaron en unidades de mUI/ml. Las construcciones con una sola inserción de XTEN adicional en la posición 26 en el dominio A1 (LSD0040.002) o la posición 403 en el dominio A2 (LSD0041.008) produjeron niveles de expresión de 175 y 279 mUI/ml, respectivamente. Por el contrario, una construcción con una sola inserción de XTEN adicional en la posición 1656 dentro del péptido ácido a3 produjo un nivel de expresión de 2598 mUI/ml, que demuestra potenciación del nivel de expresión para la construcción de inserción de XTEN en a3 con respecto a las construcciones de inserción en A1 y A2. Además, en comparación con la construcción de FVIII-XTEN con inserciones de XTEN en la posición 26 en el dominio A1 y 1720 en el dominio A3 (LSD0040.002), la construcción con una inserción de XTEN adicional en la posición 1656 dentro de la región peptídica ácida a3 (PSD080.002) produjo expresión significativamente mayor (175 y 1081 mUI/ml, respectivamente). Coherente con estos hallazgos, la construcción con inserciones de XTEN en la posición 403 en el dominio A2 y 1720 en el dominio A3 (LSD0041.008) produjo un nivel de expresión de 279 mUI/ml, mientras que una inserción de XTEN adicional en la posición 1656 dentro de la región peptídica ácida a3 (PSD083.001) produjo un aumento en el nivel de expresión hasta 789 mUI/ml. Finalmente, la construcción de FVIII-XTEN con una inserción de XTEN en la posición 26 dentro del dominio A1 y dos inserciones de XTEN en las posiciones 1720 y 1900 dentro del dominio A3 (PSD082.001) no produjeron actividad por encima del límite inferior de cuantificación. Sin embargo, la construcción de FVIII-XTEN con una inserción de XTEN adicional dentro de la región peptídica ácida a3 (PSD090.003) produjo actividad detectable, lo que demuestra que la inclusión de una secuencia de XTEN dentro del dominio a3 puede provocar recuperación de la expresión (medida por la actividad) en construcciones de FVIII-XTEN que de lo contrario se expresan a niveles por debajo del límite inferior de cuantificación. En las condiciones del experimento, los resultados respaldan la conclusión de que la inserción de XTEN en la posición 1656 y, por extensión, dentro de la región a3, provoca expresión potenciada de composiciones de FVIII-XTEN procoagulantes.

Ejemplo 49: Efecto de la inserción de XTEN sobre la actividad de FVIII medida por aPTT

Se empleó un ensayo de coagulación de una fase de protrombina parcial activada (aPTT) además del ensayo cromogénico (como se describe en el ejemplo 25) para determinar la actividad de FVIII de diversas proteínas de fusión de FVIII-XTEN.

Método: La actividad aPTT de FVIII-XTEN se midió usando el instrumento Sysmex CA-1500 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY). Para crear una curva patrón para el ensayo, se diluyó el patrón de factor VIII de la OMS con medio de transfección simulada al 2 % hasta 100 mU/ml y entonces se realizó una serie de dilución en serie de factor dos, siendo el último patrón de 0,78 mU/ml. Las muestras de cultivo celular de FVIII-XTEN en primer lugar se diluyeron a 1:50 con tampón de ensayo de aPTT, se hicieron diluciones adicionales con medio de transfección simulada al 2 % cuando fue necesario.

Después de la dilución, se realizó el ensayo de aPTT usando el instrumento Sysmex de la siguiente manera: se mezclaron 50 µl de patrones diluidos y muestras con 50 µl de plasma deficiente de FVIII humano y después 50 µl de reactivo de aPTT. La mezcla se incubó a 37 °C durante 4 min, y después de la incubación, se añadieron 50 µl de $CaCl_2$ a la mezcla, y se midió inmediatamente el tiempo de coagulación.

Para determinar la actividad de FVIII de las muestras de ensayo, se trazó el tiempo de coagulación de los patrones usando escala semilogarítmica (tiempo de coagulación: lineal; concentración de patrón: logarítmica) para extrapolar la ecuación entre el tiempo de coagulación y la actividad de FVIII, y entonces se calculó la actividad de FVIII-XTEN frente a la curva patrón. La sensibilidad del ensayo fue 40 mU/ml de factor VIII.

Resultados: Los resultados se resumen en las FIG. 44-46. Cuando se insertaba un solo XTEN de 144 o 288 aminoácidos en el FVIII, todas las proteínas de fusión de FVIII-XTEN que mostraban actividad en el ensayo cromogénico también eran activas en ensayo de aPTT. La actividad de aPTT siguió la tendencia del ensayo cromogénico, por ejemplo, aquellas moléculas que mostraban baja actividad de FVIII en el ensayo cromogénico también tenían valores de aPTT bajos. En general, los resultados de aPTT para las proteínas de fusión fueron menores que los obtenidos por el ensayo cromogénico, con una relación de cromogénico a aPTT de 1,1 hasta 2,2, como se ilustra en la FIG. 44, para las inserciones de XTEN individuales. Las proteínas de fusión de FVIII-XTEN con múltiples inserciones de XTEN, en general, mostraron reducciones adicionales en la actividad de aPTT en comparación con el ensayo cromogénico. Los ensayos de FVIII-XTEN con dos inserciones de XTEN mostraron actividad con todas las construcciones, pero con las relaciones de cromogénico/aPTT aproximándose a 4, en algunos casos (FIG. 45). Los ensayos de FVIII-XTEN con unas tres inserciones de XTEN también mostraron actividad en ambos ensayos, con las relaciones de cromogénico/aPTT aproximándose a 5, en algunos casos (FIG. 46), mientras que las relaciones para el

control de BDD-FVIII fueron más comparables (lado derecho de la FIG. 46). Adicionalmente, el sitio de inserción de XTEN parecía contribuir a las diferencias observadas entre las actividades de aPTT y cromogénicas. Por ejemplo, aunque algunas moléculas con 2 inserciones de XTEN produjeron una actividad hasta 4 veces menor que los valores cromogénicos, la actividad de aPTT de otras moléculas de FVIII con 2 XTEN fueron bastante comparables a la actividad cromógena (FIG. 45). Algunas moléculas con 3 inserciones de XTEN mostraron hasta 5 veces menor que las actividades cromógenas, otras moléculas de FVIII con 3 XTEN tienen actividad de aPTT menos de 2 veces menores que la actividad cromógena (FIG. 45). En las condiciones del experimento, los resultados respaldan la conclusión de que las construcciones de proteína de fusión de FVIII-XTEN retienen la actividad procoagulante, pero que el ensayo cromogénico en general proporciona niveles de actividad mayores que en el sistema de ensayo de aPTT empleado en el estudio.

Ejemplo 50: Evaluaciones del efecto del sitio de inserción de XTEN sobre la prolongación de la semivida de FVIII

Métodos: Se ensayaron seis proteínas de fusión de FVIII-XTEN con inserciones individuales de XTEN AG-144 en ubicaciones definidas en ratones FVIII/VWF DKO (como se describe en general en el ejemplo 32) para evaluar el efecto del sitio de inserción de XTEN sobre la semivida de FVIII. Se seleccionaron seis variantes de XTEN representativas (enumeradas en la tabla 1) con inserción de XTEN en A1, A2, a3, A3-región 1 (A3-R1), A3-región 2 (A3-R2) o en el extremo C para este estudio, y el BDD-FVIII generado a partir del vector fundamental se usó como control. Se trataron ratones FVIII/VWF DKO con una sola administración intravenosa de concentrado de medio de cultivo celular de transfección transitoria de las seis construcciones de FVIII-XTEN (o medios de control positivo) a 100-200 UI/kg, y posteriormente se recogieron muestras de plasma a los 5 min, 7 horas y 16 horas después de la dosis. La actividad de FVIII plasmática se ensayó usando el ensayo cromogénico de FVIII y la semivida de FVIII-XTEN se estimó usando el programa WinNonlin. Los datos del estudio se resumen en la tabla 45 y la FIG. 47.

Resultados: Se observó una semivida significativamente más larga para todas las variantes de FVIII-XTEN ensayadas en comparación con el control de BDD-FVIII, pero el grado de aumento de la semivida varió, confiriendo la variante con XTEN en el sitio de inserción 403 una prolongación de la semivida de al menos 10 veces (en comparación con el control), mientras que la variante de inserción 1900 confirió la mayor prolongación de la semivida de 18 veces. Las diferencias en el sitio de inserción de XTEN sobre la semivida de FVIII puede reflejar las funciones de diferentes dominios de FVIII en la eliminación de FVIII *in vivo*.

Tabla 45: PK de variantes de inserción de AG-144 individual de FVIII-XTEN en ratones FVIII/VWF DKO

Tratamiento	BDD-FVIII	pSD-050	pSD-0003	pSD-0039	pSD-0010	pSD-063	pSD-014
Sitio de inserción	Ninguno	26	403	1656	1720	1900	CT
Recuperación	21,3	33,8	34,8	36,0	33,6	39,6	32,4
t1/2 (h)	0,25	3,15	2,4	3,3	4,28	4,54	3,91
Aumento de t1/2 (factor)		13	10	13	17	18	16

Ejemplo 51: Evaluaciones del efecto aditivo de las inserciones de XTEN sobre la prolongación de la semivida de FVIII.

Métodos: Para evaluar los efectos de múltiples inserciones de XTEN sobre la semivida de la proteína de fusión de FVIII-XTEN, se determinaron las semividas de variantes de FVIII-XTEN con 1-3 inserciones de XTEN en ratones FVIII-XTEN DKO usando el concentrado de cultivo celular de cinco construcciones (como se describe en general en el ejemplo 32). Se ensayaron cinco variantes de FVIII-XTEN en el estudio: pSD-062, con inserción de AE144 en la posición 1900 (numerada con respecto al factor VIII de longitud completa); pSD-0005 con AE144 en el dominio B de FVIII (posición del aminoácido 745 del dominio B); pSD-0019 con AE288 en el extremo C de FVIII (CT); LSD0003.006 con AE144 insertado en el dominio B y AE288 insertado en el extremo C, y LSD0055.021 con tres XTEN de AE144, AE144 y AE288 insertados en la posición 1900, con el dominio B y en el extremo C. Los valores de las semividas de FVIII-XTEN se estimaron usando el programa WinNonlin.

Resultados: Los resultados del estudio se resumen en la tabla 46, y las curvas PK se muestran en la FIG. 48. Los resultados del estudio demostraron claramente el efecto aditivo de múltiples inserciones de XTEN sobre la prolongación de la semivida de FVIII. Con inserciones de XTEN individuales, la semivida de FVIII se prolongaba de 0,25 h a 3,2-4,0 h, un aumento de 13 a 16 veces. Cuando las inserciones de XTEN en B y CT se combinaban juntas, la semivida de FVIII se prolongaba más hasta 10,6 h, una prolongación de 42 veces. Finalmente, en el caso de una tercera inserción de XTEN añadida en la posición 1900 a la construcción B/CT, la semivida alcanzaba 16 h en los ratones FVIII-VWF DKO, un aumento de 64 veces.

Tabla 46: Efecto aditivo de inserciones de XTEN sobre $t_{1/2}$ de FVIII en ratones FVIII/VWF DKO

Tratamiento	BDD-FVIII	pSD-062	pSD-0005	pSD-0019	LSD-0003.006	LSD-0055.021
Sitio de inserción de XTEN	Ninguno	1900	B	CT	B/CT	1900/B/CT
Recuperación	21,3	35,3	44,9	33,3	39,0	37,2
t1/2 (h)	0,25	3,8	3,2	4,0	10,6	16,0
Aumento de t1/2 (factor)		15	13	16	42	64

Ejemplo 52: Evaluación de interferencia de FVIII-XTEN con la unión de anticuerpos anti-FVIII usando el ensayo de Bethesda

La capacidad de las inserciones de XTEN en la molécula de FVIII de interferir con la unión por anticuerpos anti-FVIII preexistentes a la proteína de fusión de FVIII-XTEN se evaluó para determinar su utilidad en tratar a pacientes con anticuerpos inhibidores anti-FVIII.

Métodos: Para evaluar la unión de anticuerpos anti-FVIII, se ensayaron dos variantes de FVIII-XTEN (PSD088, con 144 XTEN insertado en las ubicaciones de 26/403/1656/1900; y PSD-090, con 144 XTEN insertado en las ubicaciones de 26/1656/1720/1900) en comparación con Refacto (un rFVIII comercializado) frente a muestras de plasma de tres pacientes de hemofilia A con inhibidores de factor VIII (denominados 04-483, 05-505 y GK1838-2079), así como un anticuerpo policlonal de oveja anti-FVIII de Affinity Biologicals Inc (F8C-EIA-C). El valor de Bethesda de los cuatro Ab anti-FVIII contra las dos variantes de FVIII-XTEN (pSD-088 y pSD-090) y el control Refacto se determinó usando métodos de ensayo de Bethesda modificados, detallados de la siguiente manera. Se incubaron muestras de anticuerpo anti-FVIII inactivado por calor a diversas diluciones con 1 UI/ml de cada variante de FVIII (diluida en 1X en tampón de ensayo cromogénico de FVIII) a una relación de 1:1. Las mezclas de FVIII/anticuerpo entonces se incubaron durante 2 horas en una estufa de incubación a 37 °C. Después de la incubación, las muestras se diluyeron a factor 10 con tampón de ensayo cromogénico de FVIII 1x, y entonces se usaron 25 µl de mezcla diluida para un ensayo cromogénico de FVIII. El porcentaje de actividad de FVIII remanente se calculó frente a la actividad después de la incubación de una muestra no neutralizante conocida. Las unidades Bethesda se calcularon usando la siguiente fórmula: UB = factor de dilución X (LN(porcentaje de actividad remanente) + 6,6438).

Resultados: Los resultados se enumeran en la tabla 47. Se observaron valores disminuidos de unidades Bethesda (UB) para los cuatro anticuerpos cuando se ensayaron frente a las dos variantes de FVIII-XTEN, en comparación con Refacto. Se obtuvo una disminución de 5 a 8 veces frente a PSD-088 y una disminución de 3 a 5 veces frente a pSD-090, respectivamente. Se trazaron las curvas de inhibición frente a las variantes de FVIII para cada anticuerpo (FIG. 49) y se compararon con Refacto, y demuestra un claro desplazamiento a la izquierda de la curva de inhibición para las dos moléculas de FVIII-XTEN, produciendo la variante de FVIII-XTEN pSD-088 un desplazamiento a la izquierda adicional en comparación con pSD-090. Estos resultados demuestran claramente que: 1) ambas proteínas de fusión de variante de FVIII-XTEN son más resistentes a anticuerpos inhibidores anti-FVIII preexistentes que Refacto; y 2) PSD-088 es más resistente a anticuerpos anti-FVIII que PSD-090, lo que puede proporcionar información útil en determinar las diferencias en los sitios de inserción de XTEN en la interferencia con la unión de anticuerpos anti-FVIII. En las condiciones del experimento, los resultados proporcionan algún respaldo para el uso potencial de composiciones de FVIII-XTEN para tratar a pacientes de hemofilia A con inhibidores de factor VIII.

Tabla 47: Valor de Bethesda de anticuerpo anti-FVIII frente a variantes de FVIII-XTEN

Ab anti-FVIII / FVIII	04-483	05-505	GK1838-2079	F8C-EIA-C
pSD-088 (16/403/1656/1900)	2,5	8	47	57
pSD-090 (26/1656/1720/1900)	3,4	12	55	96
Refacto	12	66	268	337

Ejemplo 53: Evaluaciones de la semivida de moléculas de fusión de FVIII XTEN que contienen cuatro inserciones de XTEN en ratones con hemofilia A

Métodos: Se ensayaron ocho proteínas de fusión de FVIII-XTEN con cuatro inserciones de XTEN cada una en ubicaciones definidas en ratones FVIII/VWF DKO para evaluar el efecto de las inserciones de XTEN sobre la prolongación de la semivida de FVIII: LSD0071.001, contiene inserciones de XTEN 403-AG144, 1900-AE144, 745(B)-AE144, 2332(CT)-AE288 (denominada según el número de aminoácido de FVIII y el XTEN insertado); LSD0071.002, que contiene las inserciones de XTEN 403-AE144, 1900-AE144, 745(B)-AE144, 2332(CT)-AE288; LSD0072.001, que contiene las inserciones de XTEN 403-AG144, 1900-AG144, 745(B)-AE144, 2332(CT)-AE288; LSD0072.002, que contiene las inserciones de XTEN 403-AE144, 1900-AG144, 745(B)-AE144, 2332(CT)-AE288; pBC0247.004, que contiene las inserciones de XTEN 18-AG144, 403-AE144, 1656-AG144, 2332(CT)-AE288; pBC0251.002, que contiene las inserciones de XTEN 18-AG144, 1656-AG144, 1900-AE144, 2332(CT)-AE288; pSD088, que contiene las

inserciones de XTEN 26-AG144, 403-AE144, 1656)-AG144, 1900-AE144 y pSD090, que contiene las inserciones de XTEN 26-AG144, 1656-Ag144, 1720-AG144, 1900-AE144. Se trataron ratones FVIII/VWF DKO, como se describe en general en el ejemplo 32, con una sola administración intravenosa de concentrado de medio celular de transfección de FVIII-XTEN de las ocho construcciones a 100-200 UI/kg, y posteriormente se recogieron muestras de plasma a los 5 min, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h después de la dosis. La actividad de FVIII plasmática se ensayó usando el ensayo cromogénico de FVIII y la semivida de FVIII-XTEN se estimó usando el programa WinNonlin.

Resultados: Las ocho moléculas de fusión de FVIII XTEN que contenían cuatro inserciones de XTEN mostraron semivida más larga que el FVIII sin modificar (resultados en la tabla 48). Tres moléculas con inserciones de XTEN en las posiciones 403, 1900, dominio B y extremo C consiguieron semivida de hasta 16,3 h, que es una mejora de 65 veces en comparación con BDD FVIII sin modificar. Sin embargo, las moléculas ensayadas con inserciones de XTEN en 26/403/1656/1900 (pSD088), o en 26/1656/1720/1900 (pSD090) mostraron semivida de 9,1 h y 9,5 h, respectivamente que, en comparación con BDD FVIII, representa un aumento de 36 veces y 38 veces, respectivamente. pBC247.004 (inserciones de XTEN en 18/403/1656/CT) y pBC251.002 (inserciones de XTEN en 18/1900/1656/CT) consiguieron valores de semivida de 14,1 h y 13 h, respectivamente. Los resultados demuestran que múltiples inserciones de XTEN (en este caso, cuatro inserciones de XTEN para cada molécula de FVIII) pueden mejorar significativamente la semivida de FVIII. Muestran además que el efecto de XTEN sobre la prolongación de la semivida de FVIII depende del sitio de inserción, incluso en el caso de múltiples inserciones de XTEN.

Tabla 48: PK de variantes de FVIII-XTEN con cuatro inserciones de XTEN en ratones FVIII/VWF DKO

Tratamiento	Inserciones de XTEN	t 1/2 (h)	Aumento de t1/2 (factor)
BDD-FVIII	Ninguno	0,25	NA
LSD0071,001	403AG/1900AE/B/CT	16,2	64,8
LSD0071,002	403AE/1900AE/B/CT	16,3	65,2
LSD0072,001	403AG/1900AG/B/CT	11,8	47,2
LSD0072,002	403AE/1900AG/B/CT	16,1	64,4
pBC247,004	18/403/1656/CT	14,1	56,4
pBC251,002	18/1900/1656/CT	13,0	52
pSD088	26/403/1656/1900	9,1	36,4
pSD090	26/1656/1720/1900	9,5	38

Tabla 49: Actividad biológica ejemplar, ensayos ejemplares e indicaciones preferidas

Proteína biológicamente activa	Actividad biológica	Ensayos de actividad ejemplares	Indicación preferida:
Factor VIII (Factor VIII; Octocog alfa; Moroctocog alfa; factor antihemofílico recombinante Nordiate; ReFacto; Kogenate; Kogenate SF; Helixate; Recombinate)	El factor VIII de coagulación es un factor esencial para la hemostasia. Este gen codifica el factor VIII de coagulación, que participa en la vía intrínseca de coagulación sanguínea; el factor VIII es un cofactor del factor IXa que, en presencia de Ca+2 y fosfolípidos, convierte el factor X en la forma Xa activada. Este gen produce dos transcritos empalmados de forma alternativa. La variante 1 de transcripción codifica una glucoproteína grande, isoforma a, que circula en plasma y se asocia con el factor de Von Willebrand en un complejo no covalente. Esta proteína se somete a múltiples eventos de escisión. La variante 2 de transcripción codifica una proteína pequeña putativa, isoforma b, que consiste principalmente en el dominio de unión a fosfolípidos de	Ensayo cromogénico (Rosen S, Scand J Haematol (1984) 33 (Supl. 40):139-45); ensayo de Factor VIII Chromogenix; Coamatic®; ensayo de coagulación de una fase (Lethagen, S., *et al*., Scandinavian J Haematology (1986) 37:448-453. Ensayo de coagulación de una fase y ensayo de coagulación de dos fases (Barrowcliffe TW, Semin Thromb Hemost. (2002) 28(3):247-256); desarrollo de un ensayo cromogénico de factor VIII simple para uso clínico. (Wagenvoord RJ, Hendrix HH, Hemker HC. Haemostasis 1989; 19(4): 196-204) ensayo de Bethesda (Verbruggen B, *et al*. Improvements in factor VIII inhibitor detection: From Bethesda to Nijmegen. Semin Thromb Hemost. 2009 Nov; 35(8):752-759)	Hemofilia A; hemorragia; deficiencia de factor VIII; episodios hemorrágicos en pacientes con inhibidor de factor VIII; episodios hemorrágicos relacionados con cirugía

Proteína biológicamente activa	Actividad biológica	Ensayos de actividad ejemplares	Indicación preferida:
	factor VIIIc. Este dominio de unión es esencial para la actividad coagulante. Los defectos de este gen provocan hemofilia A, un trastorno de coagulación ligado al X recesivo común.		

Tabla 50: CFXTEN ejemplar que comprende FVIII y secuencias de XTEN internas/externas (SEQ ID NO: 1537-1554, respectivamente, en orden de aparición)

Nombre de CFXTEN	Secuencia de aminoácidos
FVIII BDD2 (A1-K127-AE144-V128-N745-AE288-P1640-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDL VKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQAS LEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYD DDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQA SRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRY YSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRF LPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGY TFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTG DYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGPPVLK RHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEV EDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTK DEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKS WYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMG SNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAG MSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSW IKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDS SGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYF TNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTS MYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVH QIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD2 (A1-A375-AE576-K376-N745-AE144-P1640-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRF MAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLI CYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIM HSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGE TVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNA IEPRSFSQNGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDF DIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEF TDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGA EPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCH TNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHA INGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPG VFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMY SLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELM GCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPK EWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGN QDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

Nombre de CFXTEN	Secuencia de aminoácidos
FVIII BDD2 (A1-Y1792-AF144-E1793-Y2332-AE864)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRG ELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYGGTSTPESGSASPGTSPSGESS TAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGT STPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGEEDQRQ GAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLV CHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRF HAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNL YPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITA SGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFI IMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRME LMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNN PKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQ GNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAP

Nombre de CFXTEN	Secuencia de aminoácidos
FVIII BDD2 (A1-Y2043-AG144-G2044-Q2222-AG864-V2223-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRG ELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNET KTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQV TVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLV MAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKA GIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSGGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYIS QFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLR MELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQG GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTS MYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVH QIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD2 (A1-G1799-AE144-A1800-F2093-AE42-S2094-V2223-AE42-N2224-AE42-N2225-G2278-AE42-K2279-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFN IAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTS QREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLV CREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGY VNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTL LMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVV RFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQR IGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGIT DVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERD LASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLE DPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYE DTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYED ISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDE DENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGS FTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGGGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEK DVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQ MEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVR KKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPL GMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKT QGARQKFGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPGSSLYISQFIIMYS LDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMG CDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVGPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGGNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTT QGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGGTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLY

Nombre de CFXTEN	Secuencia de aminoácidos
FVIII BDD2 (A1-R28-AG144-F29-G244-AG288-L245-R2090-AG576-Q2091-Y2332-AG864)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSGFPPRVPKSFPFNTSV VYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSY WKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDL VKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGLIGCHRKSVY WHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKK HPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETF KTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLK DFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQR GNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDS LQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNP PVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAA VERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYI RAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHM APTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFD ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAGINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWY LLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGE HLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWST KEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGQKFSSLYTSQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSS GIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFT NMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSM YVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQ IALRMEVLGCEAQDLYGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

Nombre de CFXTEN	Secuencia de aminoácidos
FVIII (A1-T1651-AG576-R1652-K1808-AG144-P1809-F2093-AG288-S2094-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLR QSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQL RLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDT TLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGP ALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTP LIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPE SARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLK EMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKN LFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQI VEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTP STLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSS HLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKK VENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWN EANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDT ILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITGPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSSGRTTLQSDQEEI DYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRA QSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGPNETKTYFWKVQHHMAPTKD EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSW YFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGS NENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGM STLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWI KVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRME LMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNN PKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQ GNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

Nombre de CFXTEN	Secuencia de aminoácidos
FVIII BDD2 (A1-A28-AG42-F29-E124-AG42-D125-E124-AG42-D125-P333-AG42-Q334-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDAGGAPSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGPSGPGRFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEV YDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEGGPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYS YLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGGSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVN GYVNSSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQT LLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKK HPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETF KTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLK DFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQR GNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDS LQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNP PVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAA VERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYI RAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHM APTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFD ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEH LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTK EPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFF GNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQIT ASSYFTNMFATWTPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVK SLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQ SWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

Nombre de CFXTEN	Secuencia de aminoácidos
FVIII (A1-D345-AE144-Y346-D403-AE144-R405-R1797-AE288-Q1798-Y2322)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDGGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGYD DDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDGGT STPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAE SPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPG TSPSGESSTAPGRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLY GEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTV EDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVF DENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGM TALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPEN DIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDS NNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTI PSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESG LMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRK THIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKN MEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGP EKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKI QEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLN DSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALK QFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSI PQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNL SLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKD LFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLA WDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWA KQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRG ELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRGGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSLGSAPGQGALPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDL EKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNI QMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVR KKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG MASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQG ARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRL HPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHL QGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQW TLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

Nombre de CFXTEN	Secuencia de aminoácidos
FVIII (A1-N745)-AE864-(P1640-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTIS VEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQ FKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISY EEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSG LIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTF KENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHI RDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFS SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSI RSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNA WRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQN GKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD9 (A1-N745)-AE288-(P1640-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGLTVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGPPVLKRHQREITRTTLQSDQ EEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRN RAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRP YSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVD LEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPC NIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFT VRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTP LGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKT QGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYI RLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ DLY

Nombre de CFXTEN	Secuencia de aminoácidos
FVIII BDD9 (A1- S743)-AE288-(Q1638-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGPPVLKRHQREITRTTLQS DQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVL RNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQA SRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCR APCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGH VFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKC QTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIH GIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPII ARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSK ARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGC EAQDLYGAGSPGAETAPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSPATG
FVIII BDD9 (A1-N745)-AG288_2-(P1640-Y2332)-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGPPVLKRHQREITRTTLQS DQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVL RNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQA SRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCR APCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGH VFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKC QTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIH GIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPII ARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSK ARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGC EAQDLYGAGSPGAETAPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSPATG

Nombre de CFXTEN	Secuencia de aminoácidos
FVIII BDD9 (A1-S743)-AG288_2-(Q1638-Y2332)-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGPPVLKRHQAEITRTTLQSDQ EEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRN RAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRP YSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVD LEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPC NIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFT VRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTP LGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKT QGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYI RLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ DLYGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD10 (A1-N745)-AE288-(P1640-Y2332)-AE288	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGPPVLKRHQAEITRTTLQSDQ EEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRN RAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRP YSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVD LEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPC NIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFT VRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTP LGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKT QGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYI RLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ DLYGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

Nombre de CFXTEN	Secuencia de aminoácidos
FVIII BDD10 (A1- S743)-AE288-(Q1638-Y2332)-AE288	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPPVLKRHQAEITRTTLQSD QEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQAS RPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSD VDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRA PCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVF TVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQT PLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIK TQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARY IRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ DLYGAGSPGAETAPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSPAT G
FVIII BDD10 (A1-N745)-AG288_2-(P1640-Y2332)-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSPAT G

Nombre de CFXTEN	Secuencia de aminoácidos
FVIII BDD10 (A1- S743)-AG288_2-(Q1638-Y2332)-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSD QEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQAS RPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSD VDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRA PCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVF TVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQT PLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIK TQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARY IRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ DLYGAGSPGAETAPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSPAT G

El nombre de la secuencia refleja la configuración del extremo N a C de los segmentos de FVIII (números que abarcan los aminoácidos con respecto a la secuencia madura) y componentes de XTEN

Tabla 51: CFXTEN ejemplar que comprende FVIII, secuencias de escisión y secuencias de XTEN (SEQ ID NO: 1555-1590, respectivamente, en orden de aparición)

Nombre de CFXTEN	Secuencia de aminoácidos
SP-AE288-CS-L-(FVIII_1-745)-AE288-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE288	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQGPEGPSATRRYYLGAVE LSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLG PTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSH TYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWH VIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGM EAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAI QHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEI FKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDK RNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEV AYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDF RNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGTSEATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTD GSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRK NFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNP AHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMD TLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEML PSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLA RLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTY RGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKV

	TGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLL TRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGPEGPSQSPRSFQGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS AP
SP-AE576-CS-L-(FVIII_1-745)-AE576-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE288	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQS PRSFQGPSGPATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFV EFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEY DDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGA LLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNG YVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLY SRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGP LLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNI MHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGE TVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIE PRSFSQNGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQKKTRHY FIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLG PYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHH MAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFD ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLS MGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHA GMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSW IKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSG IKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKE FLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRME VLGCEAQDLYGPEGPSQSPRSFQGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
SP-(FVIII_1-745)-AE576-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE576	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSV VYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYW KASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVK DLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAW PKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPI TFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNN GPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPH

	GTTDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLED PEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTL TLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQNGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGE LNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKT YFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQ EFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVE CLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINA WSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLM VFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQ ITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVK SLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQS WVHQIALRMEVLGCEAQDLYGPEGPSQSPRSFQGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAP
SP-AE576-CS-L-(FVIII_1-745)-AE576-(FVIII_1686-2332)	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSLGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQS PRSFQGPEGPSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLF VEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAE YDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIG ALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVN GYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTL LMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF DDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRK YKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIG PLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNI MHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGE TVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIE PRSFSQNGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQKKTRHY FIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLG PYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHH MAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFD ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLS MGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHA GMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSW IKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSG IKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKE FLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRME VLGCEAQDLY

SP-AE576-CS-L-(FVIII_1-743)-AE288-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE576	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPIEP RSPSGSPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT VHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDD QTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALL VCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGY VNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLM DLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYK KVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSR RLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLI CYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHS INGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVF MSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRS FSGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQS GSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYS SLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDV HSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDP TFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRD FQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYI SQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLR MELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVN NPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQG NQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGSPGIEPRSPSGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

SP-AG288-CS-L-(FVIII_1-743)-AG576-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AG288	MQIELSTCFFLCLLRFCFSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSIEPRSPSGSPGATRRYYLGAVEL SWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGP TIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFIL LFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHV IGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGME AYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTW VHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQ HESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIF KYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKR NVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVA YWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFR NRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITR TTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRP YSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDL EKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQ MEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKK EEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMAS GHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQK FSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSI RSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAW RPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKV KVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGSPGQSPRSFQ PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTG PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
SP-AG576-CS-L-(FVIII_1-745)-AG288-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE576	MQIELSTCFFLCLLRFCFSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SQSPRSFQGSPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLF VEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAE YDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIG ALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVN GYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTL LMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF DDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRK YKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIG PLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNI MHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGE

	TVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIE PRSFSQNPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVL RNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASR PYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVD LEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNI QMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRK KEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQ KFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHY SIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNA WRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNG KVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGSPGQSPR SFQGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
SP-(FVIII_1-743)-AG576-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AG576	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSV VYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYW KASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVK DLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAW PKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPI TFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNN GPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPH GITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLED PEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTL TLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSQSPRS FQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGEL NEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTY FWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQE FALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVE CLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINA WSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLM VFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQ ITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVK SLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQS WVHQIALRMEVLGCEAQDLYGSPGQSPRSFQPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGS

SP-AG288-CS-L-(FVIII_1-743)-AG288-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE288	MQIELSTCFFLCLLRFCFSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSQSPRSFQGPSGPATRRYYLGAV ELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLL GPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGS HTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHK FILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYW HVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDG MEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPK TWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREA IQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGE IFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDK RNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEV AYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDF RNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDG SFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKN FVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPA HGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTL PGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARL HYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRG NSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGME SKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTG VTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTR YLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGPSGPQSPRSFQGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

SP-AE576-CS-L-(FVIII_1-743)-AG576-(FVIII_1686-2332)	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PRSFQGSPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVE FTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYD DQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGAL LVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGY VNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLM DLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYK KVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSR RLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLI CYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHS INGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVF MSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRS FSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSQSPRSFQKKTRHYFIA AVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYI RAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAP TKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKS WYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGS NENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMS TLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKV DLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKH NIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFAT WSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLI SSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVL GCEAQDLY

FVIII BDD2 S367-FXIa-AE42-F368-Y2332-FXIa-AE864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNSSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPLGR IVGGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGPLGRIVGGPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDT ISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQ FKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYE EDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKEN YRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYN LYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITAS GQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIM YSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMG CDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEW LQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSF TPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYPLGRIVGGGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
FVIII BDD2 N745-FIXa-AG288-FIXa-P1640-Y2332-FIXa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPLGR IVGGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGPLGRIVGGPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDT ISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQ FKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYE EDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKEN YRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYN LYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITAS GQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIM YSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMG CDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEW LQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSF TPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYPLGRIVGGGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

FVIII BDD2 V128-FVIIa-AG42-FVIIa-G2044-FVIIa-AG144-Y2332-FVIIa-AG576	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVLQVRIVGGGAPSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGPSGPGLQVRIVGG FPGGSIITYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQ TLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSH QHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAK KHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETF KTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDF PILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQ IMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSV CLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGC HNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQRE ITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMS SSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTF RNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWA YFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNC RAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHV FTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTP LGMASGHIRDFQITASGQYGLQVRIVGGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGLQVRIVGGQWAPKLARLHYSGS INAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGT LMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISD AQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHP QSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYLQVRIVGGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGS

AE864-FVIII-Trombina-AE144	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQRE KEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGS LAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLL FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQ IRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHP STRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKY ETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDF KVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEE NNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKT SNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSN KTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQ LVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQ EKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRS LNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRAL KQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSI PQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLS LAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFP TETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDN HYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRT ERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTR HYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGL LGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLH AGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFS WIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDS SGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYV KEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLYGLTPRSLLVGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP

FVIII BDD3-FXIIa-AE144	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYGGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD3-Elastasa-AE144	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYGGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAP

FVIII BDD3-FXIa-AE144	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYGKLTRAETGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD3-Trombina-AE144	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYGLTPRSLLVGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144-FVIII BDD2-MMP-17-AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEG AEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGL IGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHT

	VNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVV RFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIG RKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVR PLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQAS NIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFS GETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNN AIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL GLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKV QHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFF TIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRW YLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEH LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEP FSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNV DSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYF TNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSM YVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA LRMEVLGCEAQDLYGAPLGLRLRGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE144-FVIII BDD2-FXIIa-AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEG AEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGL IGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHT VNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVV RFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIG RKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVR PLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQAS NIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFS GETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNN AIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL GLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKV QHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFF TIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRW YLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEH LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEP FSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNV DSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYF TNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSM YVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA LRMEVLGCEAQDLYGTMTRIVGGGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

AG144-FVIII BDD2-FXIa-AG576	SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEG AEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGL IGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHT VNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVV RFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIG RKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVR PLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQAS NIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFS GETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNN AIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL GLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKV QHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFF TIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRW YLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEH LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEP FSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNV DSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYF TNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSM YVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA LRMEVLGCEAQDLYGKLTRAETGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGS
AE144-FXIa-FVIII BDD2-AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGKLTRAETGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNT SVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVS YWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDL VKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASAR AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEI SPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYL NNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIY PHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNM ERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYED TLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISA YLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQ SPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLY RGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNE TKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQV TVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVM AQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIW RVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGS INAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGT LMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISD AQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHP QSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

AE144-FVIII BDD2-Y2332-Trombina-AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEG AEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGL IGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHT VNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVV RFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIG RKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVR PLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQAS NIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFS GETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNN AIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL GLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKV QHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFF TIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRW YLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEH LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEP FSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNV DSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYF TNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSM YVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA LRMEVLGCEAQDLYGLTPRSLLVGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

AE864-FVIII-MMP-17-AE144	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQRE KEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGS LAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLL FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQ IRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHP STRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKY ETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDF KVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEE NNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKT SNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSN KTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQ LVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQ EKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRS LNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRAL KQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSI PQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLS LAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFP TETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDN HYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRT ERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTR HYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGL LGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLH AGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFS WIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDS SGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYV KEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLYGAPLGLRLRGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP

AF144-FXIIa-FVIII-FXIIa-AF864	GTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTA ESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGT SPSGESSTAPGTMTRIVGGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSV VYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYW KASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVK DLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAW PKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPI TFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNN GPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPH GITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLED PEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTL TLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLL RQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLR LNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLF GKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLT KDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDR MLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQ RTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSR NLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQN VEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRI SPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKE KGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSG VQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTS GKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATE SSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINE GQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFD IYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTD GSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRK NFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNP AHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMD TLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEML PSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLA RLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTY RGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKV TGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLL TRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGTMTRIVGGGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGT SPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSG TAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSP SGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPG PGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPE SGPXXXGASASGAPSTXXXXSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTA ESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGS TSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAES PGPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTST PESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP

AE864-FVIII-FXIa-AE144	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQRE KEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGS LAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLL FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQ IRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHP STRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKY ETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDF KVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEE NNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKT SNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSN KTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQ LVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQ EKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRS LNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRAL KQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSI PQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLS LAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFP TETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDN HYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRT ERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTR HYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGL LGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLH AGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFS WIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDS SGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYV KEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLYGKLTRAETGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144-FXIa-FVIII BDD9-AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGKLTRAETGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNT SVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVS YWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDL VKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASAR AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEI SPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYL NNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIY PHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNM ERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYED TLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISA YLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQ

	SPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLY RGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNE TKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQV TVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVM AQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIW RVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGS INAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGT LMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISD AQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHP QSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE48-FXIa-FVIII BDD9-AE864	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGKLTRAETGATRRYY LGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPW MGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVF PGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQ TLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSH QHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAK KHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETF KTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDF PILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQ IMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSV CLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGC HNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQRE ITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMS SSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTF RNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWA YFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNC RAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHV FTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTP LGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQ GARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLH PTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGR SNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

FVIII BDD9-FXIa-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYKLTRAETGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
FVIII BDD9-FXIa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYKLTRAETGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSP

FVIII BDD9 (1-745) AG288_2-(1640-Y2332)-FXIa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDE DENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFT QPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFV KPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAH GRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLP GLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARL HYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRG NSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGME SKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTG VTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTR YLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYKLTRAETGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
FVIII BDD9 (1-743) AG288_2-(1638-Y2332)-FXIa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG

	SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDE DENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFT QPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFV KPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAH GRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLP GLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARL HYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRG NSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGME SKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTG VTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTR YLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYKLTRAETGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
BDD10 (1-745) AG288_2-(1640-Y2332)-FXIa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDE DENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFT QPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFV KPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAH GRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLP GLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARL HYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRG NSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGME SKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTG VTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTR YLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYKLTRAETGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

FVIII BDD10-FXIa-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYKLTRAETGGASGPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSP
FVIII BDD10-FXIa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYKLTRAETGGASGPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSP

FVIII BDD10-FXIa-AE864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYK LTRAETGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP

El nombre de la secuencia refleja la configuración del extremo N al C de la variante de FVIII y los componentes de XTEN: péptido señal (SP); conector (L); secuencia de escisión (CS) pueden indicarse por el nombre de la proteasa activa sobre la secuencia, y los componentes de XTEN por el nombre de la familia y la longitud, con los puntos de inserción para los componentes indicados por el aminoácido de FVIII y las posiciones numeradas adyacentes a la secuencia insertada o siendo A1 el extremo N y siendo Y2332 el extremo C del FVIII.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión de factor VIII (FVIII) recombinante que tiene actividad procoagulante que comprende un polipéptido de FVIII al menos un polipéptido recombinante prolongado (XTEN), en la que el polipéptido de FVIII comprende un dominio A1 que comprende aminoácidos 1-372 de SEQ ID NO: 1592, un dominio A2 que comprende aminoácidos 373-740 de SEQ ID NO: 1592, una porción de un dominio B, un dominio A3 que comprende aminoácidos 1649-2019 de SEQ ID NO: 1592, un dominio C1 que comprende aminoácidos 2020-2172 de SEQ ID NO: 1592 y un dominio C2 que comprende aminoácidos 2173-2332 de SEQ ID NO: 1592, en la que el al menos un XTEN se inserta en el polipéptido de FVIII en un sitio que corresponde al aminoácido 745 de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1592, y en la que la proteína de fusión de FVIII recombinante muestra una semivida terminal prolongada cuando se administra a un sujeto en comparación con una proteína de FVIII correspondiente que carece del al menos un XTEN.

2. La proteína de fusión de FVIII recombinante de la reivindicación 1, en la que el al menos un XTEN se inserta en el polipéptido de FVIII en un sitio que corresponde al lado C-terminal del aminoácido 745 de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1592.

3. La proteína de fusión de FVIII recombinante de la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína de fusión de FVIII recombinante comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis XTEN opcionalmente en la que el XTEN tiene una longitud de entre 36 aminoácidos y 100 aminoácidos o comprende al menos 42 aminoácidos, al menos 72 aminoácidos, al menos 96 aminoácidos, al menos 144 aminoácidos o al menos 288 aminoácidos.

4. La proteína de fusión de FVIII recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el XTEN comprende uno o más motivos de secuencia de XTEN, en la que los motivos de secuencia de XTEN comprenden una o más secuencias de aminoácidos tal como se exponen en las SEQ ID NO: 23, 24, 25 o 26.

5. La proteína de fusión de FVIII recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el XTEN comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % o el 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos tal como se expone en las SEQ ID NO: 50, 51, 52, 67 o 78.

6. La proteína de fusión de FVIII recombinante de la reivindicación 5, en la que el XTEN comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 78.

7. La proteína de fusión de FVIII recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el polipéptido de FVIII es un polipéptido de FVIII monocatenario.

8. La proteína de fusión de FVIII recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la porción del dominio B carece de aminoácidos correspondientes a aminoácidos 747-1638 de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1592.

9. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de fusión de FVIII recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 9, opcionalmente en el que el vector es un plásmido, un cósmido, una partícula vírica, un fago, un vector de adenovirus, un vector de baculovirus o un vector de replicación autónomo.

11. El vector de expresión de la reivindicación 10, en el que el ácido nucleico está unido operativamente a un promotor, una secuencia líder, un terminador o un potenciador.

12. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 10 u 11.

13. La célula hospedadora de la reivindicación 12, en la que la célula hospedadora es una célula HEK293.

14. Un método de preparación de la proteína de fusión de FVIII recombinante, en el que el método comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 12 o 13 en un medio en condiciones adecuadas para preparar la proteína de fusión y recuperar la proteína de fusión.

15. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de FVIII recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

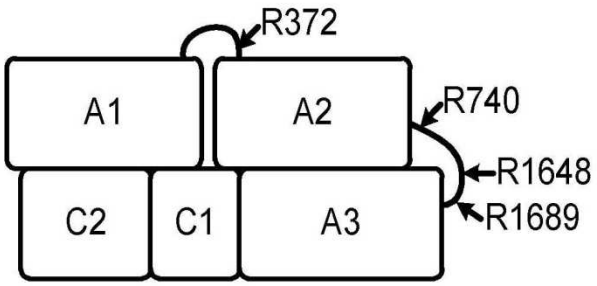
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de una coagulopatía, opcionalmente en la que la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular.

17. La composición farmacéutica de la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de un episodio de hemorragia.

18. La composición farmacéutica de la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de hemofilia A.

FIG. 1A

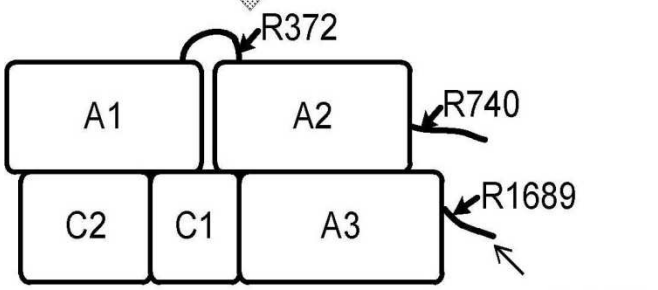
scFVIII



Procesamiento intracelular

FIG. 1B

FVIII



a3 ácido

Evento de coagulación

FIG. 1C

FVIIIa

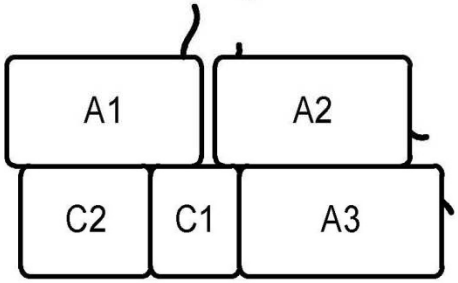


FIG. 1

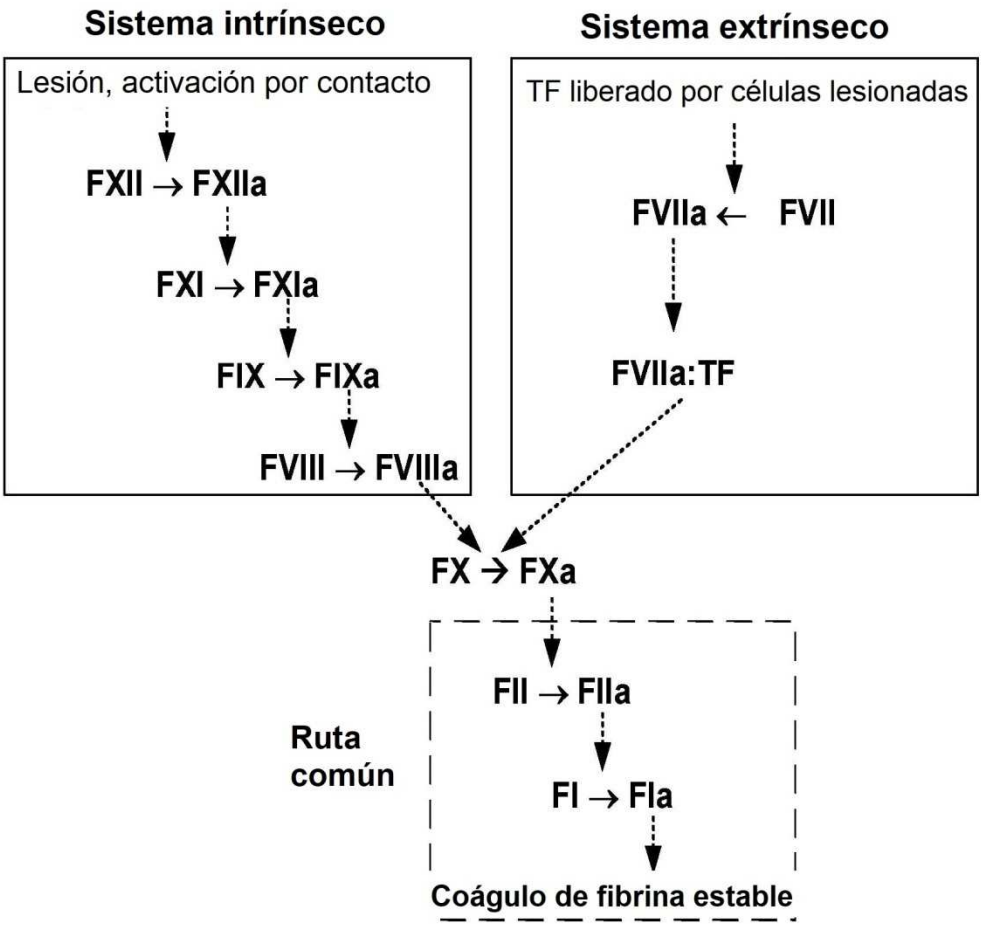

Sistema intrínseco
Lesión, activación por contacto
FXII → FXIIa
FXI → FXIa
FIX → FIXa
FVIII → FVIIIa
Sistema extrínseco
TF liberado por células lesionadas
FVIIa ← FVII
FVIIa:TF
FX → FXa
FII → FIIa
FI → FIa
Ruta común
Coágulo de fibrina estable

FIG. 2

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFN
IAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ
REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR
EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNR
SLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF
DDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIG
RKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGI
TDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNME
RDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG
VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKH
KMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYE
DSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMP
KIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQ
LHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDN
TSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSW
GKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSL
LIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQK
KEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEG
QNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEK
KETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNR
TKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRL
PLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSI
PQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKK
NNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHI
YQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSK
LLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKP
EIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIY
DEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTD
GSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGA
EPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHT
NTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHA
INGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYP
GVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITAS
GQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQ
FIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRS
TLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWR
PQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKV
KVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

FIG. 3

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFV
EFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVS
YWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTY
SYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSW
HSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM
GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHI
SSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDN
SPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGP
QRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQ
ASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG
PTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRN
VILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDS
LQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGE
TVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISA
YLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKK
EDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGS
VPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQ
ASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF
DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI
FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVM
AQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETV
EMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQIT
ASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGAR
QKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP
PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS
YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ
GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLD
PPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

FIG. 4

Fig. 5A

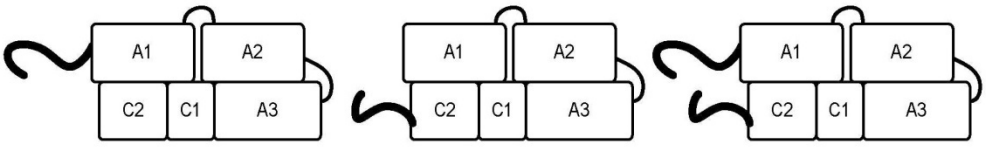


Fig. 5B

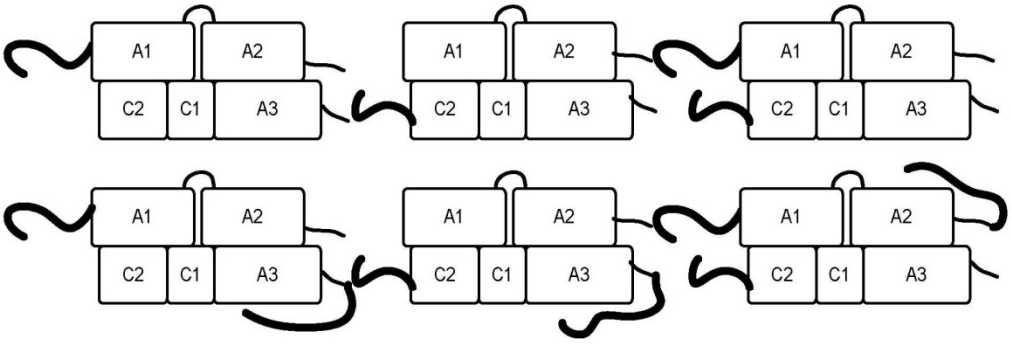


Fig. 5C

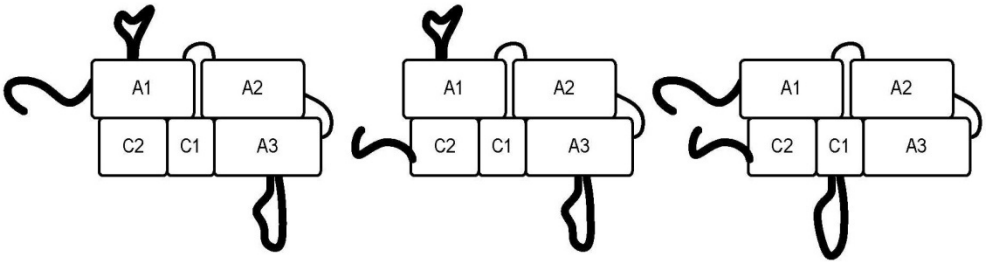


Fig. 5D

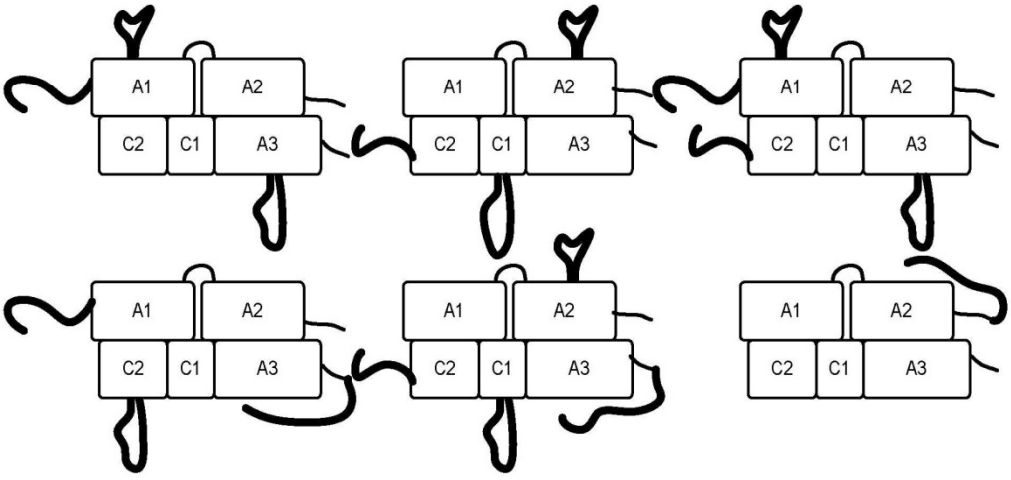


FIG. 5

Fig. 6A

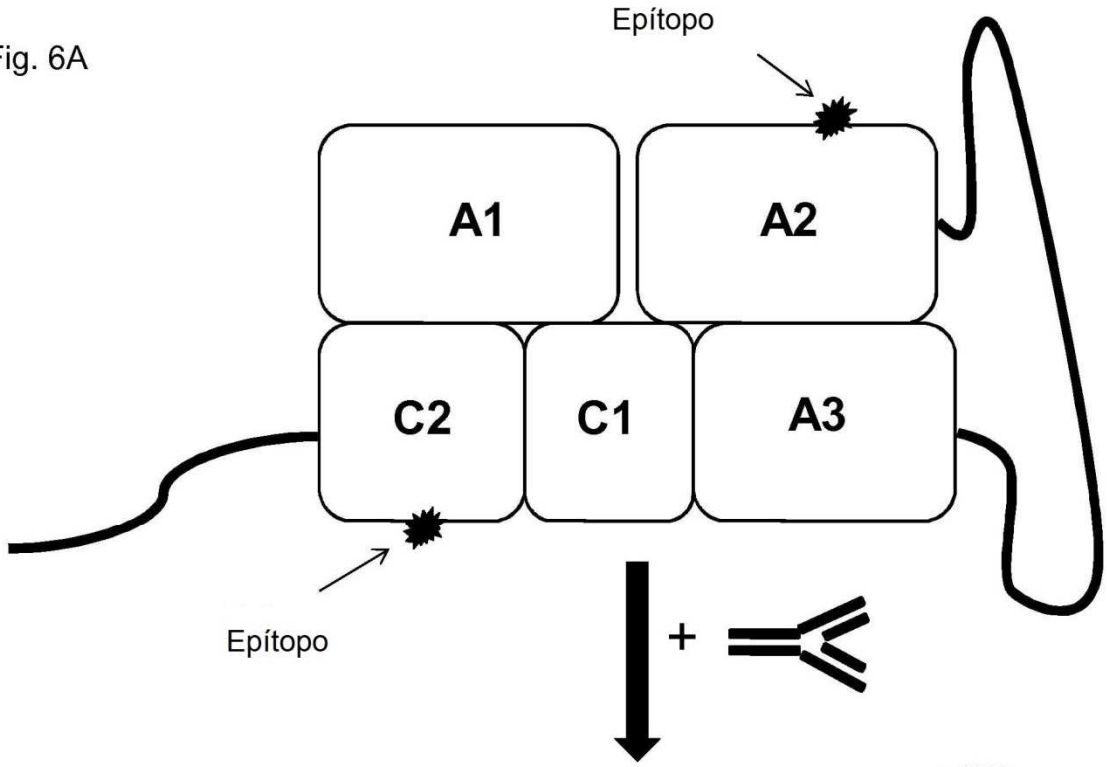


Fig. 6B

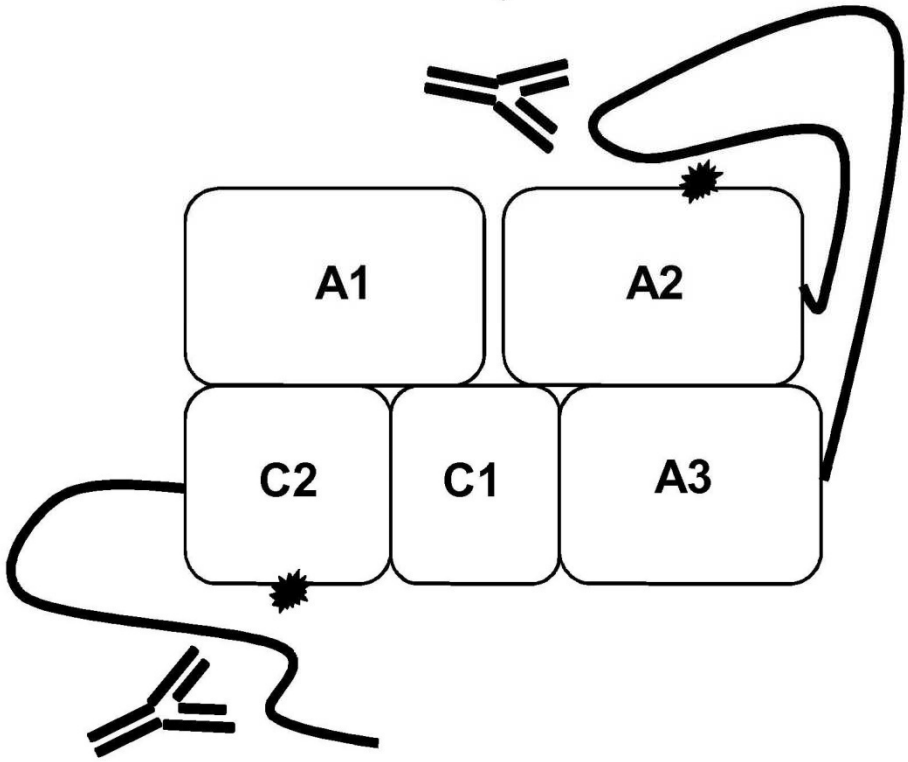


FIG. 6

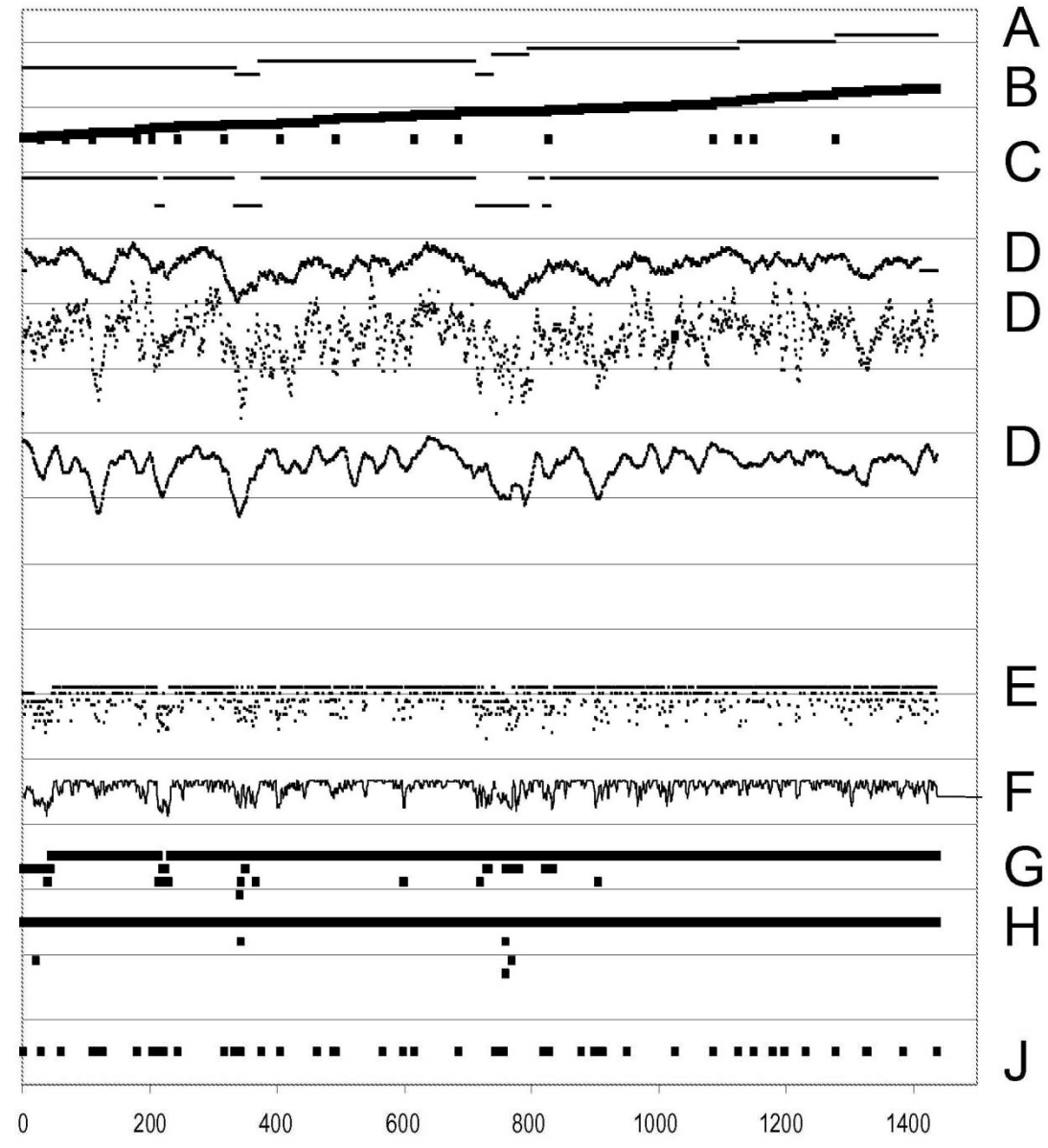

A
B
C
D
D
D
E
F
G
H
J
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
Número de residuo

FIG. 7

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL
FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHA
VGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASD
PLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFA
VFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR
KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL
TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVL
APDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILG
PLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD
FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGP
LLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG
VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNR
GMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLK
RHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK
TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFT
QPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEE
DQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLE
KDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTEN
MERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL
LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAG
IWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYG
QWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFS
SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPI
IARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS
YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVT
TQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVV
NSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

FIG. 8

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL
FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHA
VGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASD
PLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFA
VFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR
KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL
TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVL
APDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILG
PLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD
FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGP
LLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG
VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNR
GMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLK
RHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK
TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFT
QPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEE
DQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLE
KDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTEN
MERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL
LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAG
IWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYG
QWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFS
SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPI
IARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS
YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVT
TQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVV
NSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

FIG. 9

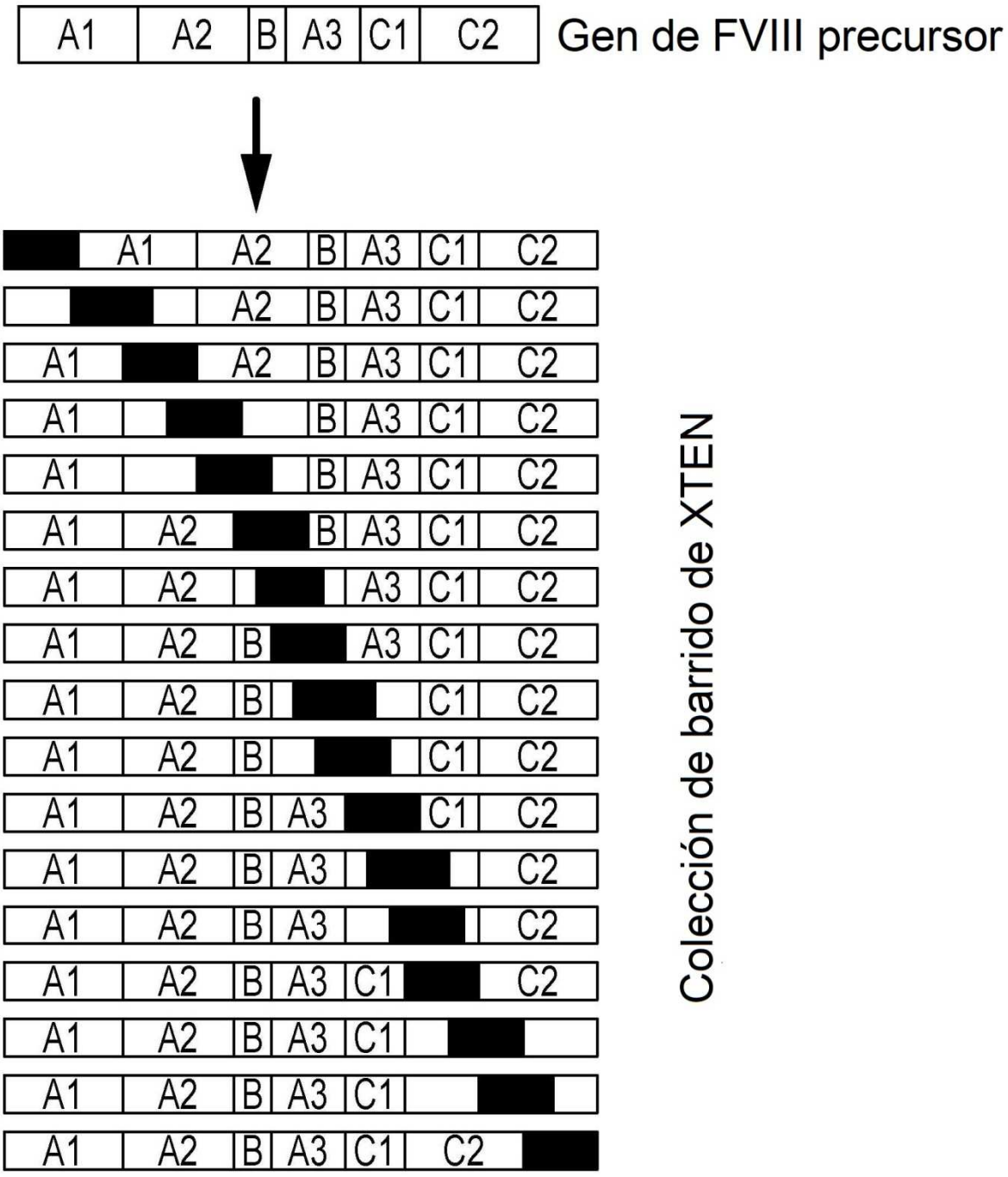

A1 A2 B A3 C1 C2
Gen de FVIII precursor
Colección de barrido de XTEN

FIG. 10

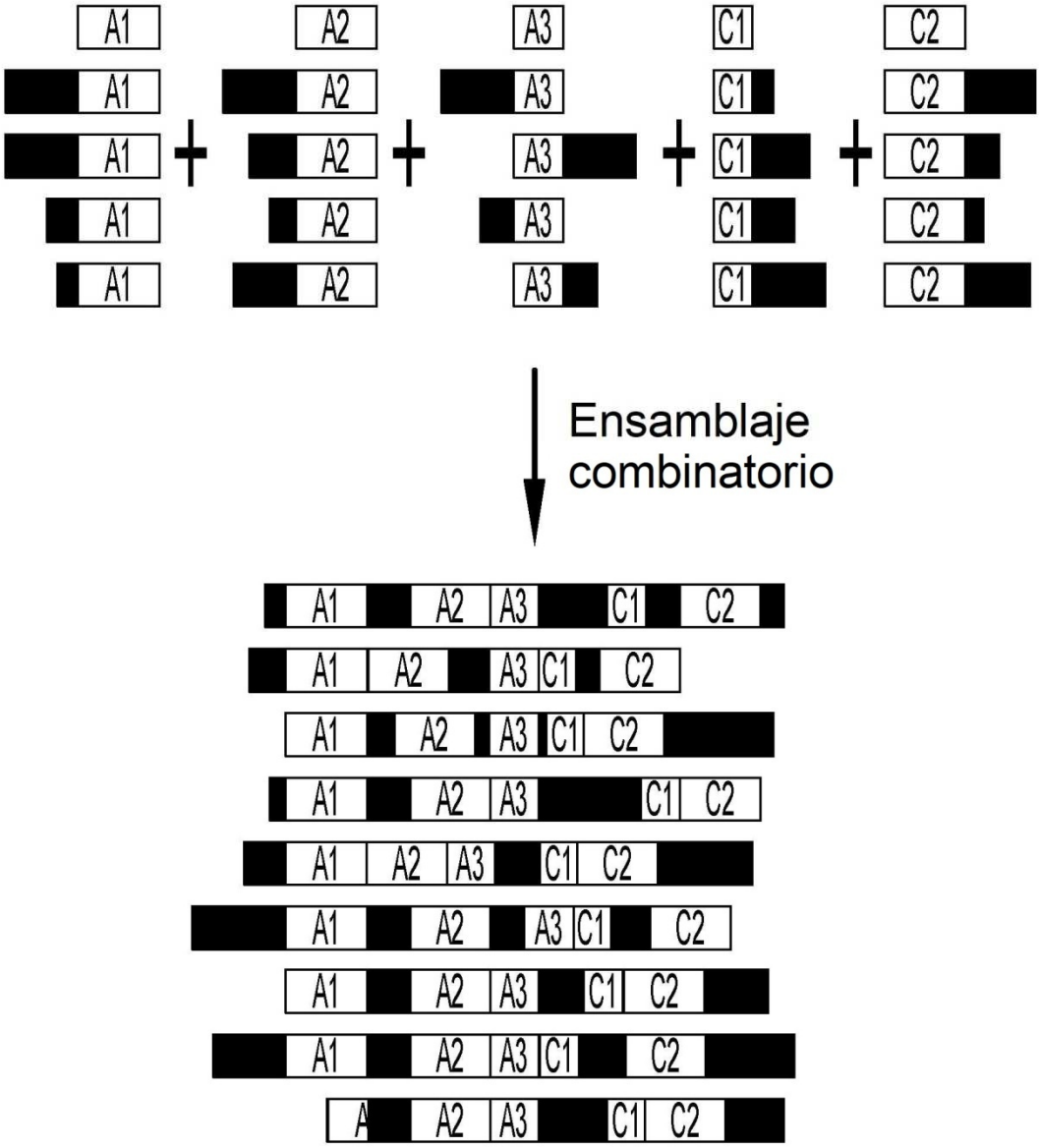


FIG. 11

FIG. 12A

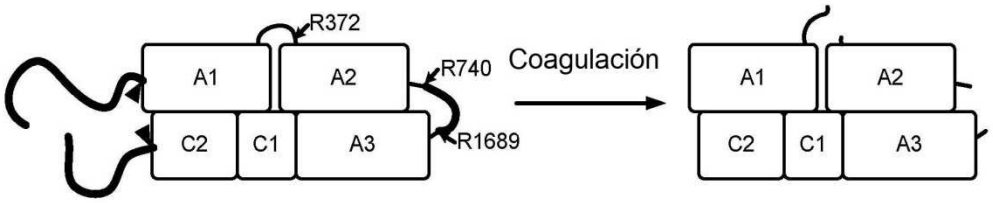


FIG. 12B

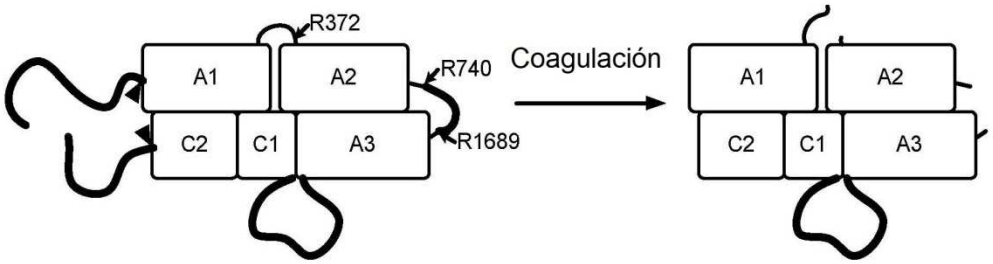


FIG. 12C

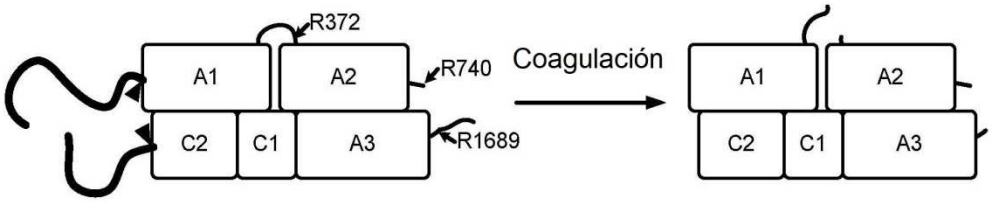


FIG. 12D

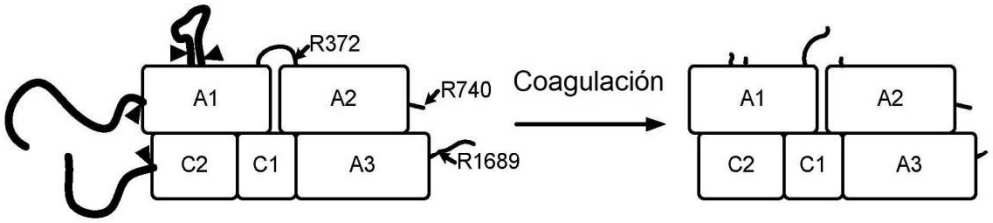


FIG. 12

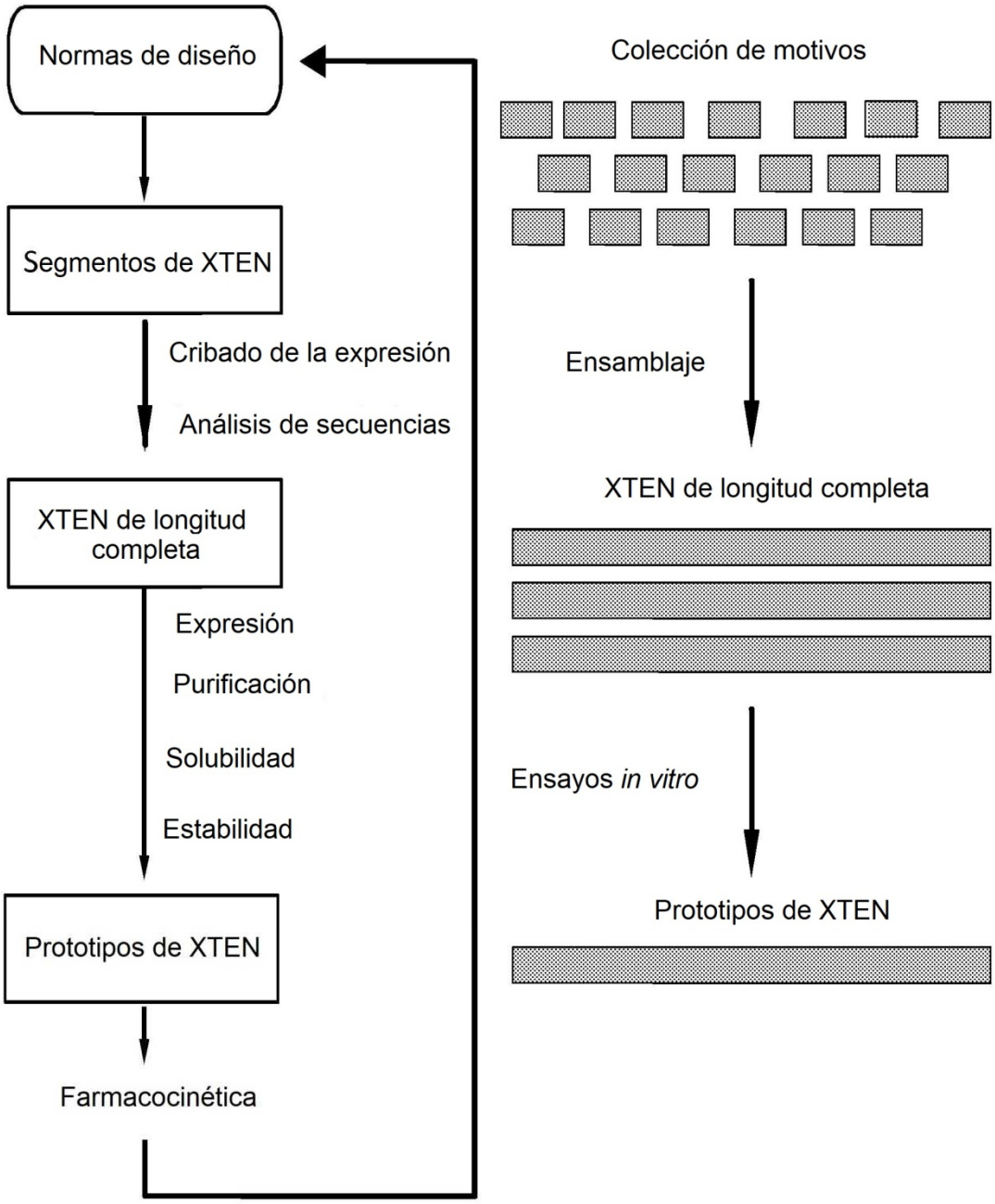

Normas de diseño
Segmentos de XTEN
Cribado de la expresión
Análisis de secuencias
XTEN de longitud completa
Expresión
Purificación
Solubilidad
Estabilidad
Prototipos de XTEN
Farmacocinética
Colección de motivos
Ensamblaje
XTEN de longitud completa
Ensayos *in vitro*
Prototipos de XTEN

FIG. 13

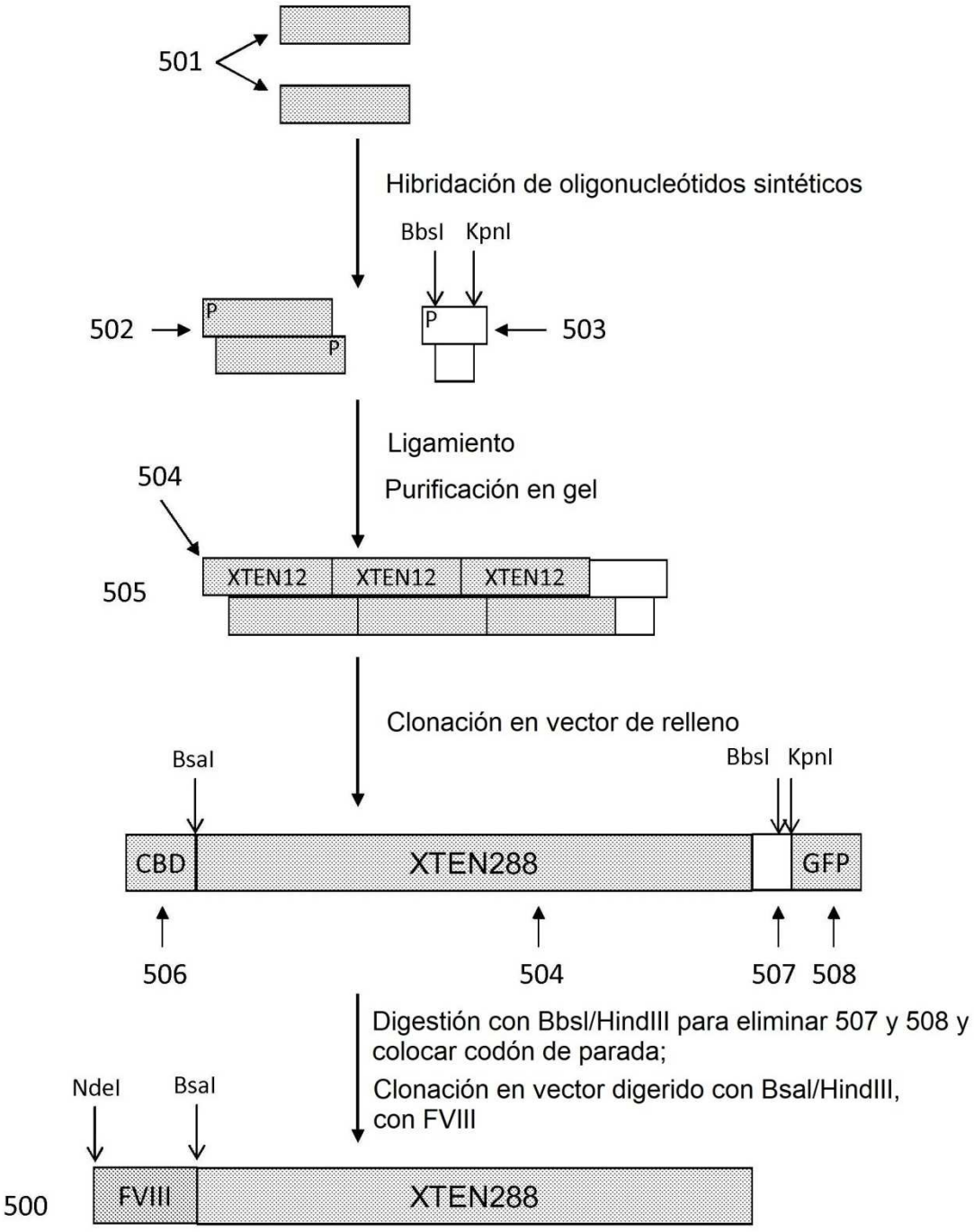

501
Hibridación de oligonucleótidos sintéticos
BbsI
KpnI
502
P
P
P
503
Ligamiento
Purificación en gel
504
505
XTEN12
XTEN12
XTEN12
Clonación en vector de relleno
BsaI
BbsI
KpnI
CBD
XTEN288
GFP
506
504
507
508
Digestión con BbsI/HindIII para eliminar 507 y 508 y colocar codón de parada;
Clonación en vector digerido con BsaI/HindIII, con FVIII
NdeI
BsaI
500
FVIII
XTEN288

FIG. 14

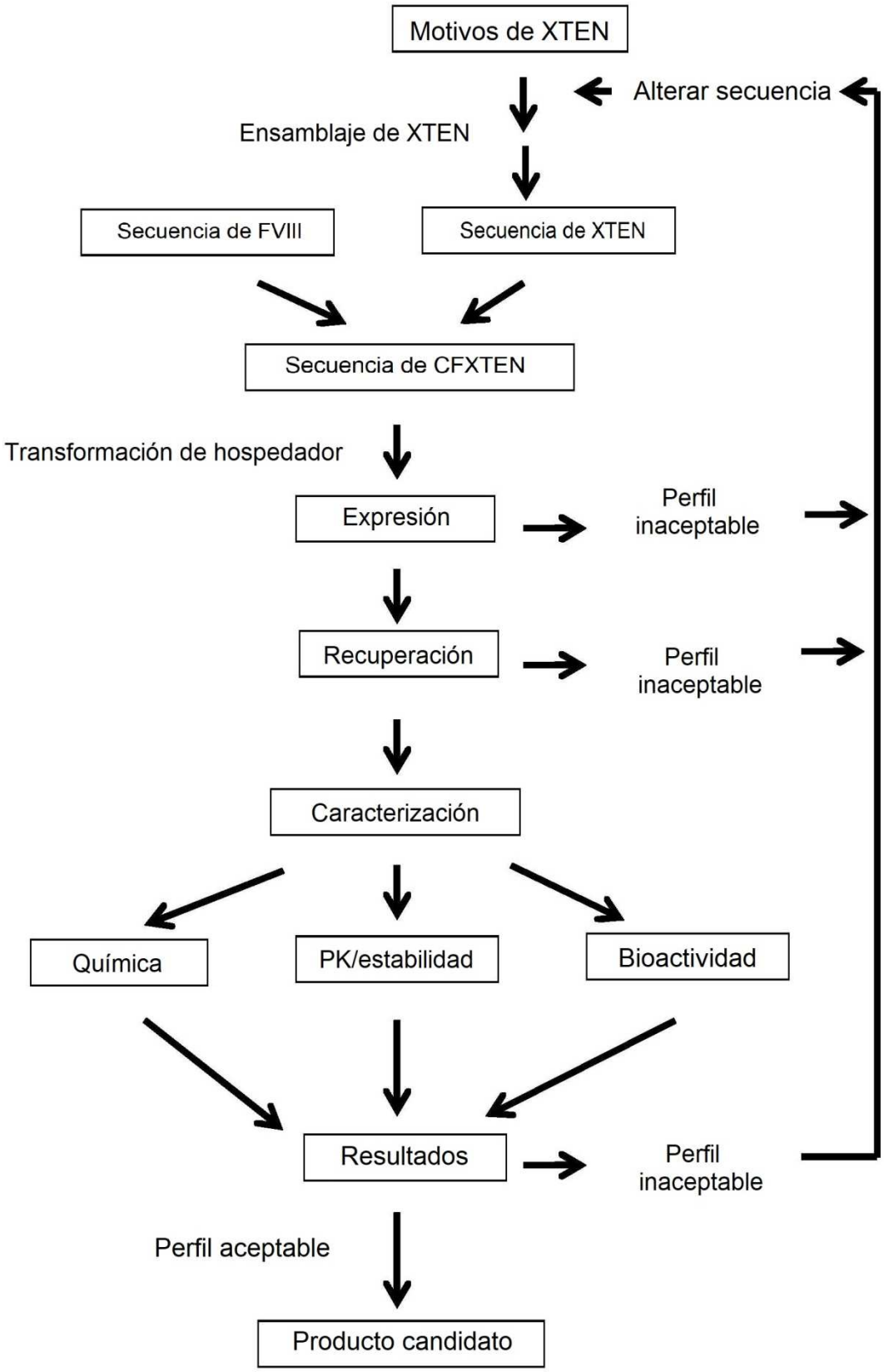

Motivos de XTEN
Alterar secuencia
Ensamblaje de XTEN
Secuencia de FVIII
Secuencia de XTEN
Secuencia de CFXTEN
Transformación de hospedador
Expresión
Perfil inaceptable
Recuperación
Perfil inaceptable
Caracterización
Química
PK/estabilidad
Bioactividad
Resultados
Perfil inaceptable
Perfil aceptable
Producto candidato

FIG. 15

AG864_2

GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS
SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST
GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA
TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT
ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG
TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP
SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST
PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS
PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS
STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG
SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP
GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS
PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS
SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

AG576

PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG
SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS
SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA
SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG
ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS
GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG
TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST
PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS
TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS
STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS

FIG. 16A

AG864_2

GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS
SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST
GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA
TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT
ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG
TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP
SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST
PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS
PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS
STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG
SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP
GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS
PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS
SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

AG288_1

PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA
SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS
ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS
SPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGS
PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA
TGS

FIG. 16B

AG864_2

GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS
SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST
GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA
TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT
ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG
TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP
SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST
PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS
PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS
STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG
SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP
GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS
PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS
SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

AG144_2

PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST
GTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPG
TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS

FIG. 16C

AE864

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST
EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG
SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG
SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP
TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP
SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG
SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP
AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS
EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE
GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG
PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

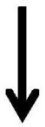
AE576

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG
SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS
PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS
TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP
GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE
SGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP
SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS
TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE
SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP
SEGSAP

FIG. 16D

AE864

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST
EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG
SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG
SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP
TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP
SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG
SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP
AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS
EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE
GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG
PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP



AE288_2

GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE
SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA
TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS
ESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE
GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG
SAP

FIG. 16E

AE864

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS
APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT
STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP
SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS
PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP
ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS
PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE
SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT
STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP
GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES
GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE
GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

AE144_1A

SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS
TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG

AE144_2B

TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG
SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG

AE144_3A

SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA
PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG
SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG

AE144_4B

TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS
TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG

FIG. 16F

FIG. 17A

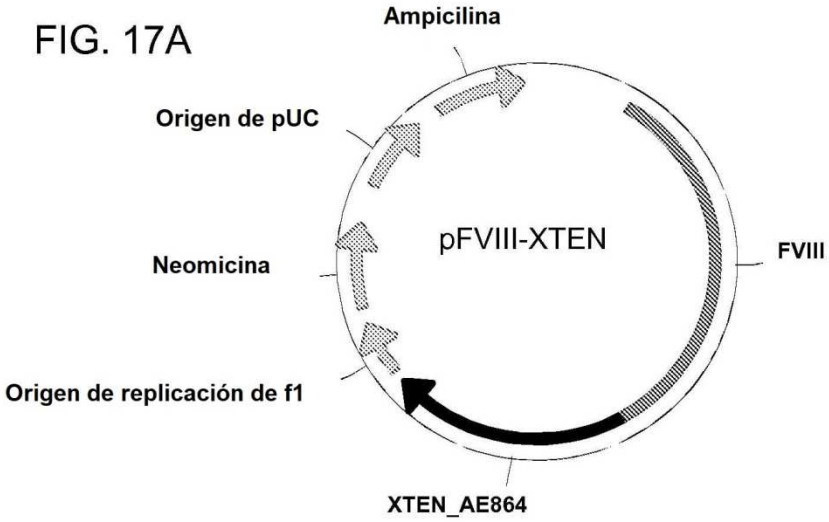


FIG. 17B

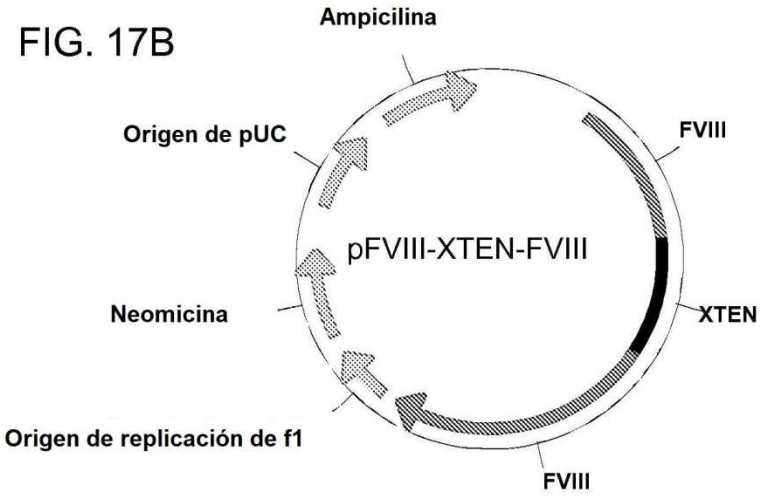


FIG. 17C

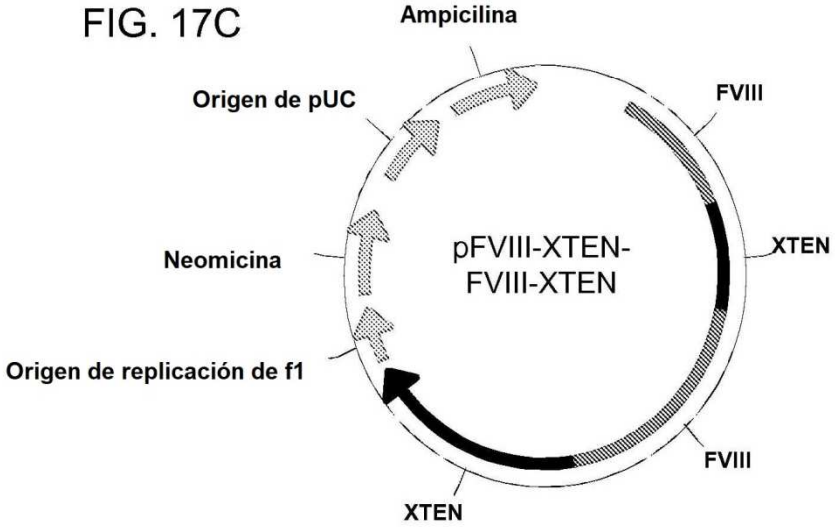


FIG. 17

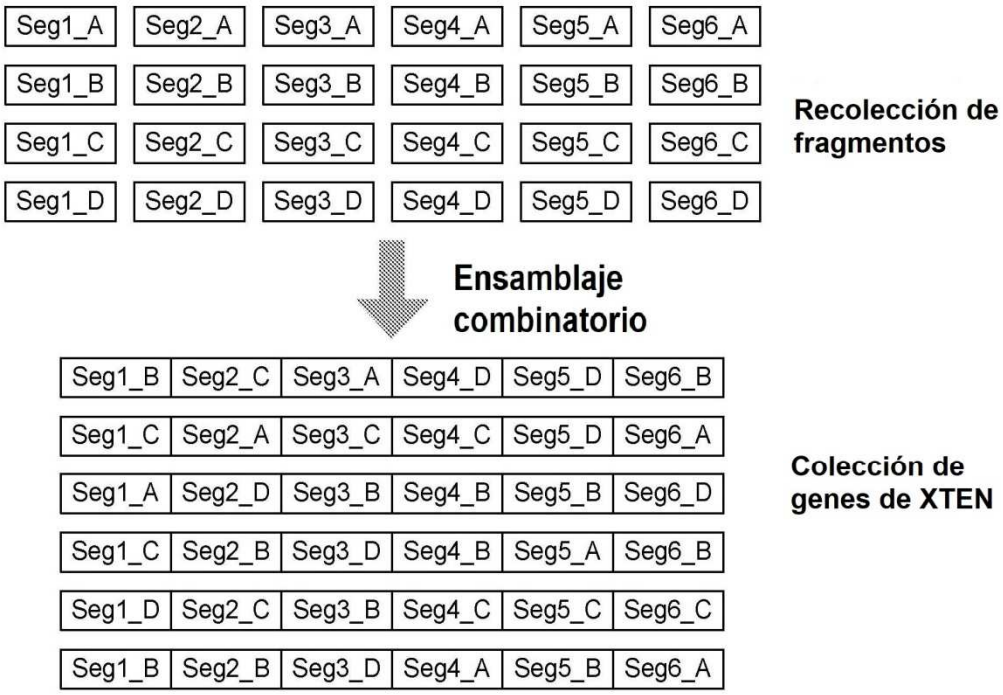

Seg1_A Seg2_A Seg3_A Seg4_A Seg5_A Seg6_A
Seg1_B Seg2_B Seg3_B Seg4_B Seg5_B Seg6_B
Seg1_C Seg2_C Seg3_C Seg4_C Seg5_C Seg6_C
Seg1_D Seg2_D Seg3_D Seg4_D Seg5_D Seg6_D
Recolección de fragmentos
Ensamblaje combinatorio
Seg1_B Seg2_C Seg3_A Seg4_D Seg5_D Seg6_B
Seg1_C Seg2_A Seg3_C Seg4_C Seg5_D Seg6_A
Seg1_A Seg2_D Seg3_B Seg4_B Seg5_B Seg6_D
Seg1_C Seg2_B Seg3_D Seg4_B Seg5_A Seg6_B
Seg1_D Seg2_C Seg3_B Seg4_C Seg5_C Seg6_C
Seg1_B Seg2_B Seg3_D Seg4_A Seg5_B Seg6_A
Colección de genes de XTEN

FIG. 18

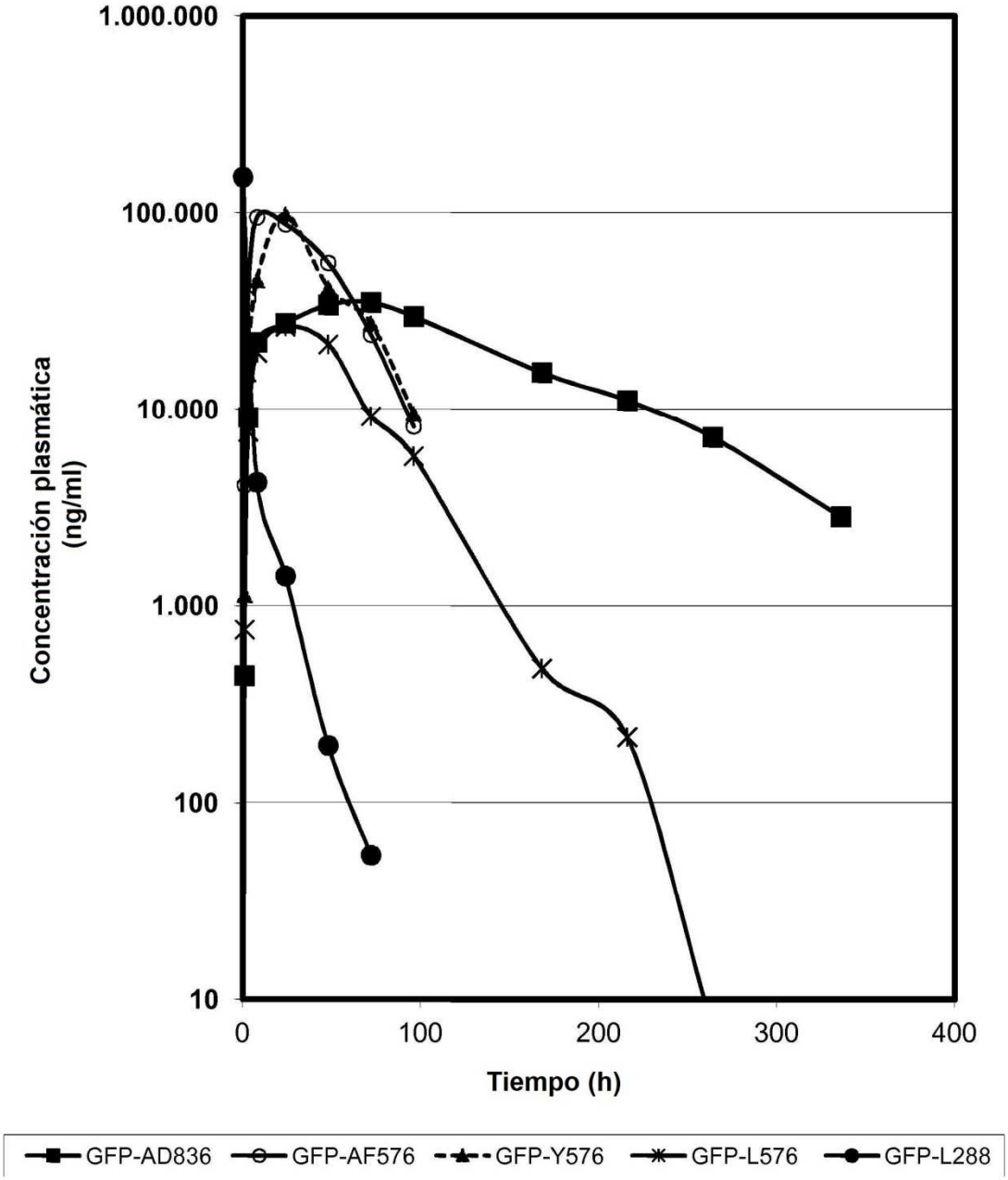

1.000.000
100.000
10.000
1.000
100
10
Concentración plasmática (ng/ml)
0
100
200
300
400
Tiempo (h)
GFP-AD836
GFP-AF576
GFP-Y576
GFP-L576
GFP-L288

FIG. 19

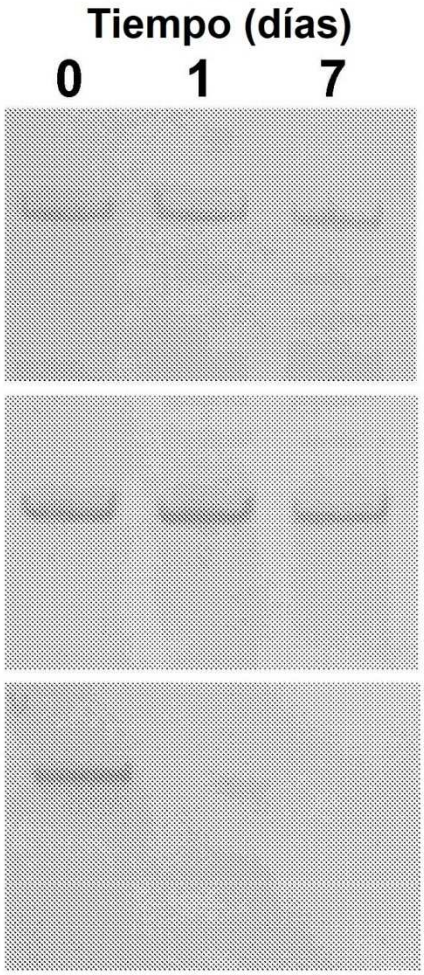


FIG. 18A

Plasma de mono

FIG. 18B

***In vivo* en mono**

FIG. 18C

Homogeneizado de riñón

FIG. 20

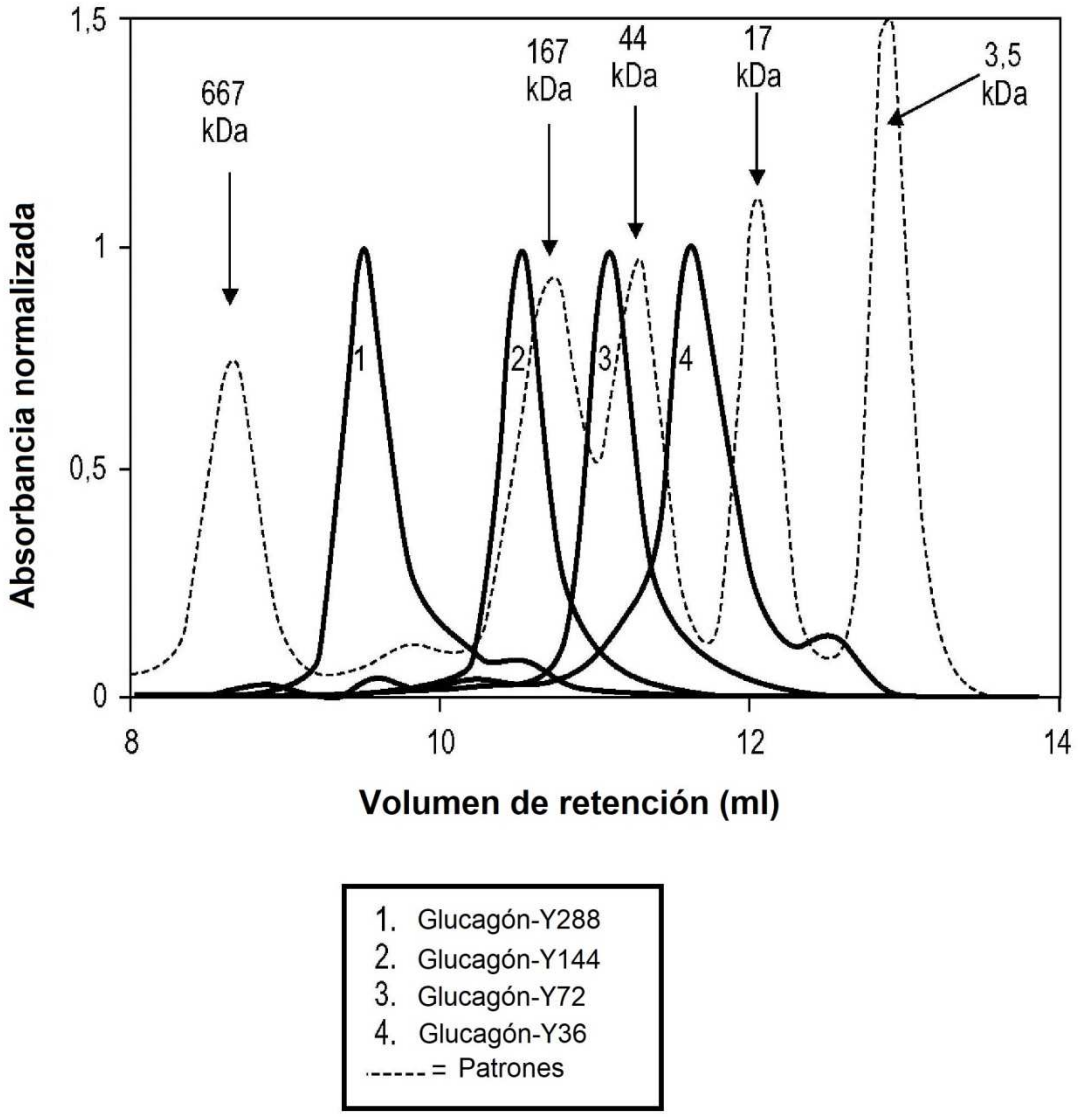

1,5
1
0,5
0
Absorbancia normalizada
667 kDa
167 kDa
44 kDa
17 kDa
3,5 kDa
1
2
3
4
8
10
12
14
Volumen de retención (ml)
1. Glucagón-Y288
2. Glucagón-Y144
3. Glucagón-Y72
4. Glucagón-Y36
----- = Patrones

FIG. 21

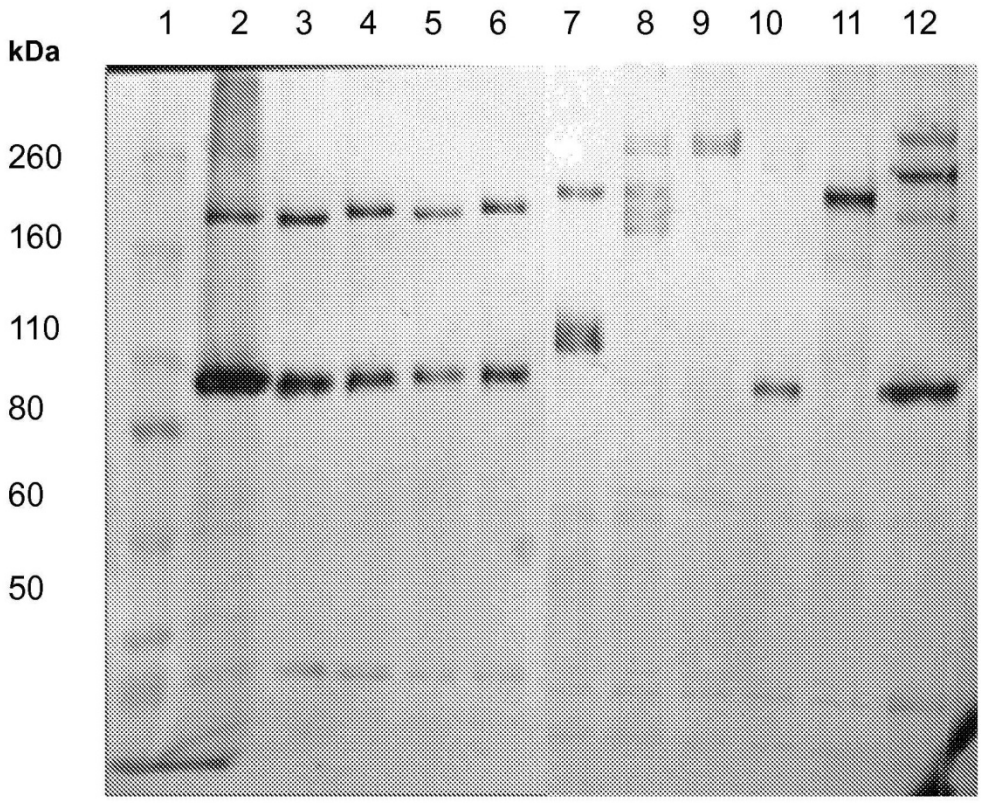


FIG. 22

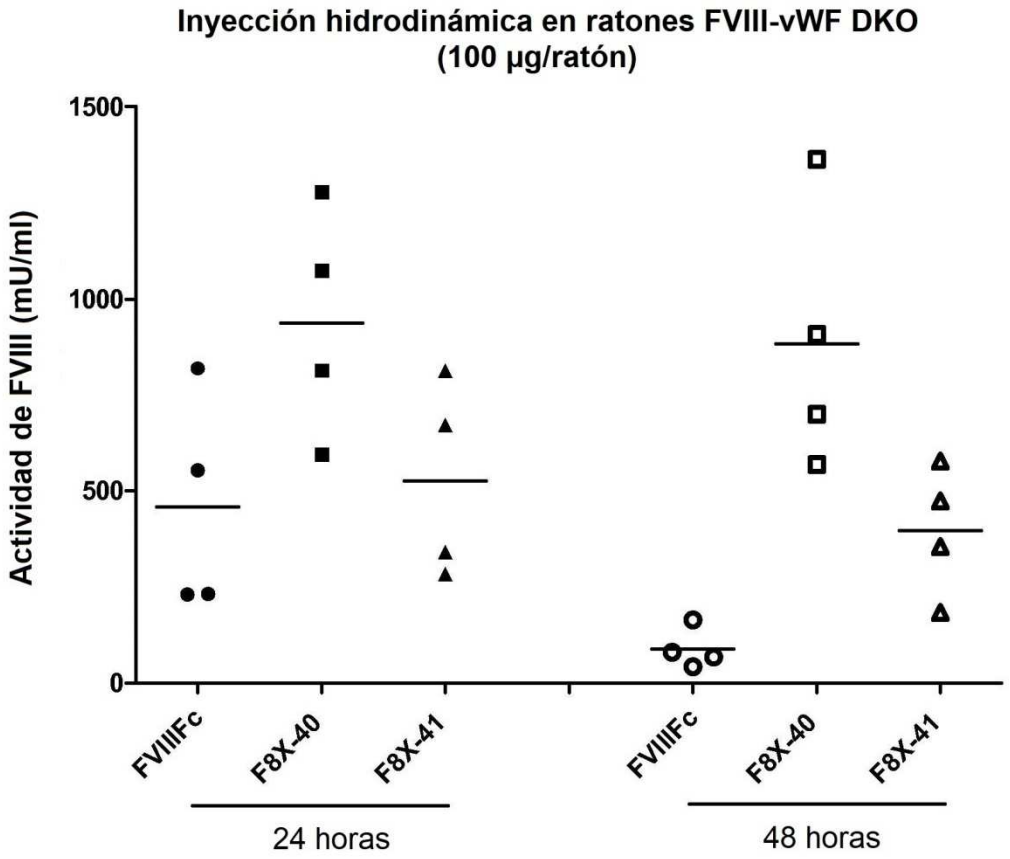

Inyección hidrodinámica en ratones FVIII-vWF DKO
(100 µg/ratón)
Actividad de FVIII (mU/ml)
1500
1000
500
0
FVIIIFc
F8X-40
F8X-41
FVIIIFc
F8X-40
F8X-41
24 horas
48 horas

FIG. 23

Fig. 24A

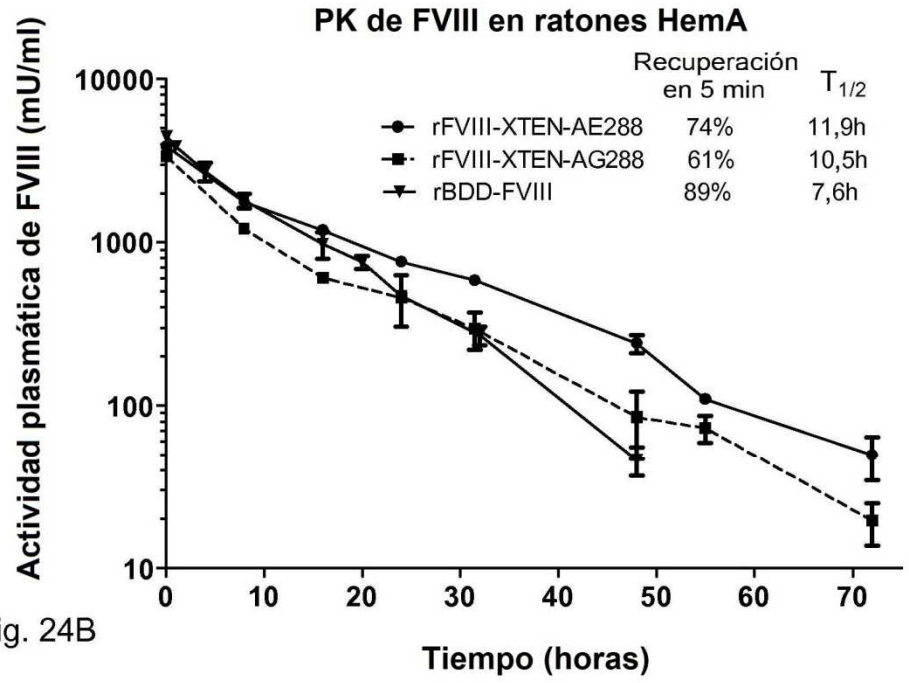


Fig. 24B

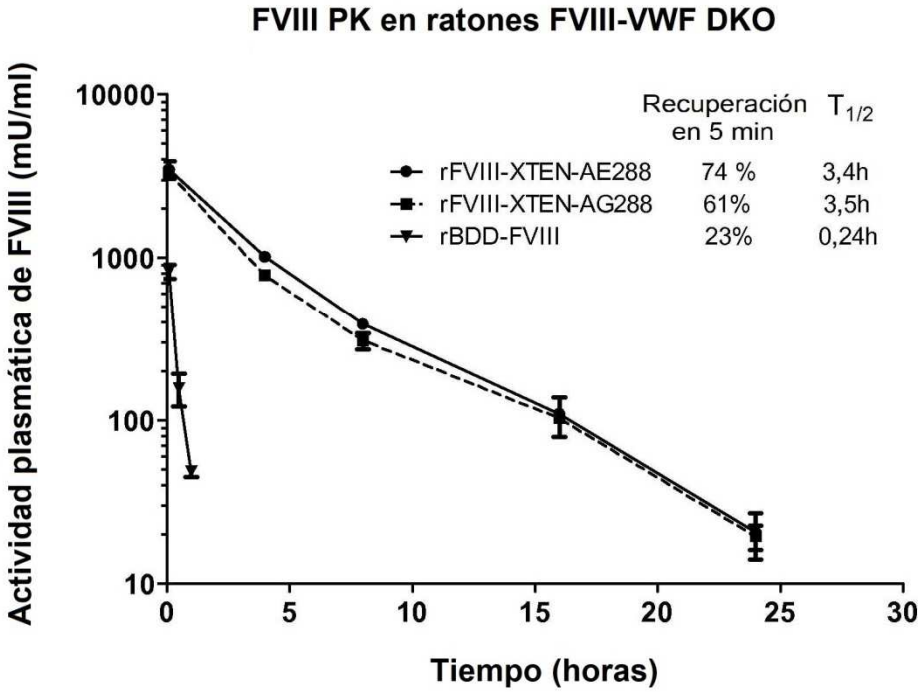


FIG. 24

Fig. 25A

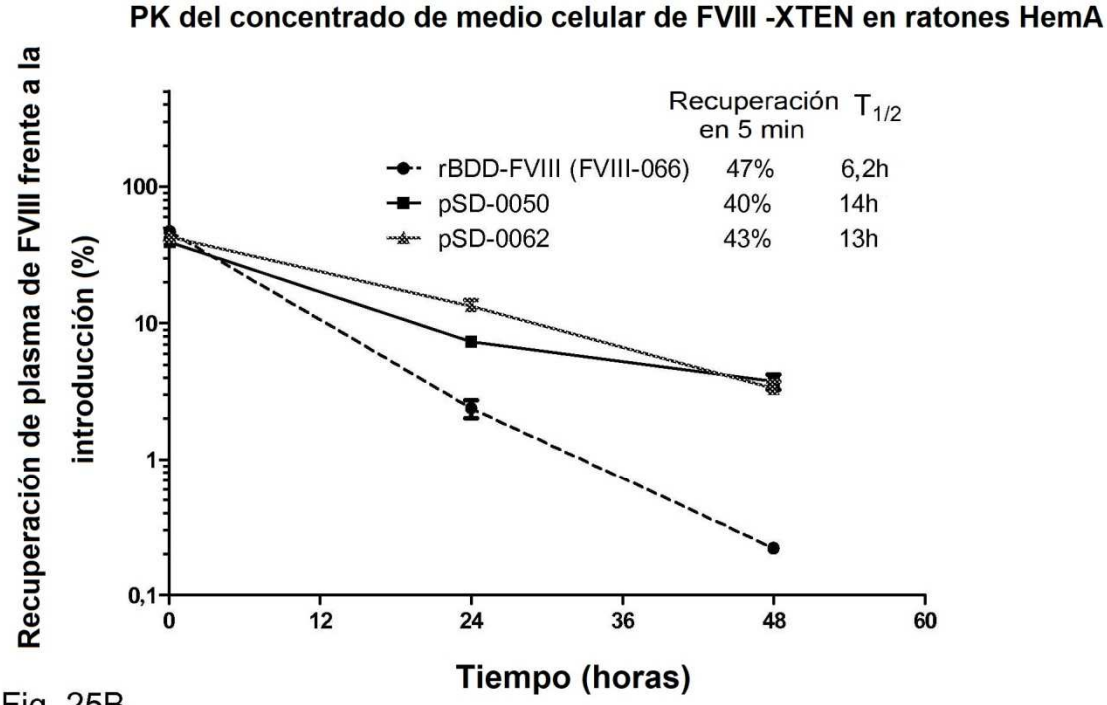


Fig. 25B

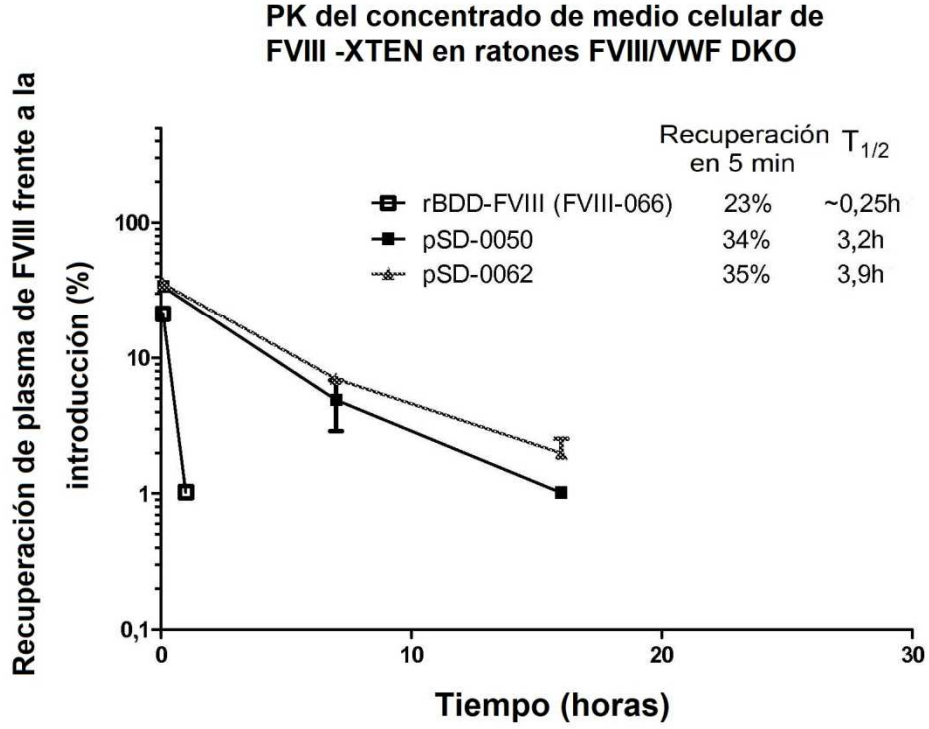


FIG. 25

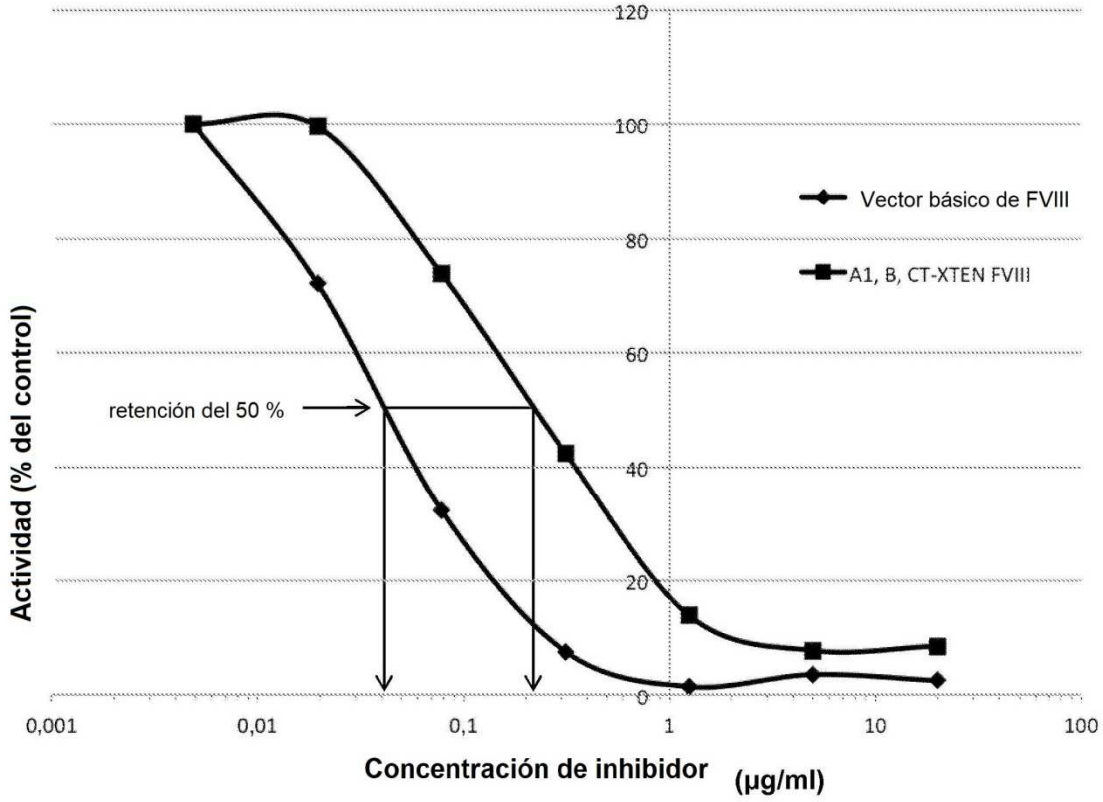

120
100
80
60
40
20
0
Actividad (% del control)
retención del 50 %
Vector básico de FVIII
A1, B, CT-XTEN FVIII
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Concentración de inhibidor (µg/ml)

FIG. 26

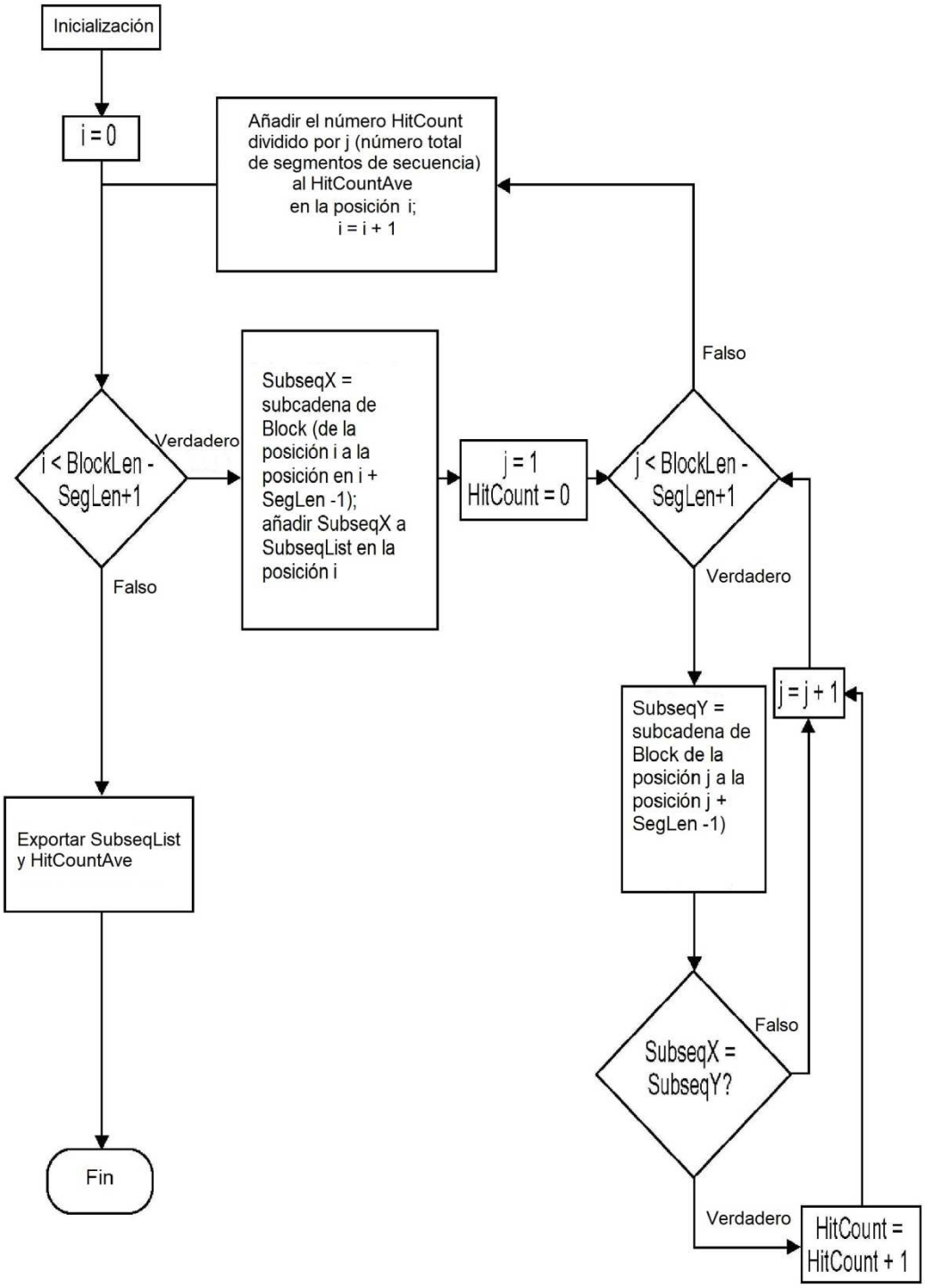

Inicialización
i = 0
Añadir el número HitCount dividido por j (número total de segmentos de secuencia) al HitCountAve en la posición i;
i = i + 1
i < BlockLen - SegLen+1
Verdadero
Falso
SubseqX = subcadena de Block (de la posición i a la posición en i + SegLen -1); añadir SubseqX a SubseqList en la posición i
j = 1
HitCount = 0
j < BlockLen - SegLen+1
Falso
Verdadero
SubseqY = subcadena de Block de la posición j a la posición j + SegLen -1)
j = j + 1
SubseqX = SubseqY?
Falso
Verdadero
HitCount = HitCount + 1
Exportar SubseqList y HitCountAve
Fin

FIG. 27

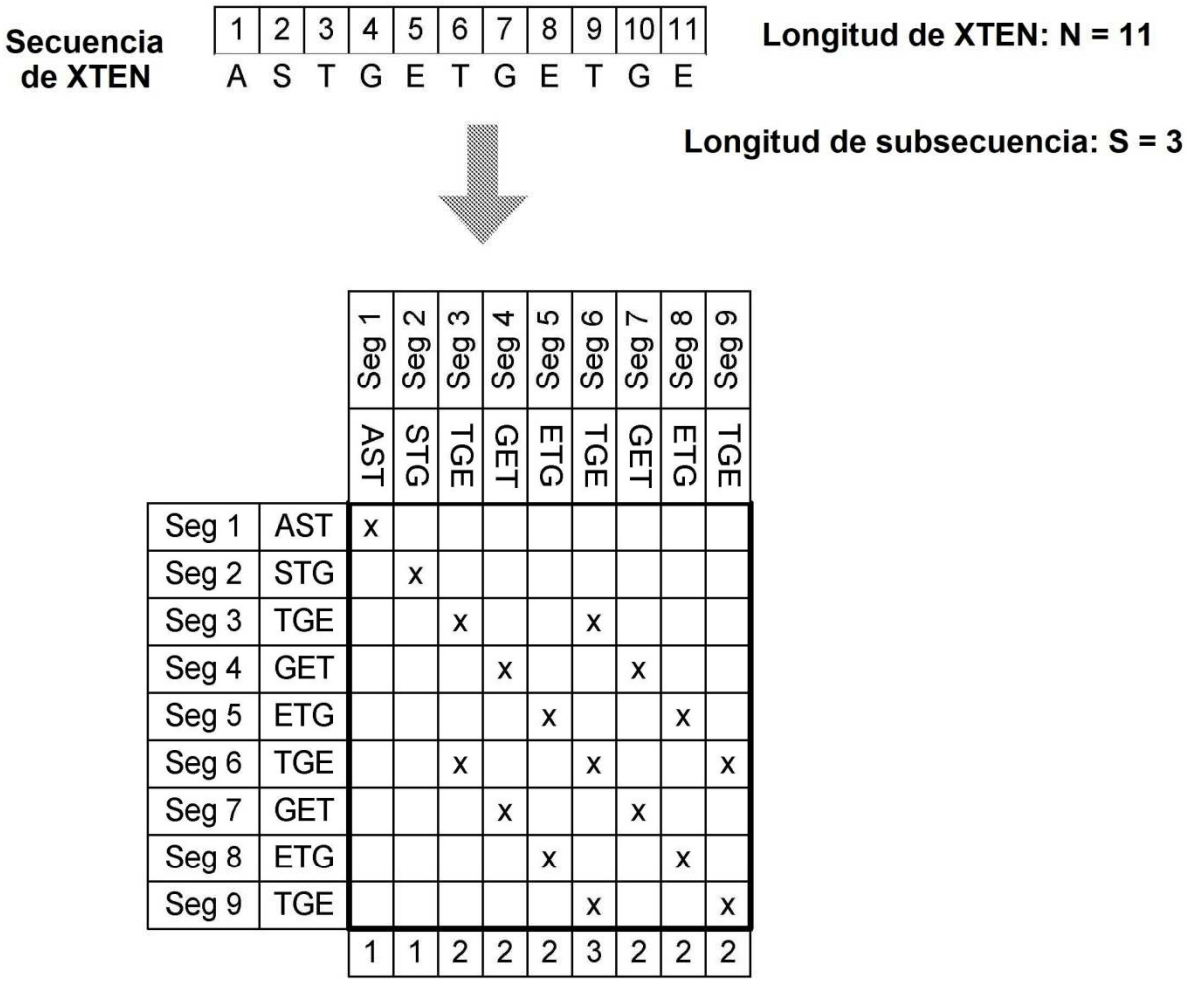

Secuencia de XTEN
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
A S T G E T G E T G E
Longitud de XTEN: N = 11
Longitud de subsecuencia: S = 3
Seg 1 Seg 2 Seg 3 Seg 4 Seg 5 Seg 6 Seg 7 Seg 8 Seg 9
AST STG TGE GET ETG TGE GET ETG TGE
Seg 1 AST x
Seg 2 STG x
Seg 3 TGE x x
Seg 4 GET x x
Seg 5 ETG x x
Seg 6 TGE x x x
Seg 7 GET x x
Seg 8 ETG x x
Seg 9 TGE x x
1 1 2 2 2 3 2 2 2
Puntuación de subsecuencia = 1,89

FIG. 28

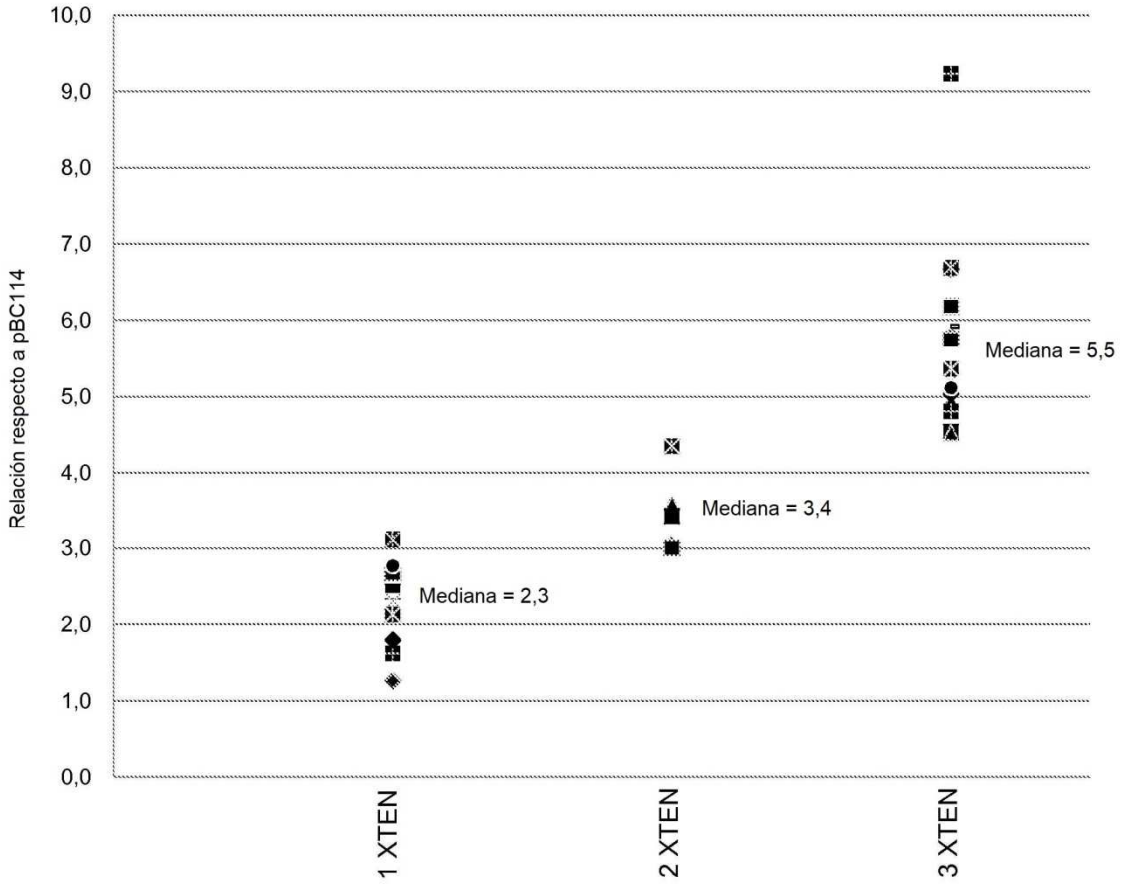

10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
Relación respecto a pBC114
Mediana = 2,3
Mediana = 3,4
Mediana = 5,5
1 XTEN
2 XTEN
3 XTEN

FIG. 29

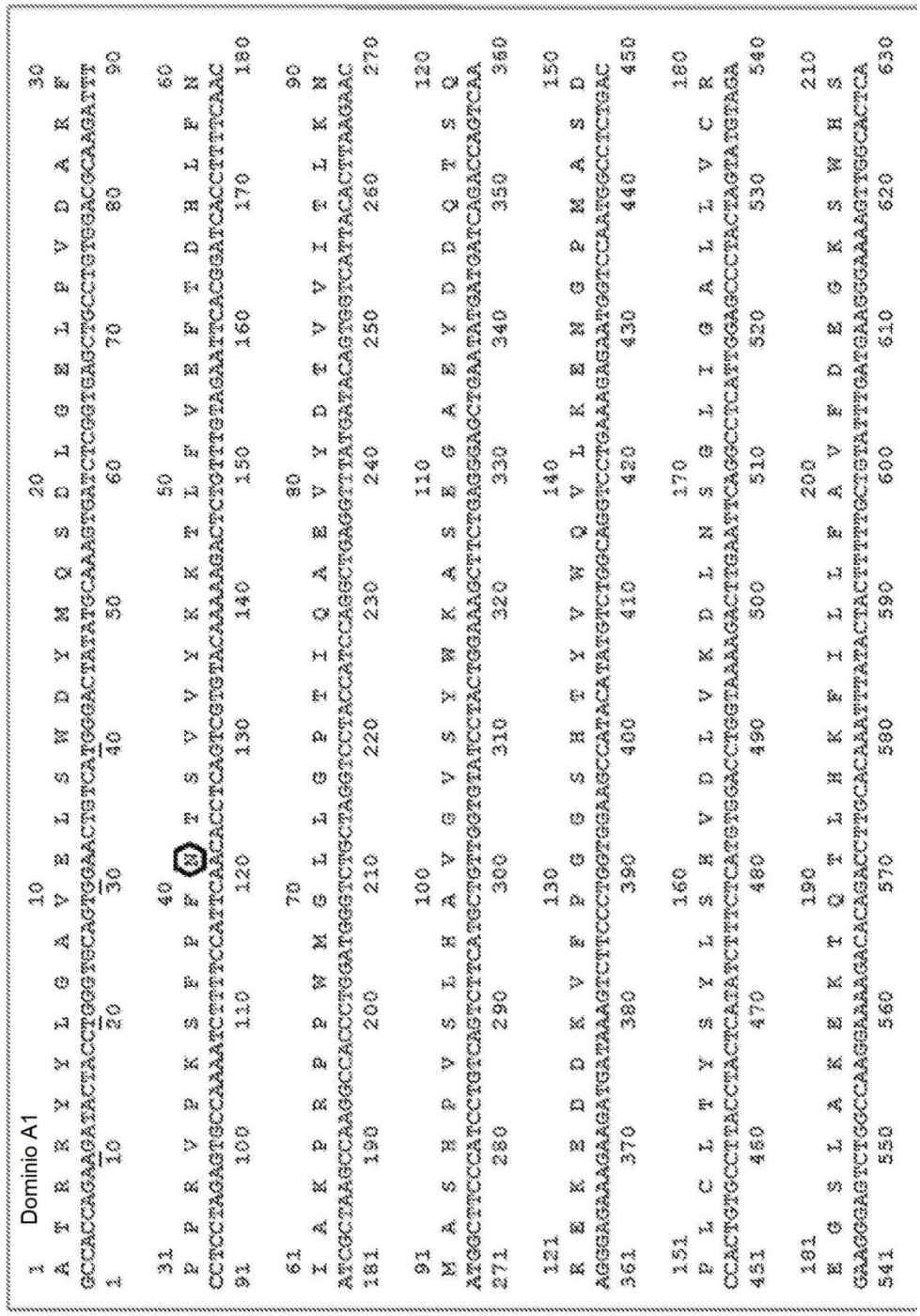


FIG. 30A

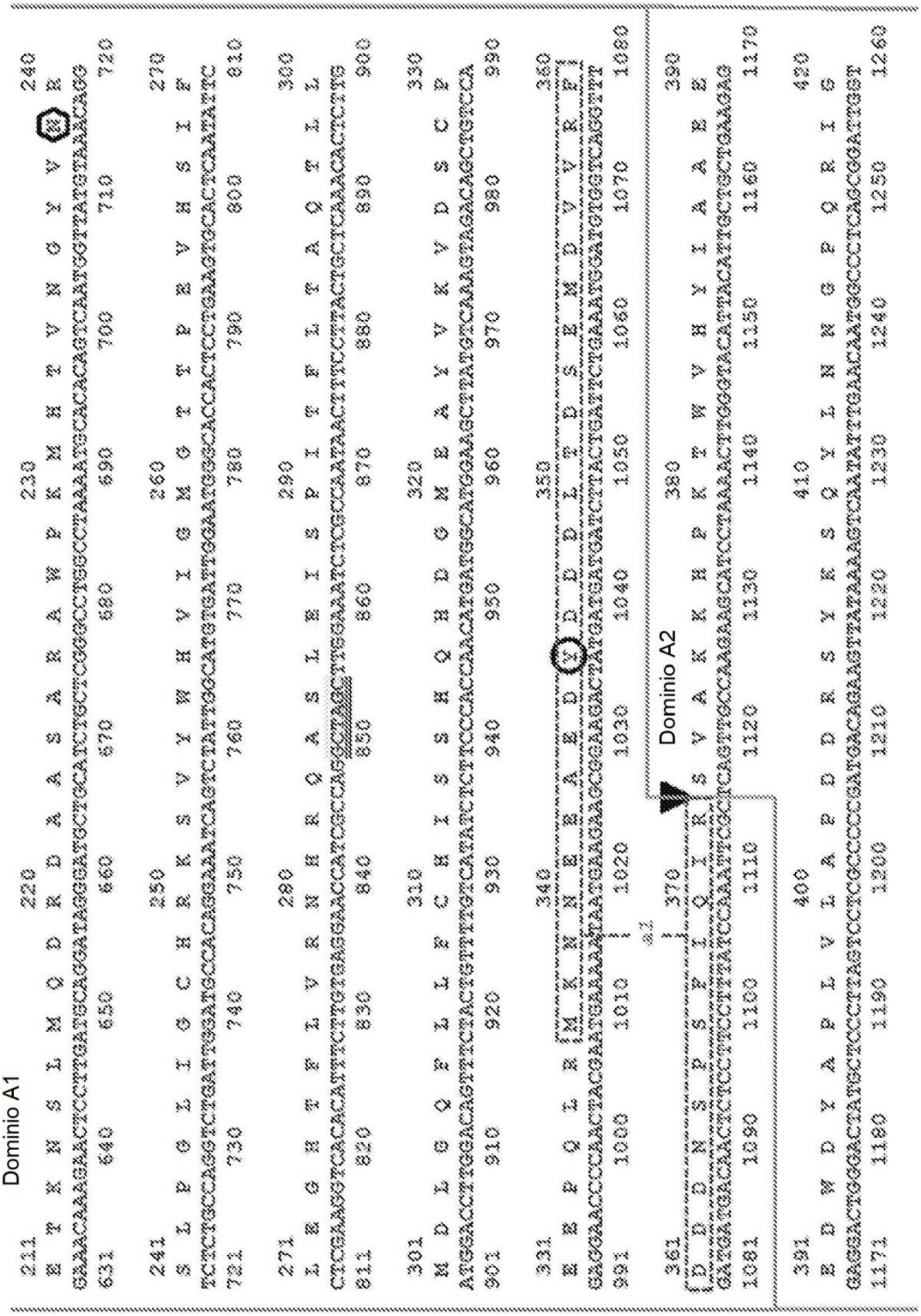


FIG. 30B

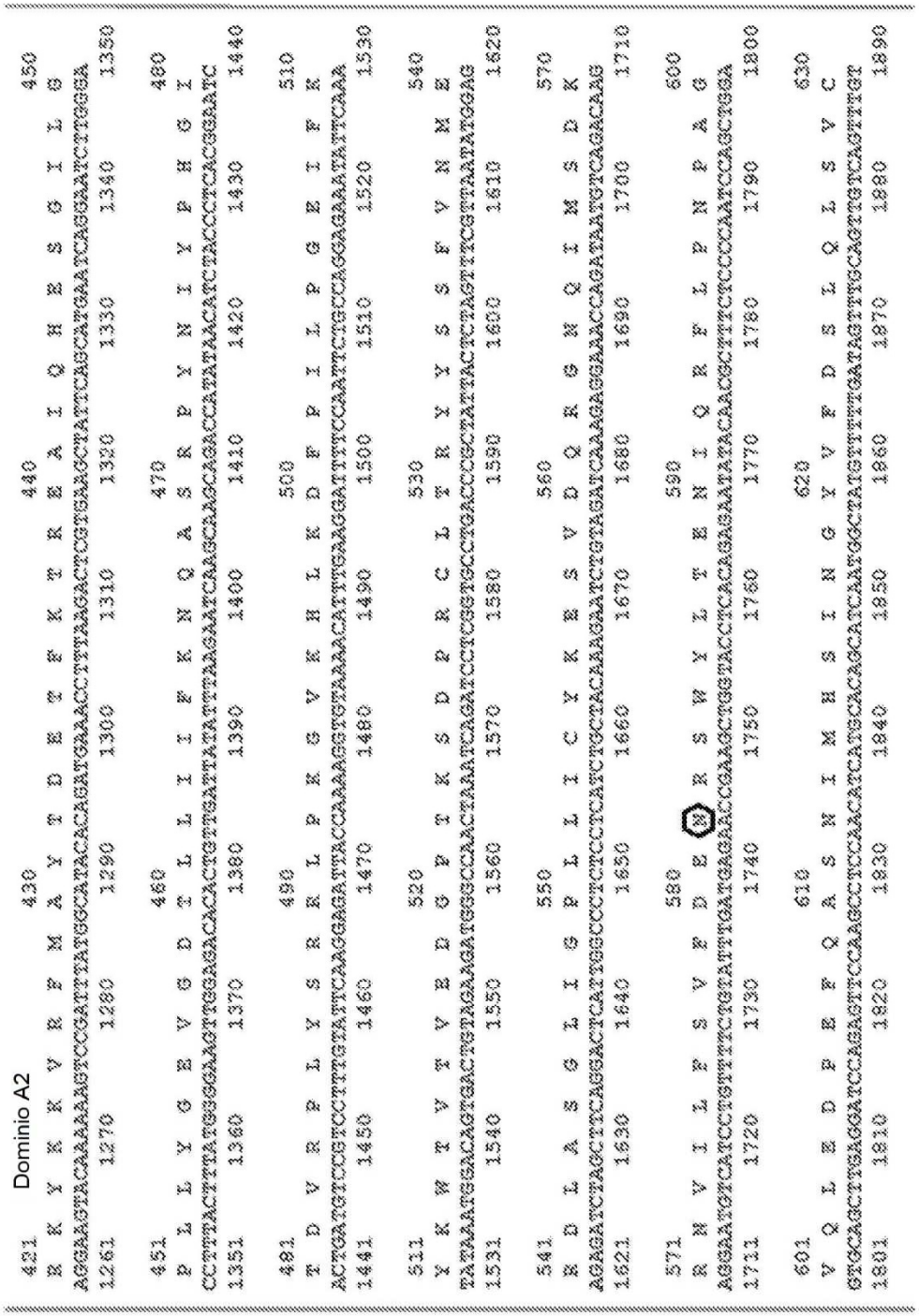


FIG. 30C

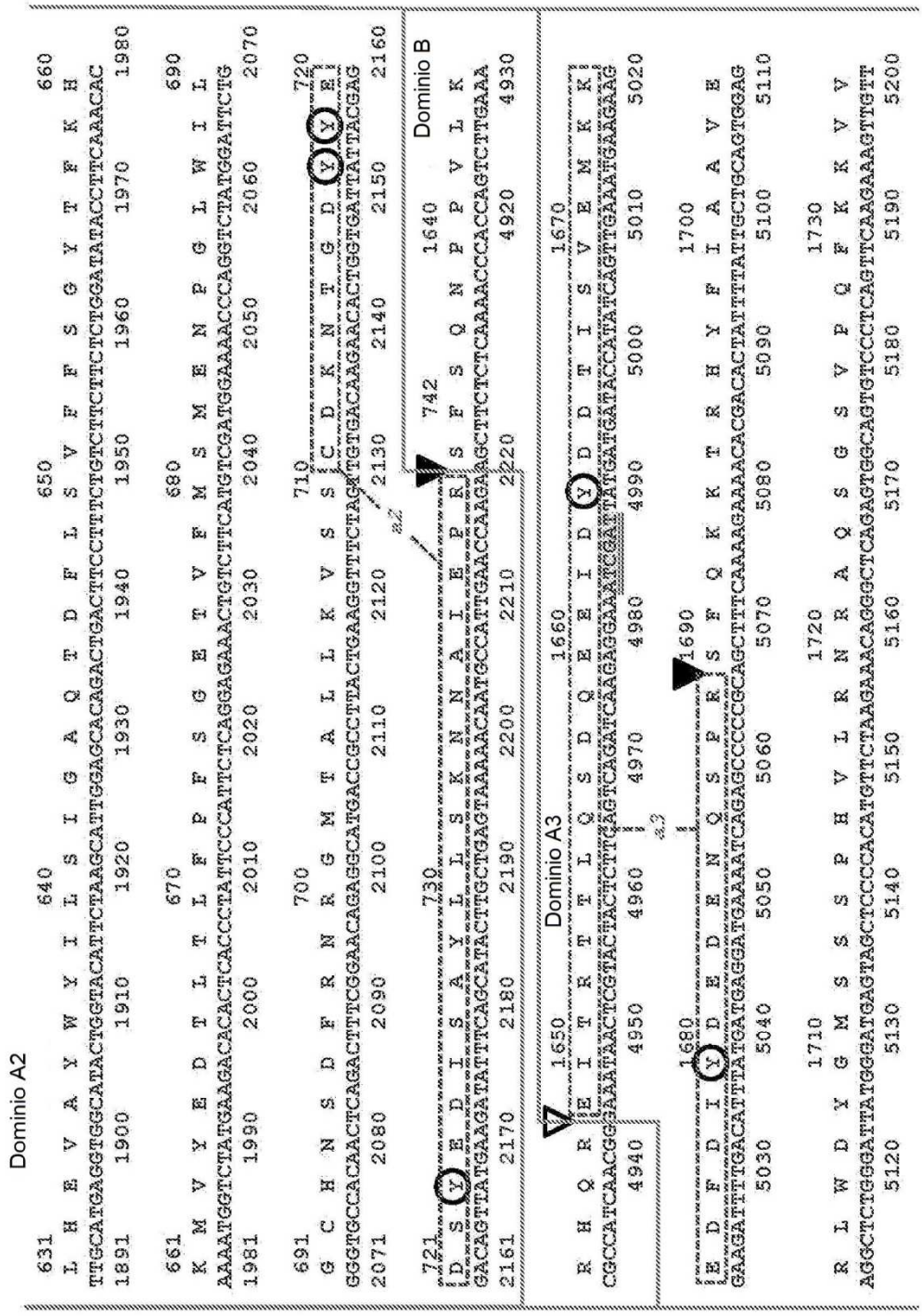


FIG. 30D

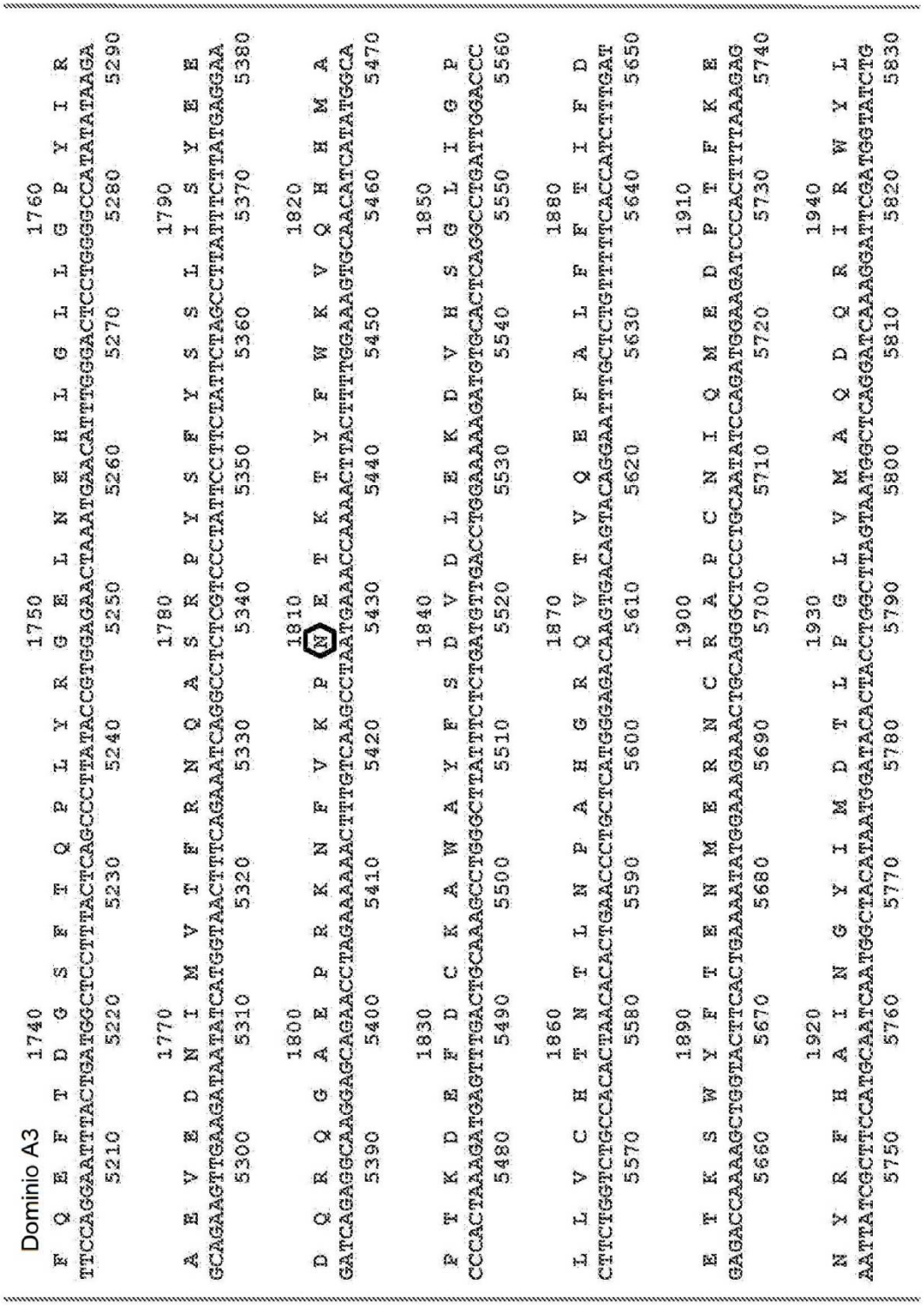

Dominio A3
1740
1750
1760
F Q E F T D G S F T Q P L Y R G E L N E H L G L L G P Y I R
TTCCAGGAATTTACTGATGGCTCCTTACTCAGCCCTTATACCGTGGAGAACTAAATGAACATTTGGGACTCCTGGGGCCATATATAGA
5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290
1770
1780
1790
A E V E D N I M V T F R N Q A S R P Y S F Y S S L I S Y E E
GCAGAAGTTGAAGATAATATCATGGTAACTTTCAGAAATCAGGCCTCTCGTCCCTATTCCTTCTATTCTAGCCTTATTTCTTATGAGAA
5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380
1800
1810
1820
D Q R Q G A E P R K N F V K P N E T K T Y F W K V Q H H M A
GATCAGAGGCAAGGAGCAGAACCTAGAAAAAACTTTGTCAAGCCTAATGAAACCAAAACTTACTTTTGGAAAGTGCAACATCATATGGCA
5390 5400 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470
1830
1840
1850
P T K D E F D C K A W A Y F S D V D L E K D V H S G L I G P
CCCACTAAAGATGAGTTTGACTGCAAAGCCTGGGCTTATTTCTCTGATGTTGACCTGGAAAAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCC
5480 5490 5500 5510 5520 5530 5540 5550 5560
1860
1870
1880
L L V C H T N T L N P A H G R Q V T V Q E F A L F F T I F D
CTTCTGGTCTGCCACACTAACACACTGAACCCTGCTCATGGGAGACAAGTGACAGGAATTTGCTCTGTTTTTCACCATCTTTGAT
5570 5580 5590 5600 5610 5620 5630 5640 5650
1890
1900
1910
E T K S W Y F T E N M E R N C R A P C N I Q M E D P T F K E
GAGACCAAAAGCTGGTACTTCACTGAAAATATGGAAAGAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATGGAAGATCCCCACTTTTAAAGAG
5660 5670 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740
1920
1930
1940
N Y R F H A I N G Y I M D T L P G L V M A Q D Q R I R W Y L
AATTATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTACATAATGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGATTCGATGGTATCTG
5750 5760 5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830

FIG. 30E

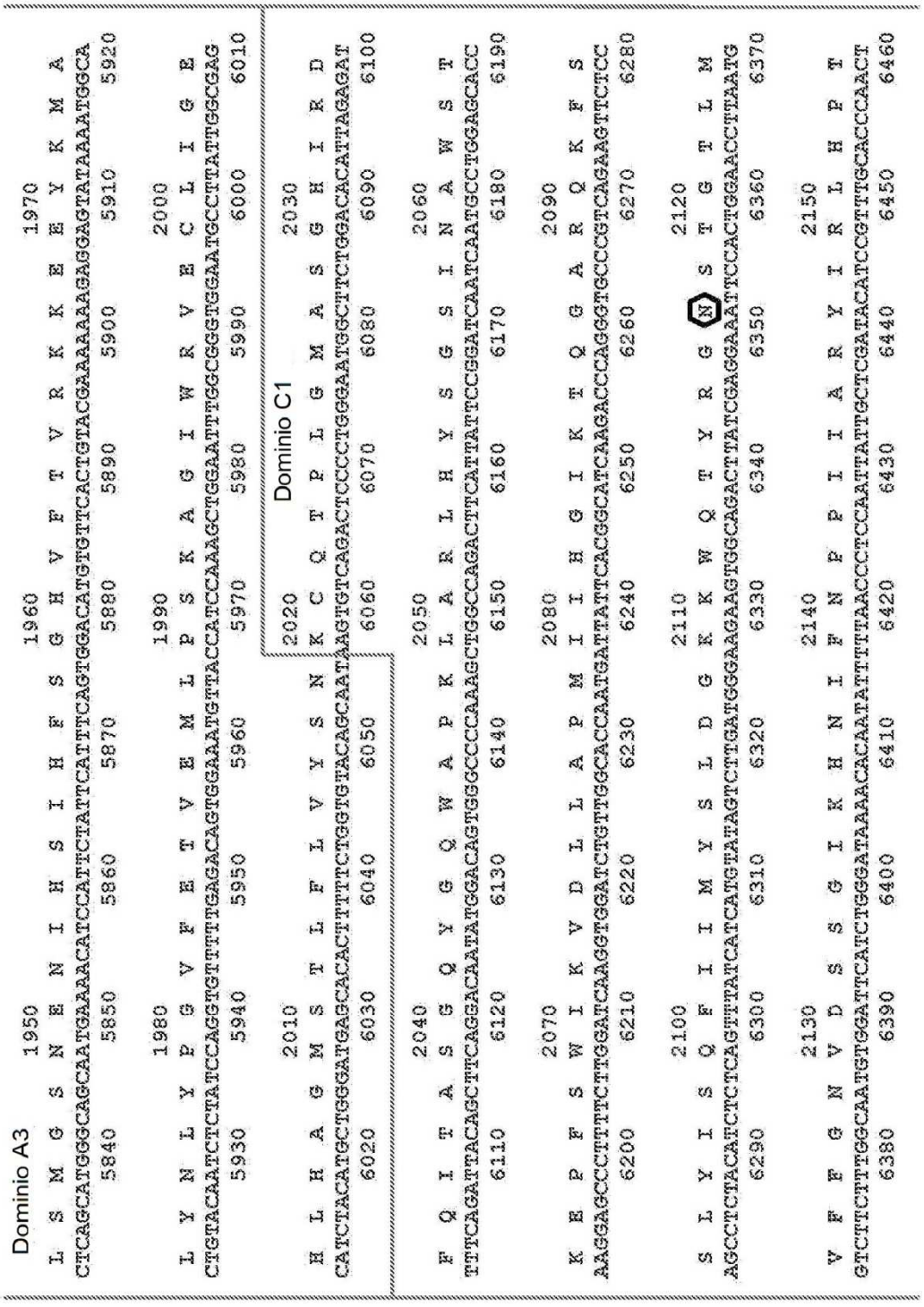


FIG. 30F

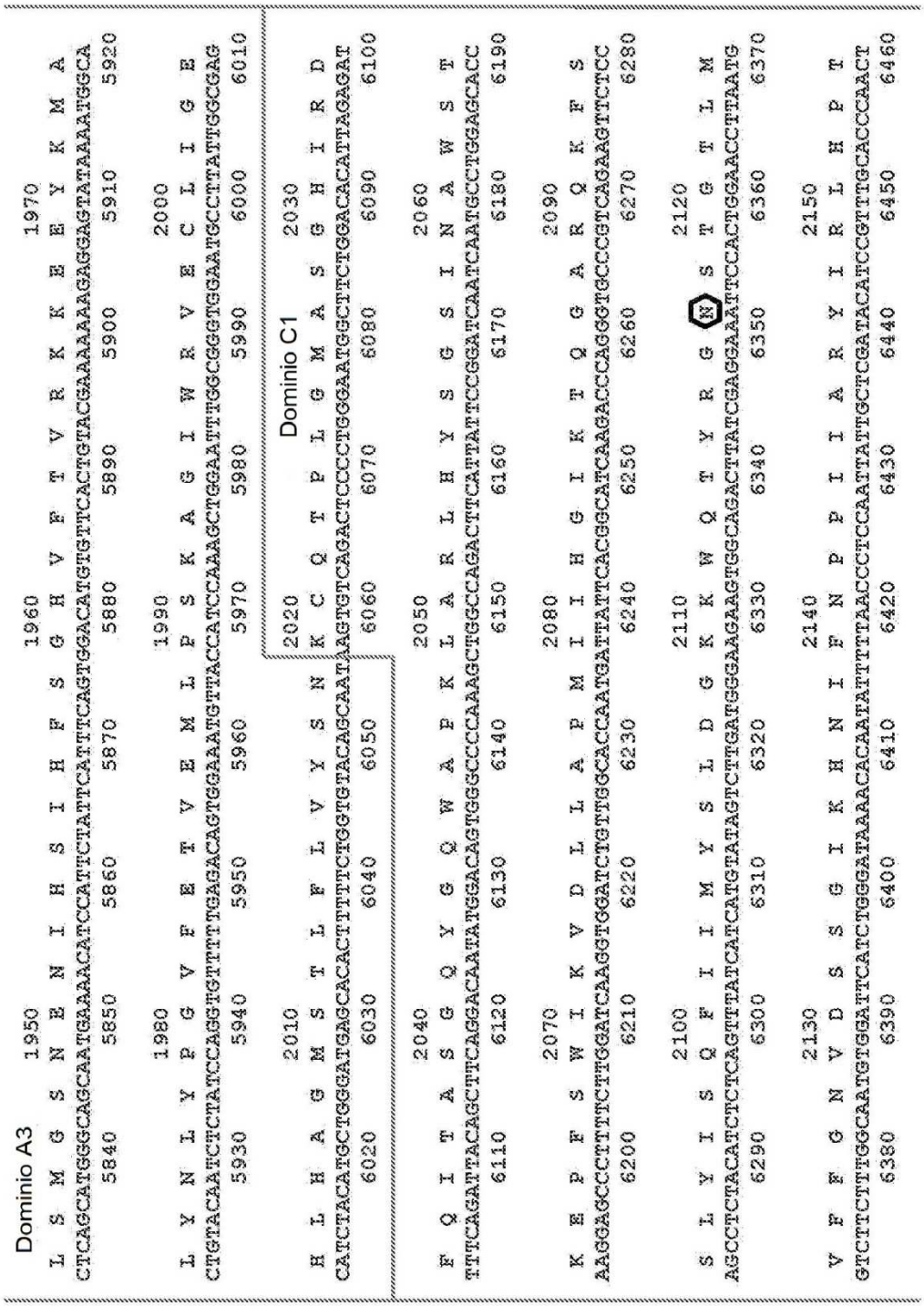


FIG. 30G

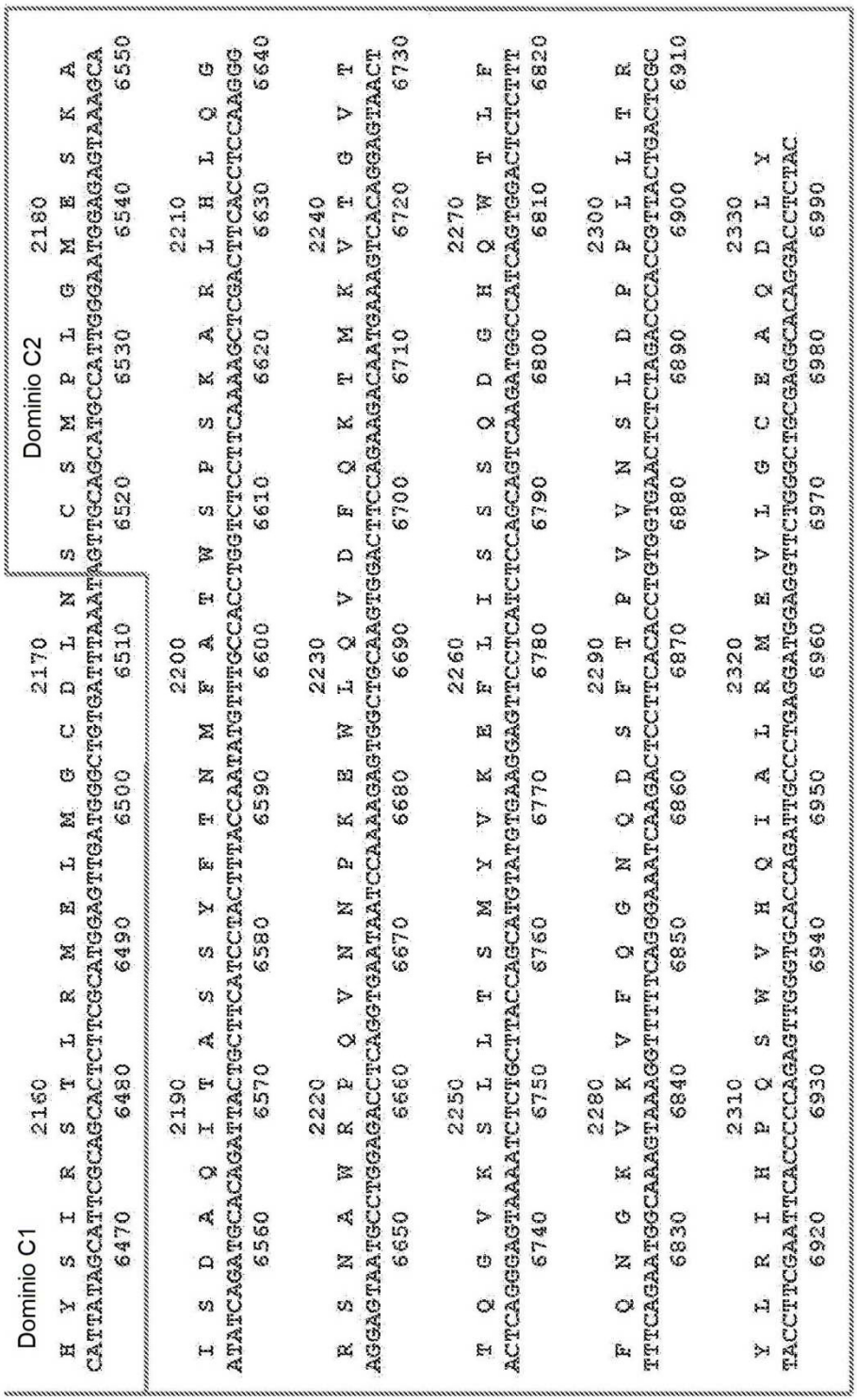


FIG. 30G

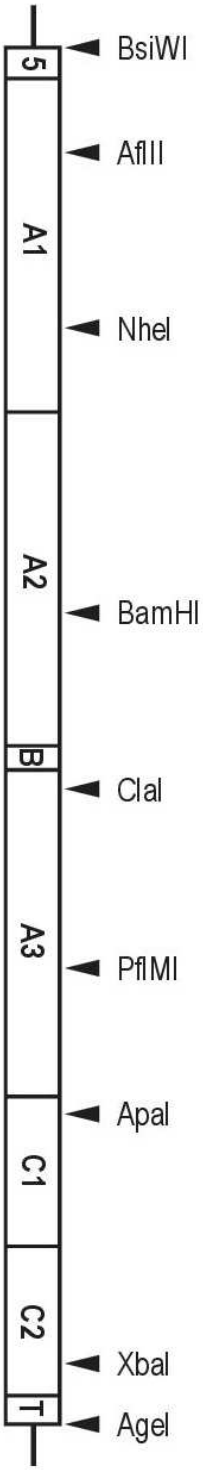

5
A1
A2
B
A3
C1
C2
T
BsiWI
AflII
NheI
BamHI
ClaI
PflMI
ApaI
XbaI
AgeI

FIG. 31

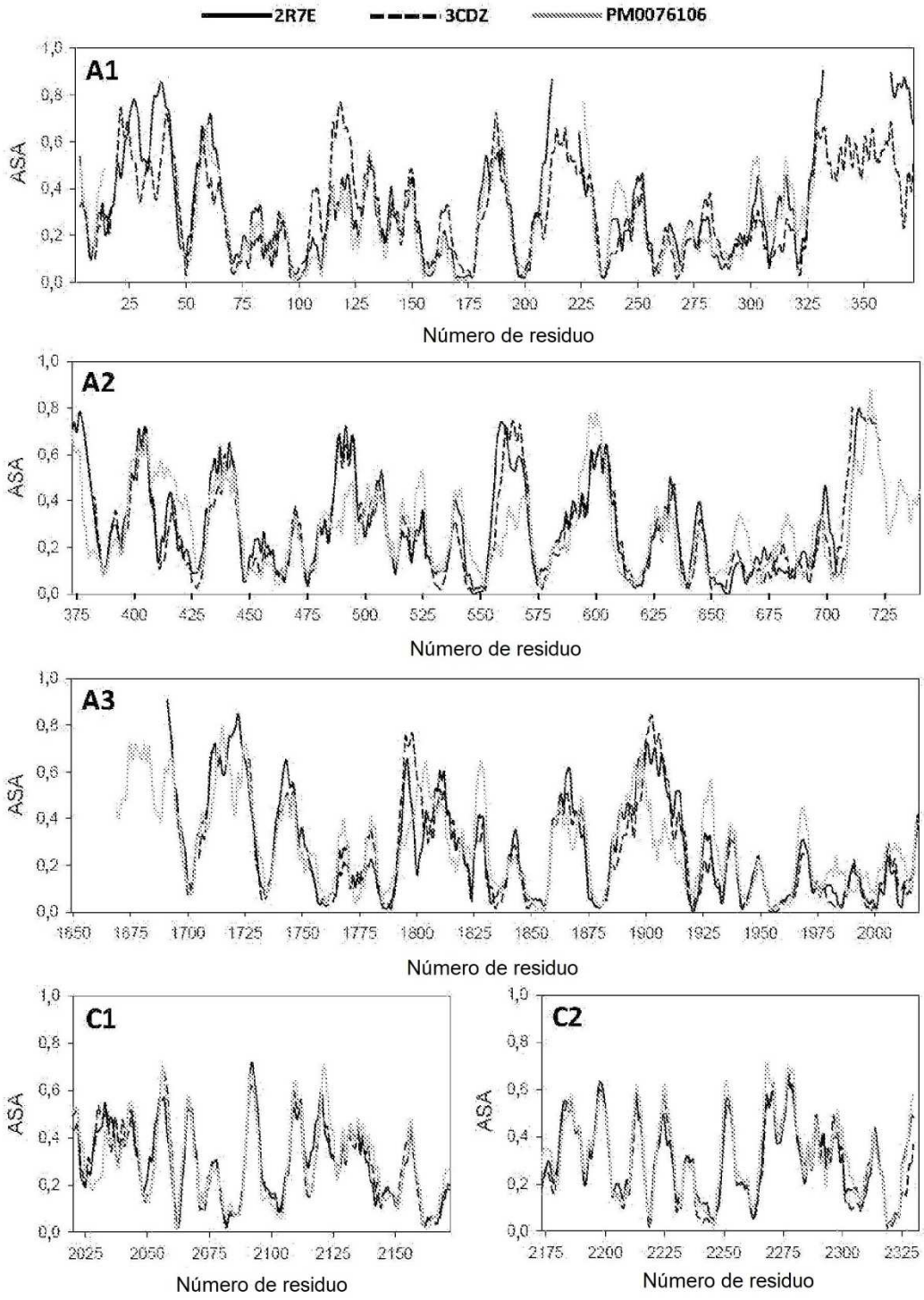


FIG. 32

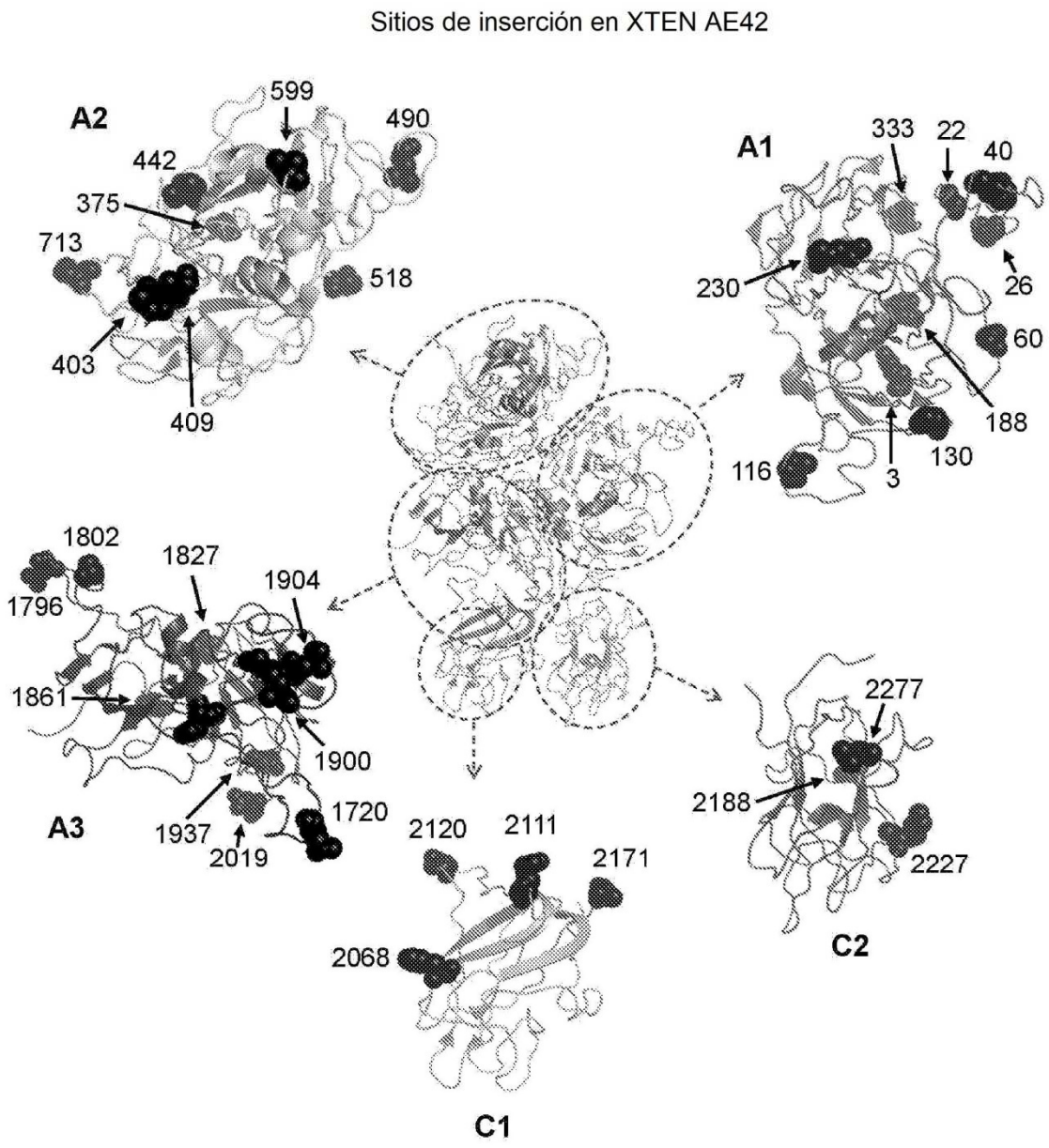

Sitios de inserción en XTEN AE42
A2
599
490
442
375
713
518
403
409
A1
333
22
40
230
26
60
188
130
116
3
1802
1827
1904
1796
1861
1900
A3
1937
2019
1720
2120
2111
2171
2068
C1
2277
2188
2227
C2

FIG. 33

Sitios de inserción en XTEN AE42 con actividad

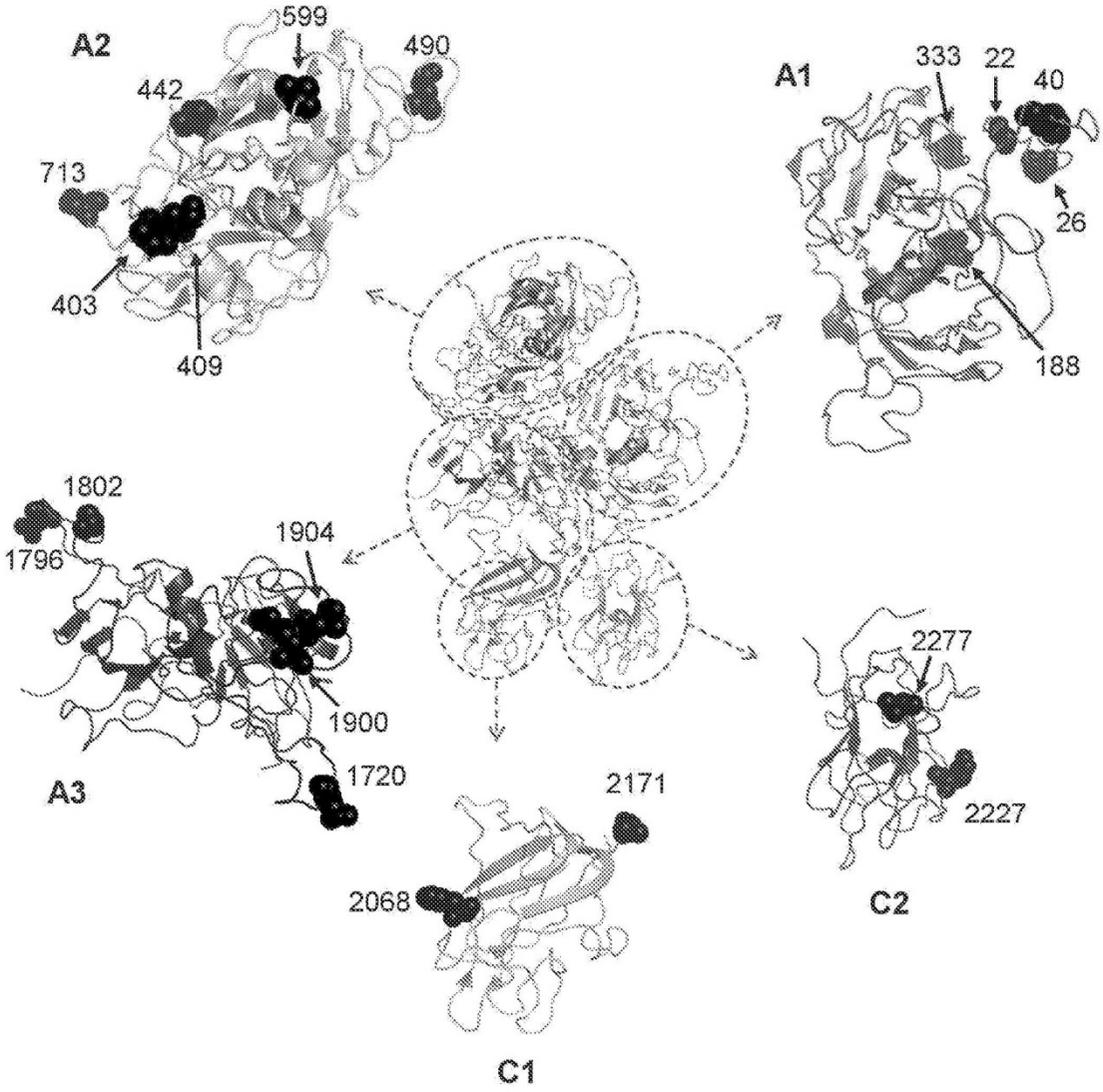


FIG. 34

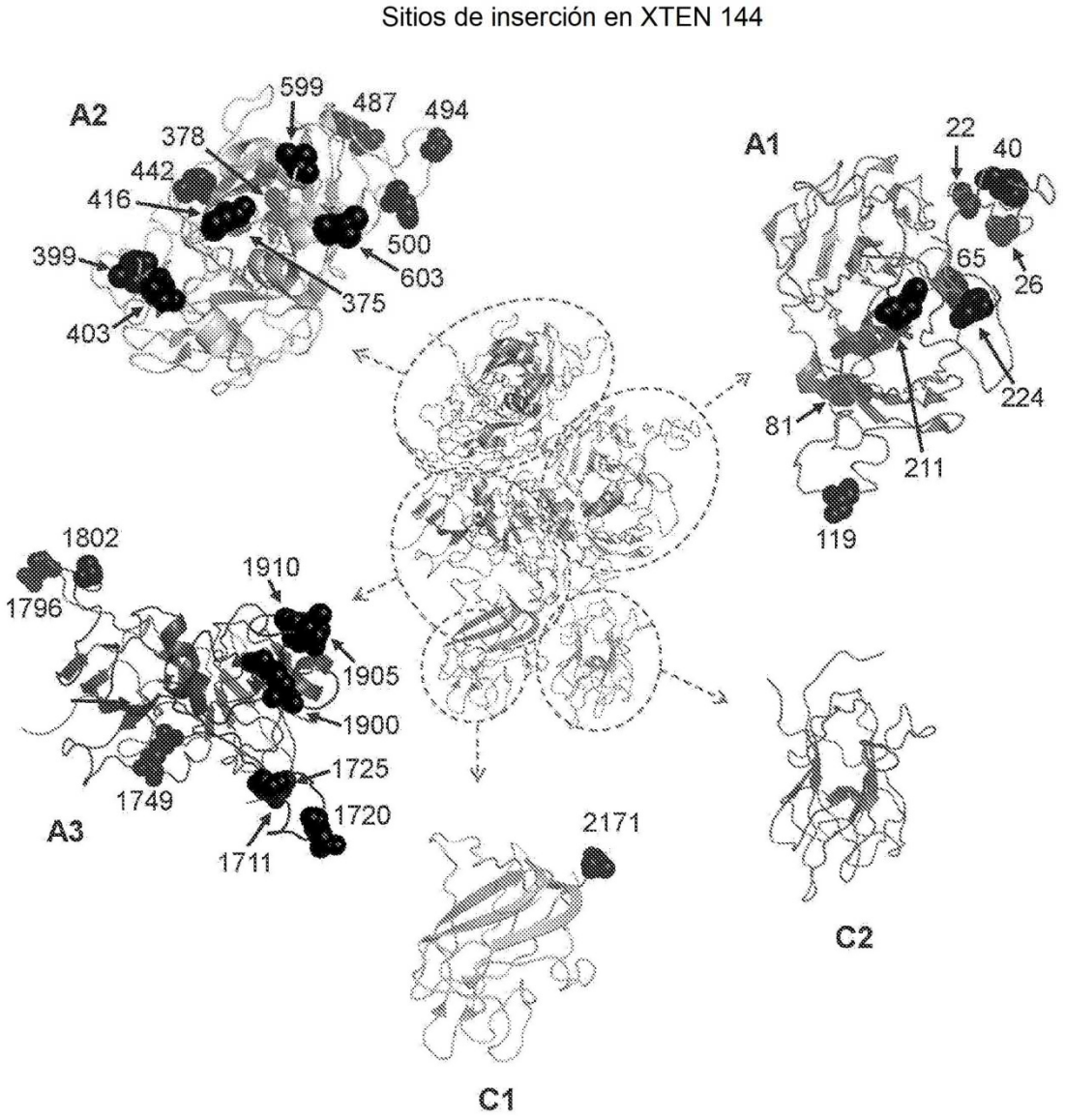

Sitios de inserción en XTEN 144
A2
599
487
494
378
442
416
500
603
399
375
403
A1
22
40
65
26
224
81
211
119
1802
1796
1910
1905
1900
1725
1720
1749
1711
A3
2171
C1
C2

FIG. 35

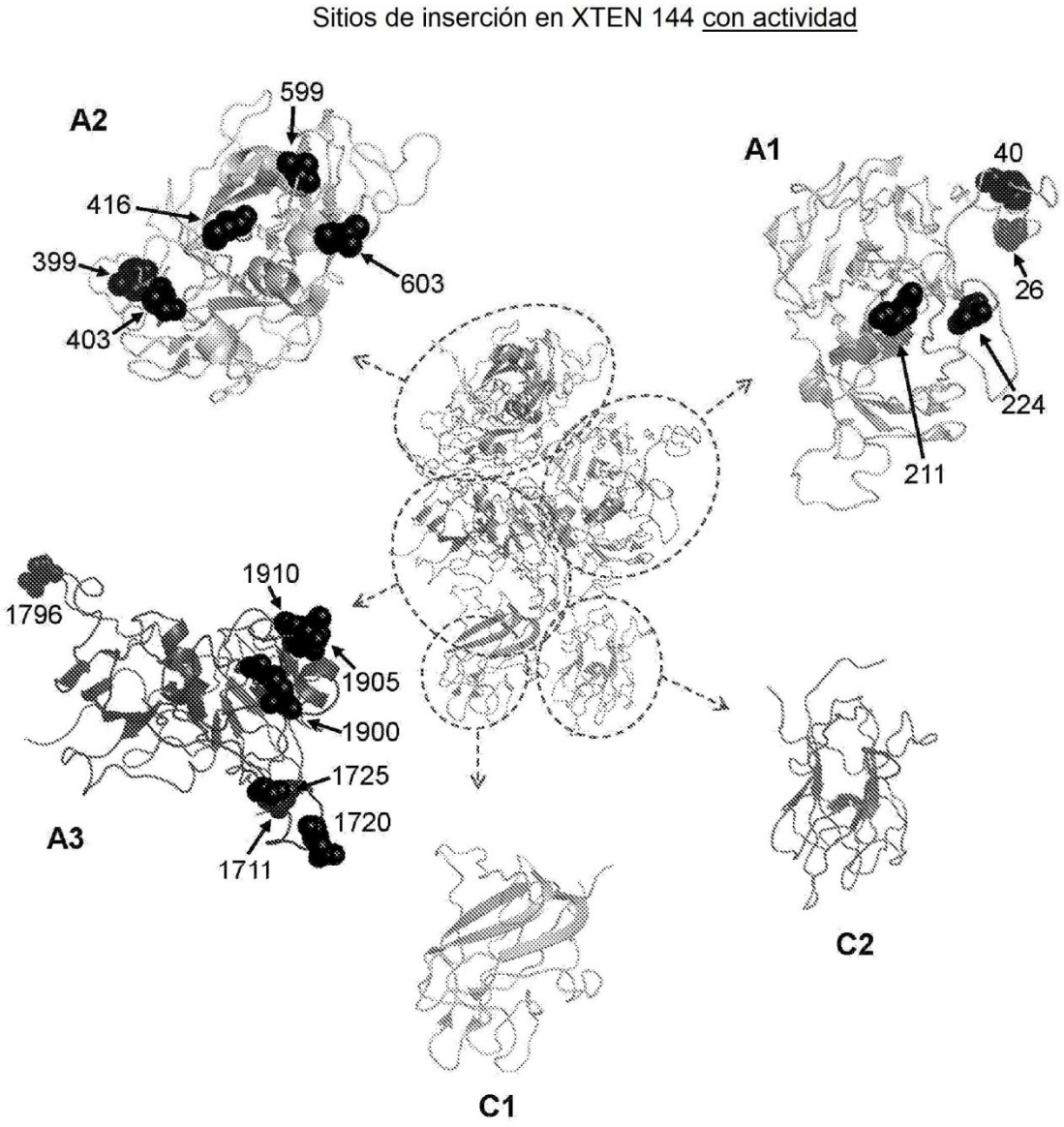

Sitios de inserción en XTEN 144 con actividad
A2
599
416
399
603
403
A1
40
26
224
211
1910
1796
1905
1900
1725
1720
A3
1711
C2
C1

FIG. 36

```
A1 (1)                                                    ATRRYYLGAVELSWD
A2 (373                                                 SVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWD
A3 (1649)   EITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWD
                                                          *  :::.* *  **

A1 (16)     YMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPR---PPWMGLL
A2 (395)    YAPLVL--APDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAI---QHESGIL
A3 (1709)   YG---------MSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLL
            *                   :         :**. *  :**  *.            *:*

A1 (73)     GPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGG
A2 (450)    GPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLY--SRRLPKGVKHLKDFPILPGE
A3 (1760)   GPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQR--QGAEPR------KNFVKPNE
            ** : .** *.::: ::* **:* .::.  ::  .     .           .  : *.

A1 (133)    SHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAK--EKTQ
A2 (508)    IFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIM
A3 (1812)   TKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQV
              .* * *  . .*  .:  * :  * * *:: :*: *****.**:*   ::     :

A1 (191)    TLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWP------KMHTVNGYVNRSLPG
A2 (568)    SDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQ-
A3 (1872)   TVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG
            : :.  ::*::*** :**:   : .     .      *       :*::***:  :*

A1 (245)    LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRN---HRQASLEISPITFLTAQTLLM
A2 (627)    LSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSG---ETVFMSME
A3 (1932)   LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS
            *  .  :   *:::.:*:  :. *:.:.*:.*  :       :   :      *.

A1 (302)    DLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD
A2 (684)    NPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR
A3 (1992)   KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSN
            . * : : *  ... : ** : . * *

A1 (362)    DDNSPSFIQIR


C1 (2020)   KCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYG----QWAPKLARLHYSGSINAWS--TKEPFSWIKV
C2 (2173)   SCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQV
            .*. **** *  * * *****. :       *:*. **** .*  ***   .::* .*::*

C1 (2074)   DLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSS
C2 (2233)   DFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQN--GKVKVFQGNQDSF
            *:  .* : *:.***.:. ::*:*:.:*:*  * **::*  :  *  *.: ** ** **

C1 (2134)   GIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLN---
C2 (2291)   TPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
                * ::**:::**:*:**  :  : :****::**: :
```

FIG. 37

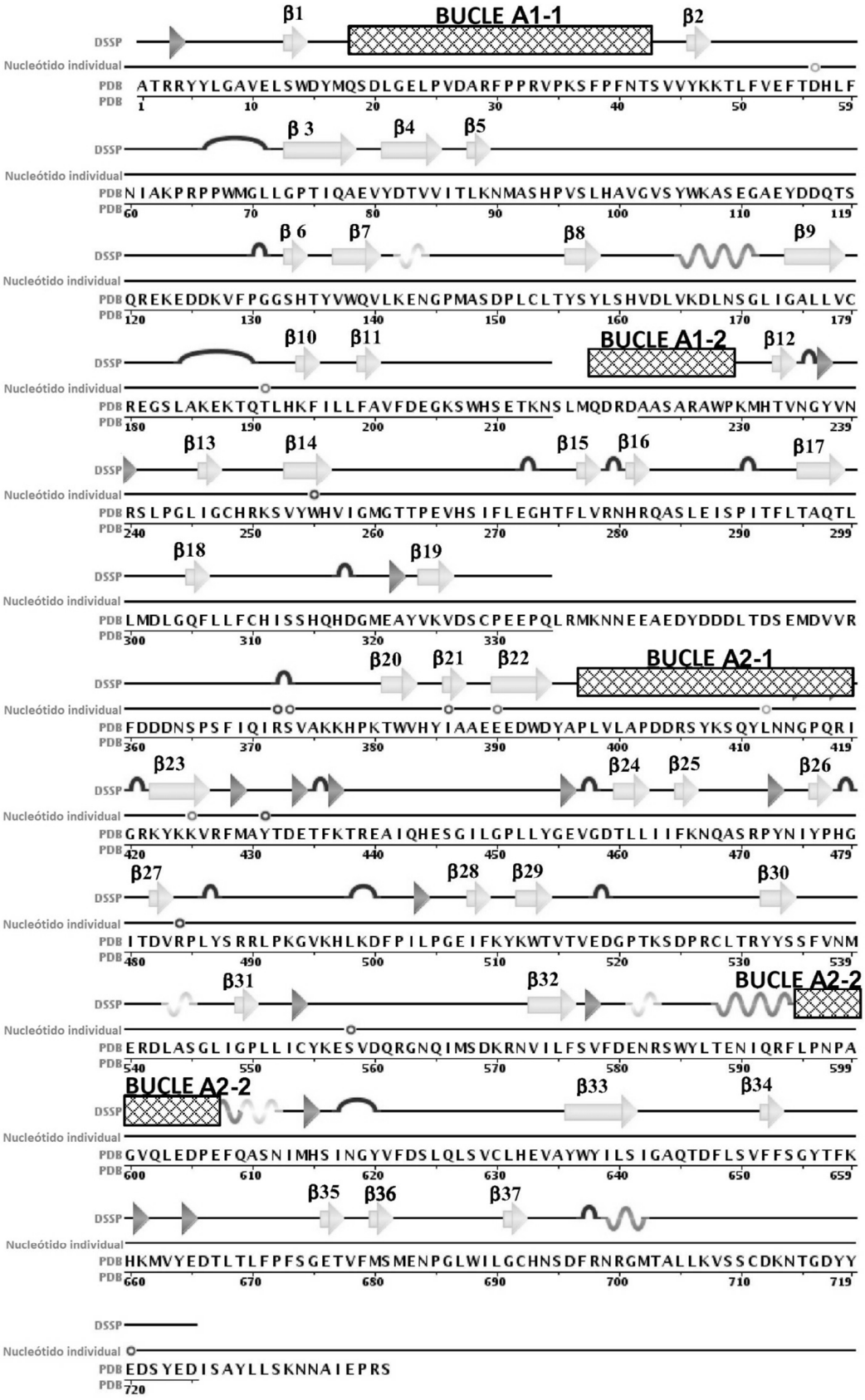

β1
BUCLE A1-1
β2
DSSP
Nucleótido individual
PDB ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLF
PDB 1 10 20 30 40 50 59
β 3
β4
β5
DSSP
Nucleótido individual
PDB NIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTS
PDB 60 70 80 90 100 110 119
β 6
β7
β8
β9
DSSP
Nucleótido individual
PDB QREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVC
PDB 120 130 140 150 160 170 179
β10
β11
BUCLE A1-2
β12
DSSP
Nucleótido individual
PDB REGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN
PDB 180 190 200 210 230 239
β13
β14
β15
β16
β17
DSSP
Nucleótido individual
PDB RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTL
PDB 240 250 260 270 280 290 299
β18
β19
DSSP
Nucleótido individual
PDB LMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVR
PDB 300 310 320 330
β20
β21
β22
BUCLE A2-1
DSSP
Nucleótido individual
PDB FDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRI
PDB 360 370 380 390 400 410 419
β23
β24
β25
β26
DSSP
Nucleótido individual
PDB GRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHG
PDB 420 430 440 450 460 470 479
β27
β28
β29
β30
DSSP
Nucleótido individual
PDB ITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNM
PDB 480 490 500 510 520 530 539
β31
β32
BUCLE A2-2
DSSP
Nucleótido individual
PDB ERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPA
PDB 540 550 560 570 580 590 599
BUCLE A2-2
β33
β34
DSSP
Nucleótido individual
PDB GVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK
PDB 600 610 620 630 640 650 659
β35
β36
β37
DSSP
Nucleótido individual
PDB HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYY
PDB 660 670 680 690 700 710 719
DSSP
Nucleótido individual
PDB EDSYEDISAYLLSKNNAIEPRS
PDB 720

FIG. 38

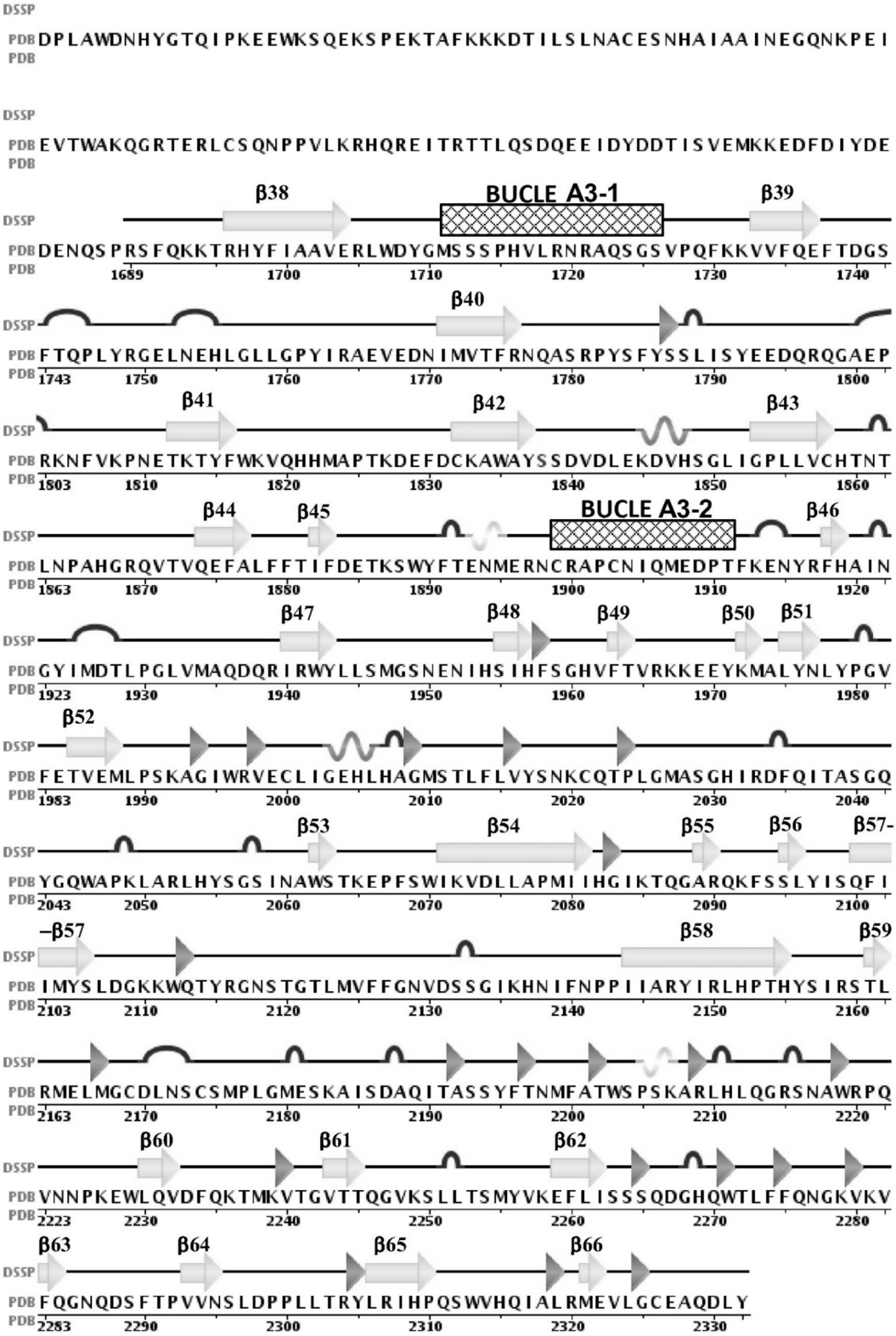

DSSP
PDB DPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEI
PDB
DSSP
PDB EVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDE
PDB
β38
BUCLE A3-1
β39
DSSP
PDB DENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGS
PDB 1689 1700 1710 1720 1730 1740
β40
DSSP
PDB FTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEP
PDB 1743 1750 1760 1770 1780 1790 1800
β41
β42
β43
DSSP
PDB RKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYSSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNT
PDB 1803 1810 1820 1830 1840 1850 1860
β44
β45
BUCLE A3-2
β46
DSSP
PDB LNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAIN
PDB 1863 1870 1880 1890 1900 1910 1920
β47
β48
β49
β50
β51
DSSP
PDB GYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGV
PDB 1923 1930 1940 1950 1960 1970 1980
β52
DSSP
PDB FETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ
PDB 1983 1990 2000 2010 2020 2030 2040
β53
β54
β55
β56
β57-
DSSP
PDB YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFI
PDB 2043 2050 2060 2070 2080 2090 2100
–β57
β58
β59
DSSP
PDB IMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTL
PDB 2103 2110 2120 2130 2140 2150 2160
DSSP
PDB RMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQ
PDB 2163 2170 2180 2190 2200 2210 2220
β60
β61
β62
DSSP
PDB VNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKV
PDB 2223 2230 2240 2250 2260 2270 2280
β63
β64
β65
β66
DSSP
PDB FQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
PDB 2283 2290 2300 2310 2320 2330

FIG. 39

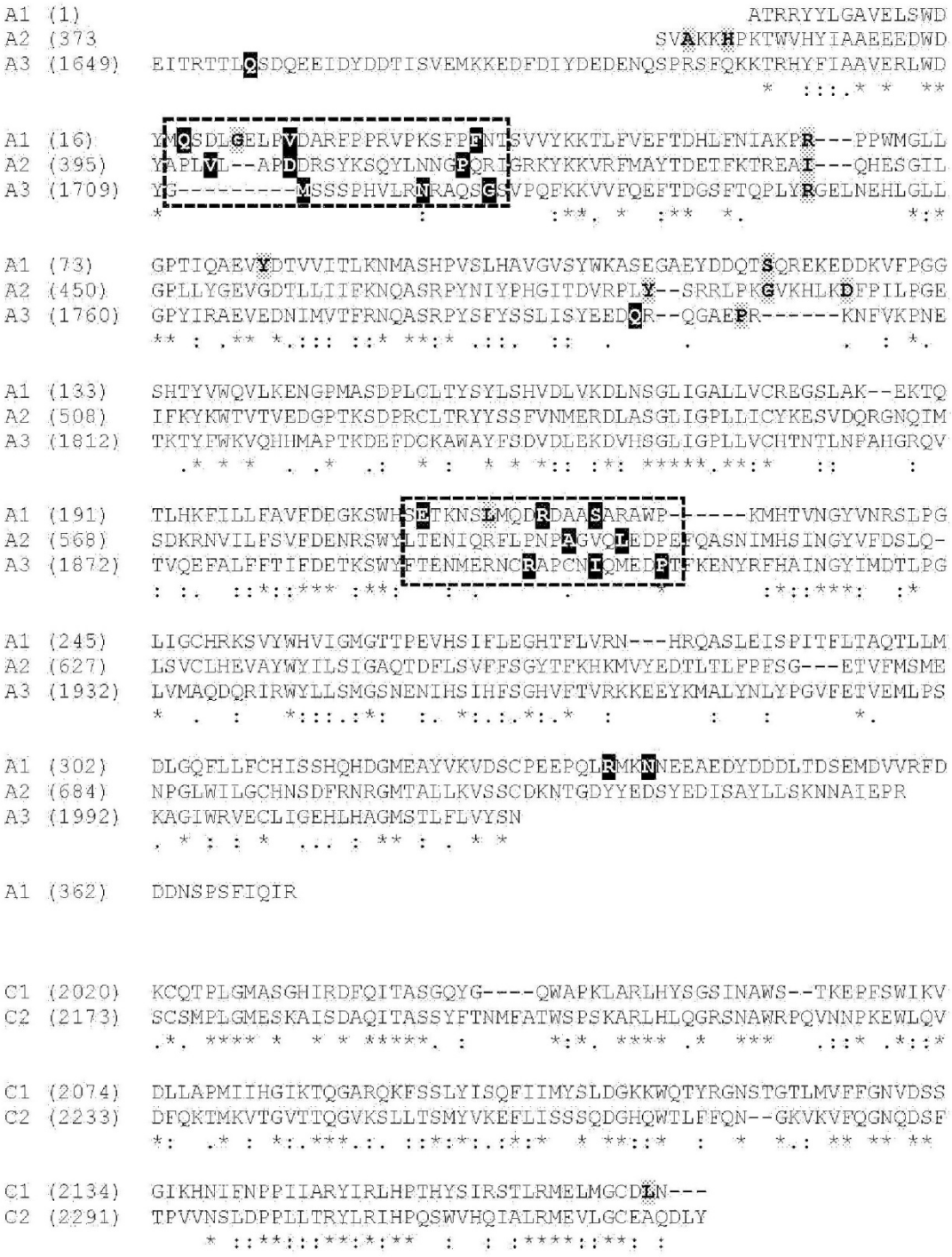


FIG. 40

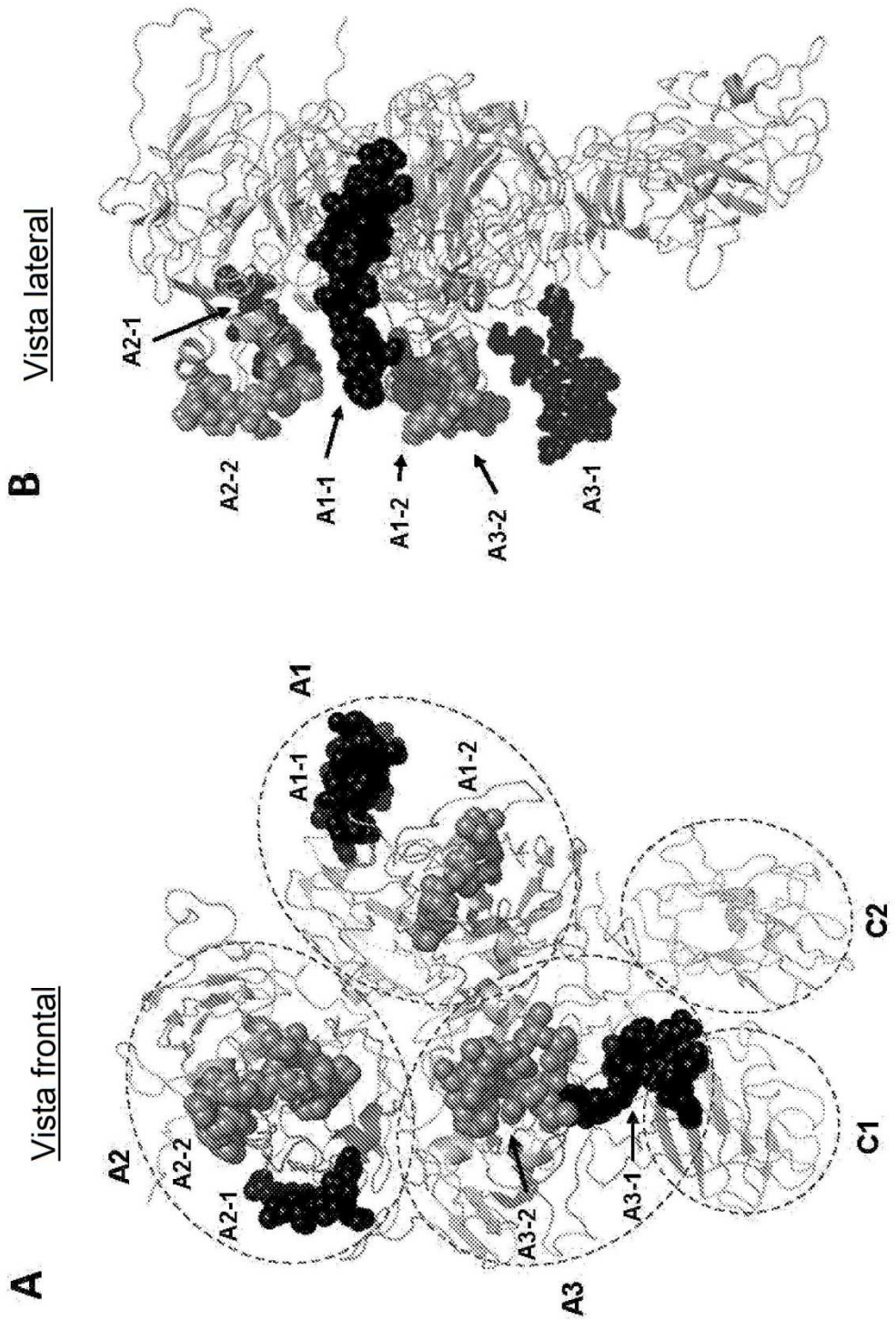

A
Vista frontal
A2
A2-2
A2-1
A1
A1-1
A1-2
A3-2
A3-1
A3
C2
C1
B
Vista lateral
A2-1
A2-2
A1-1
A1-2
A3-2
A3-1

FIG. 41

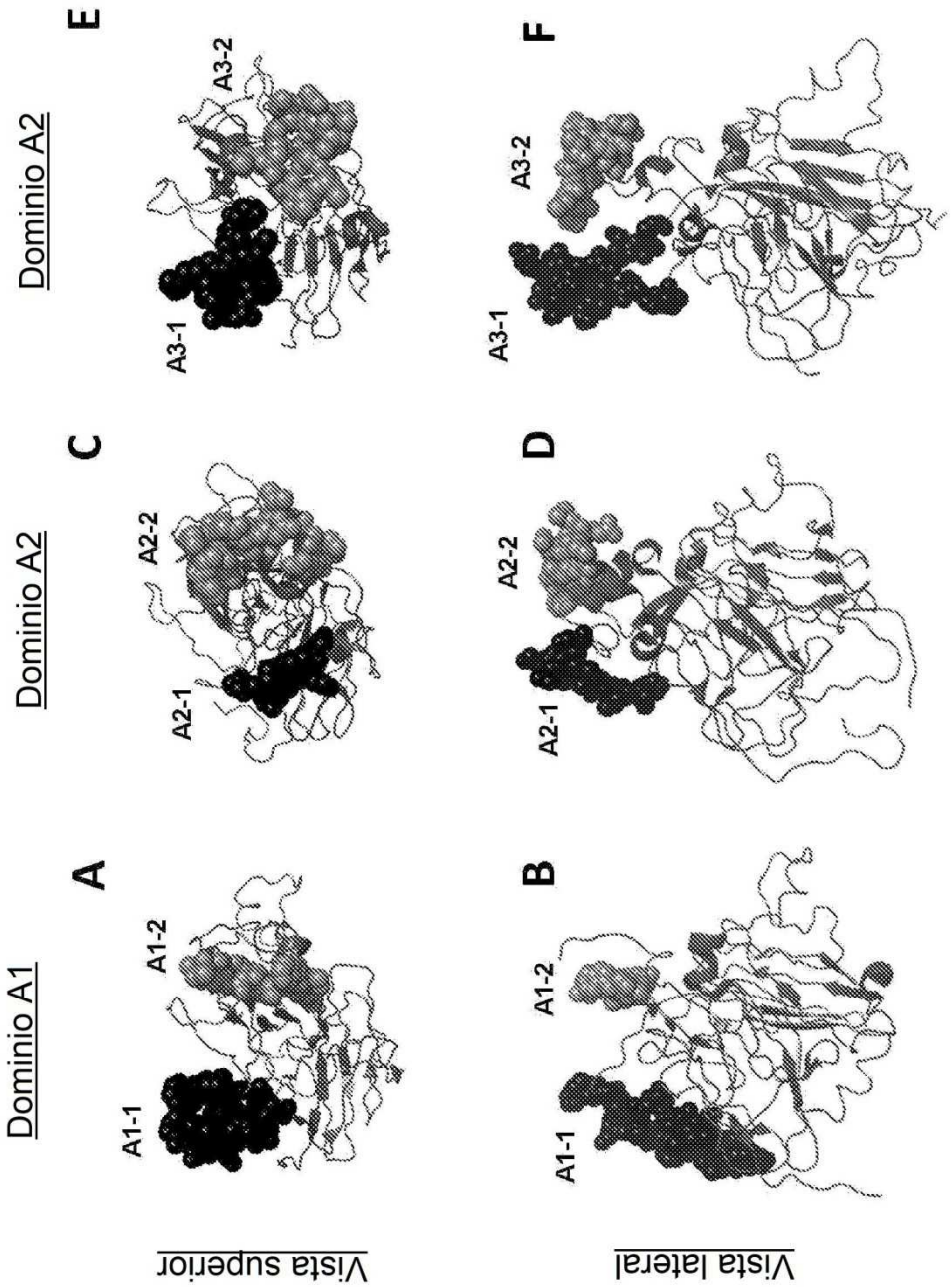

Dominio A1
Dominio A2
Dominio A2
A
B
C
D
E
F
A1-1
A1-2
A2-1
A2-2
A3-1
A3-2
Vista superior
Vista lateral

FIG. 42

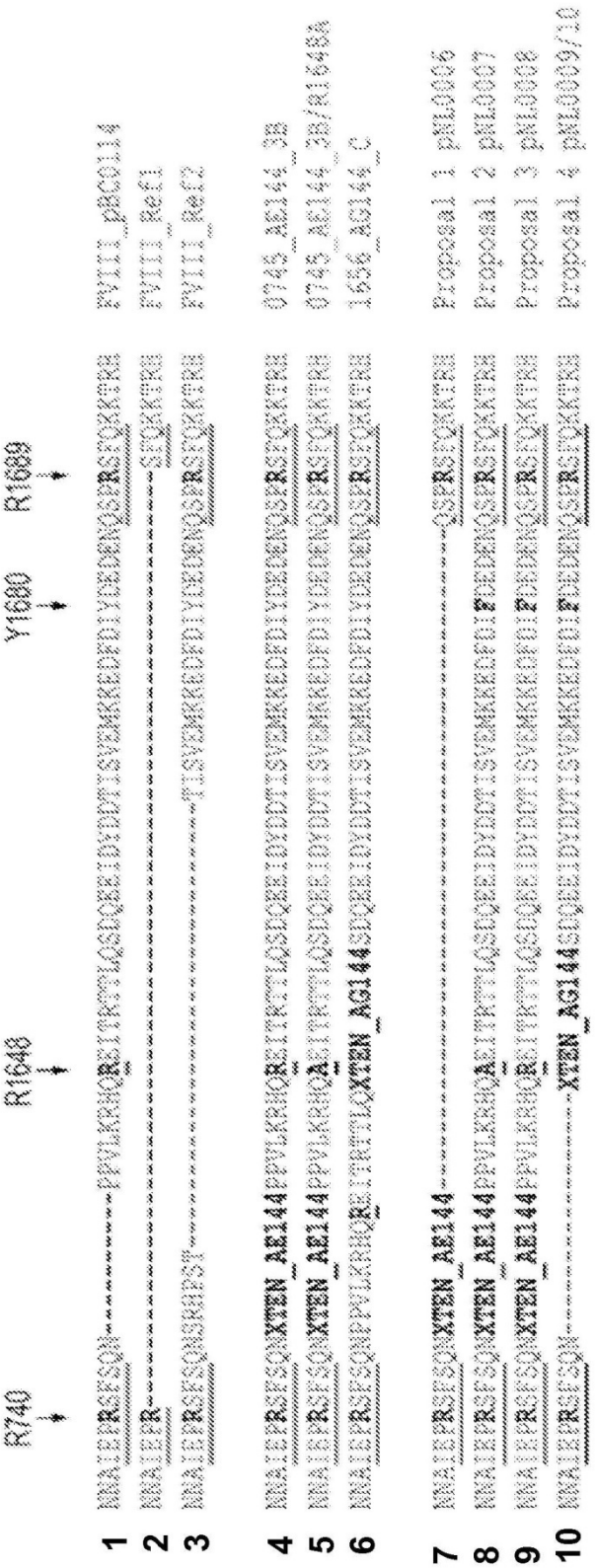

R740
R1648
Y1680
R1689
1 MNAIERSFSQN----------PPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKREDFDIYGERAFSQKTRH PVIII_pBC0114
2 MNAIER----------SFQKTRH PVIII_Ref1
3 MNAIERSFSQNSRHRST----------TISVEMKREDFDIYGERAFSQKTRH PVIII_Ref2
4 MNAIERSFSQNXTEN_AE144PPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKREDFDIYGERAFSQKTRH 0745_AG144_3B
5 MNAIERSFSQNXTEN_AE144PPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKREDFDIYGERAFSQKTRH 0745_AG144_3B/a1648A
6 MNAIERSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQXTEN_AG144SDQEEIDYDDTISVEMKREDFDIYGERAFSQKTRH 1636_AG144_3
7 MNAIERSFSQNXTEN_AE144----------QSERSFQKTRH Proposal 1 pNL0006
8 MNAIERSFSQNXTEN_AE144PPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKREDFDIFDERAFSQKTRH Proposal 2 pNL0007
9 MNAIERSFSQNXTEN_AE144PPVLKRHQREITRTTLQSDQNEIDYDDTISVEMKREDFDIFDNRAFSQRSTQKTRH Proposal 3 pNL0008
10 MNAIERSFSQN----------XTEN_AG144SDQEEIDYDDTISVEMKREDFDIFDNRAFSQRSTQKTRH Proposal 4 pNL0009/10

FIG. 43

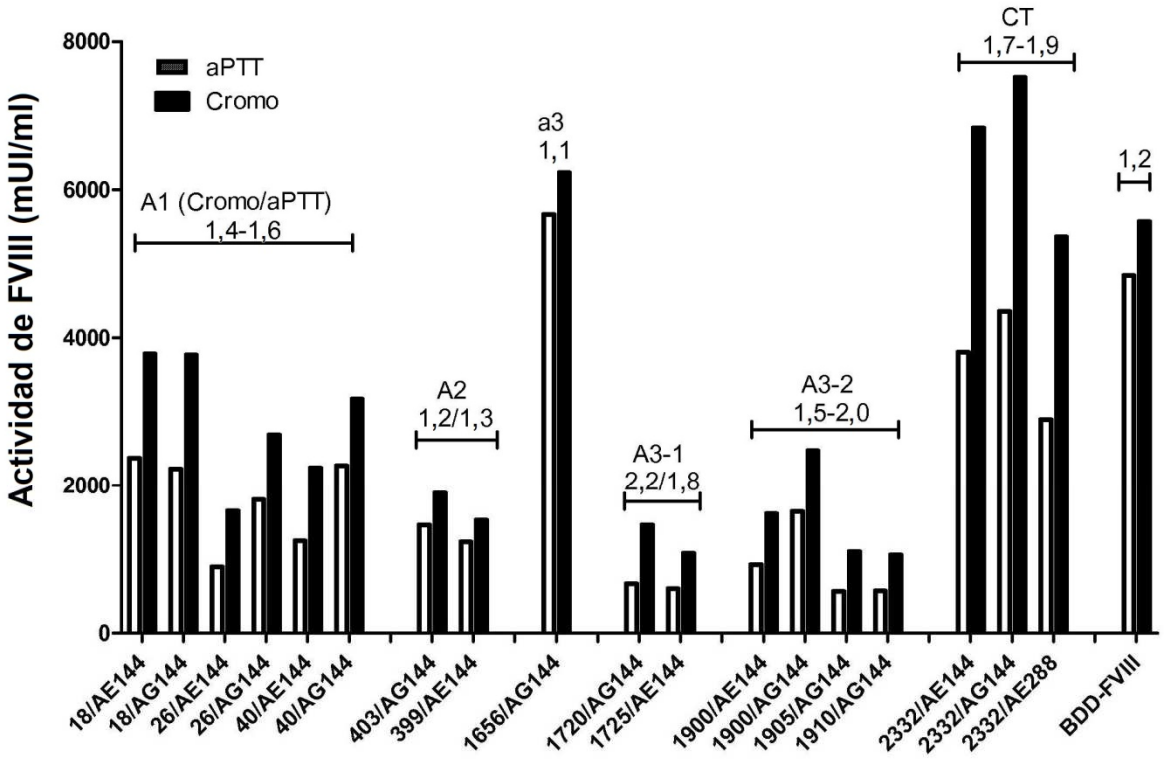

Actividad de FVIII (mUI/ml)
8000
6000
4000
2000
0
aPTT
Cromo
A1 (Cromo/aPTT)
1,4-1,6
A2
1,2/1,3
a3
1,1
A3-1
2,2/1,8
A3-2
1,5-2,0
CT
1,7-1,9
1,2
18/AE144
18/AG144
26/AE144
26/AG144
40/AE144
40/AG144
403/AG144
399/AE144
1656/AG144
1720/AG144
1725/AE144
1900/AE144
1900/AG144
1905/AG144
1910/AG144
2332/AE144
2332/AG144
2332/AE288
BDD-FVIII

FIG. 44

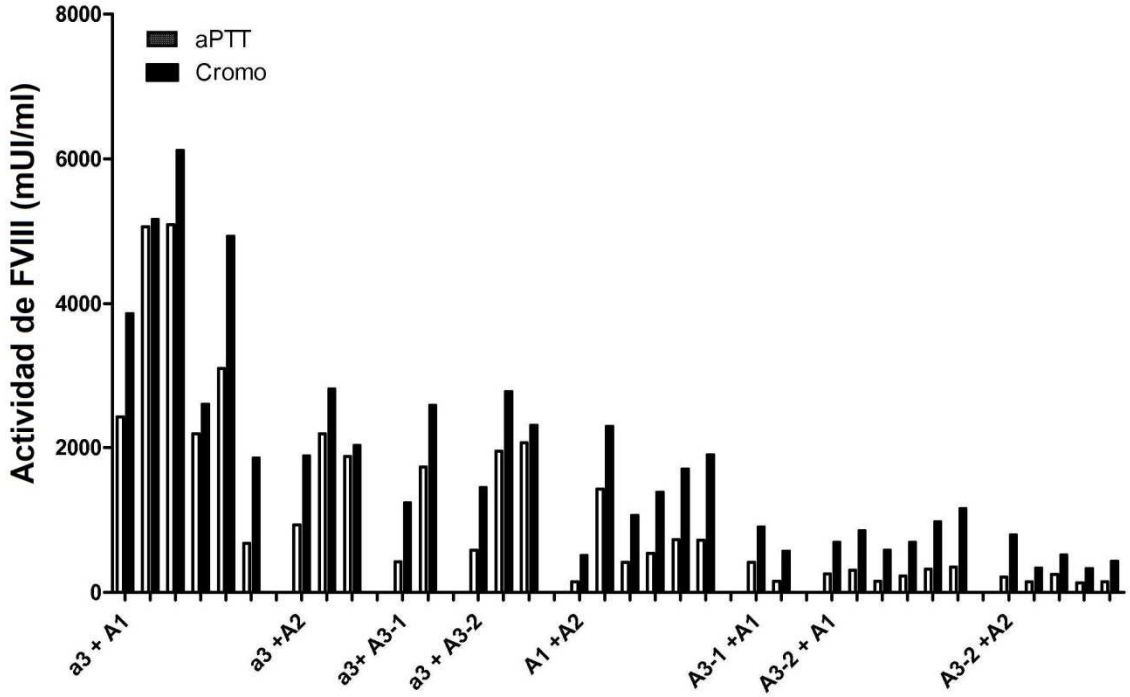

8000
6000
4000
2000
0
aPTT
Cromo
Actividad de FVIII (mUI/ml)
a3 + A1
a3 +A2
a3+ A3-1
a3 + A3-2
A1 +A2
A3-1 +A1
A3-2 + A1
A3-2 +A2

FIG. 45

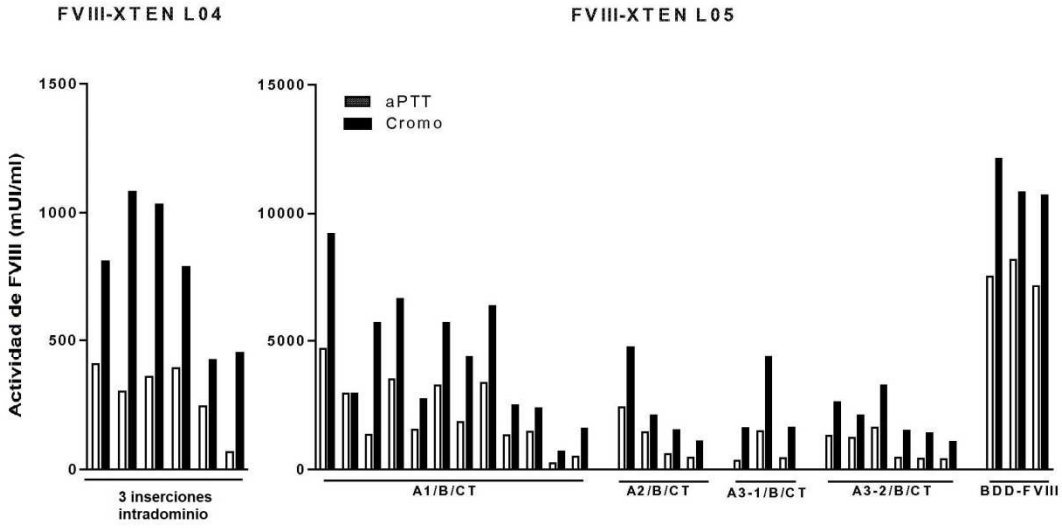

FVIII-XTEN L04
FVIII-XTEN L05
Actividad de FVIII (mUI/ml)
1500
1000
500
0
15000
10000
5000
0
aPTT
Cromo
3 inserciones intradominio
A1/B/CT
A2/B/CT
A3-1/B/CT
A3-2/B/CT
BDD-FVIII

FIG. 46

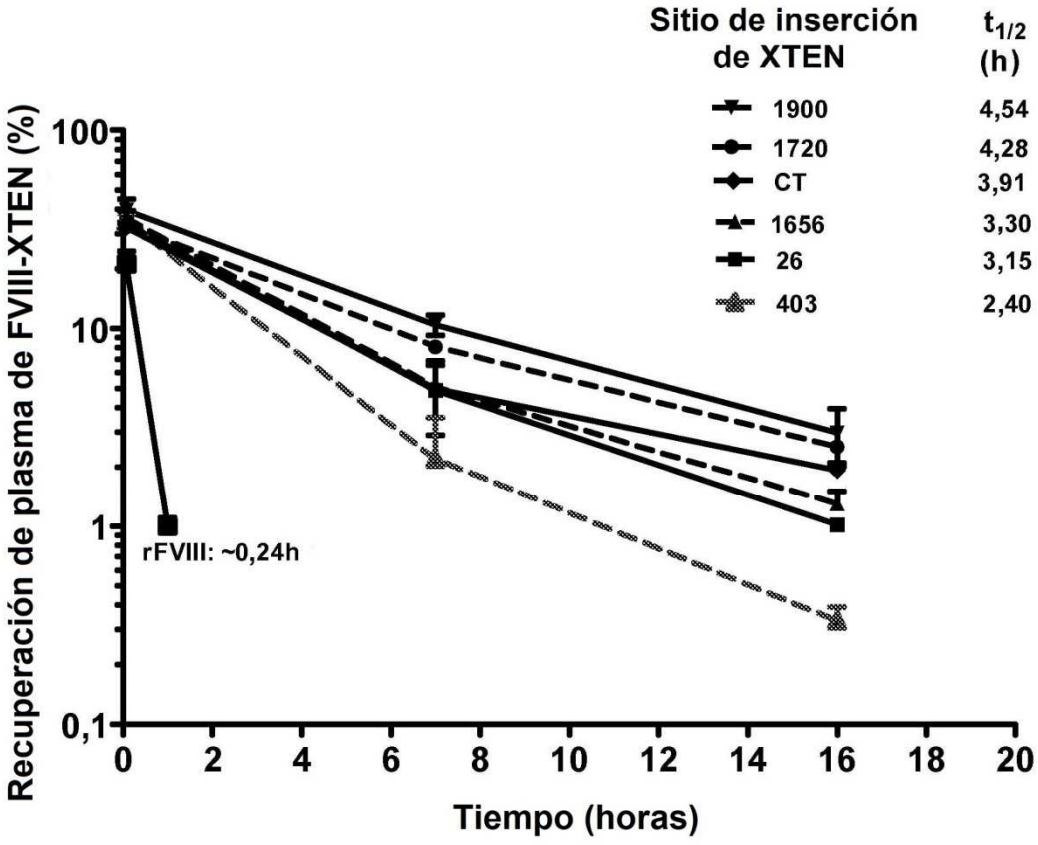

Sitio de inserción de XTEN
$t_{1/2}$ (h)
1900 4,54
1720 4,28
CT 3,91
1656 3,30
26 3,15
403 2,40
Recuperación de plasma de FVIII-XTEN (%)
100
10
1
0,1
rFVIII: ~0,24h
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Tiempo (horas)

FIG. 47

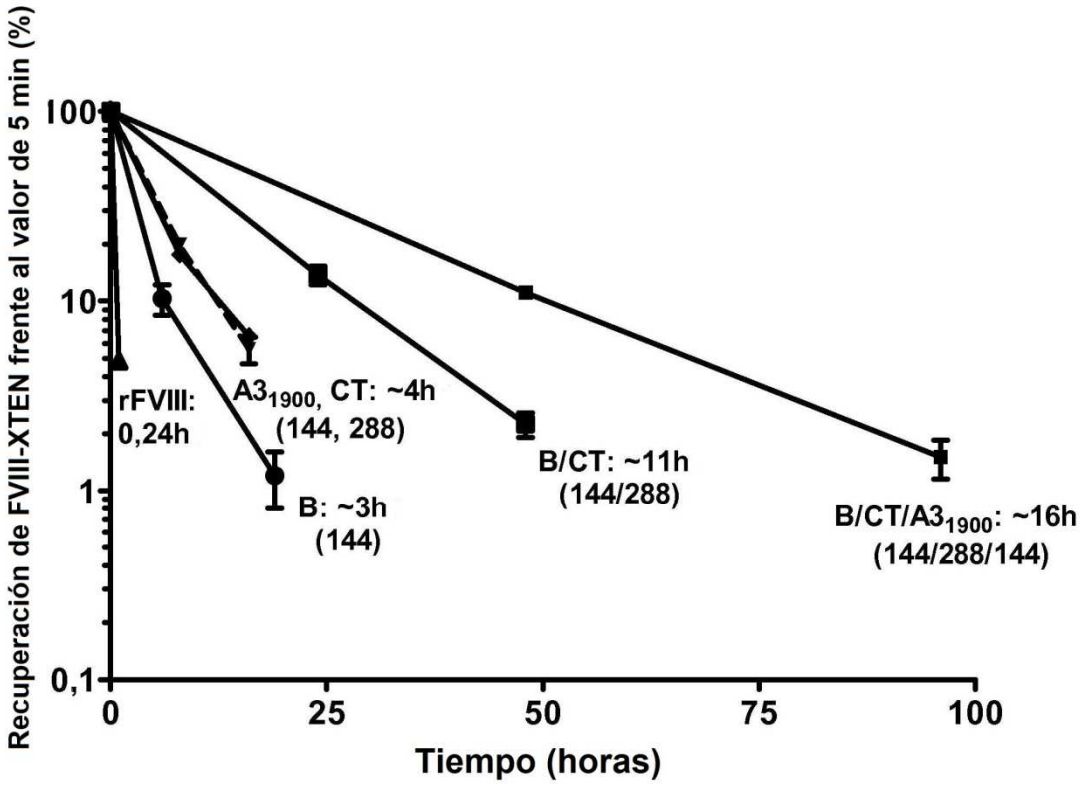

Recuperación de FVIII-XTEN frente al valor de 5 min (%)
100
10
1
0,1
0
25
50
75
100
Tiempo (horas)
rFVIII:
0,24h
A3$_{1900}$, CT: ~4h
(144, 288)
B: ~3h
(144)
B/CT: ~11h
(144/288)
B/CT/A3$_{1900}$: ~16h
(144/288/144)

FIG. 48

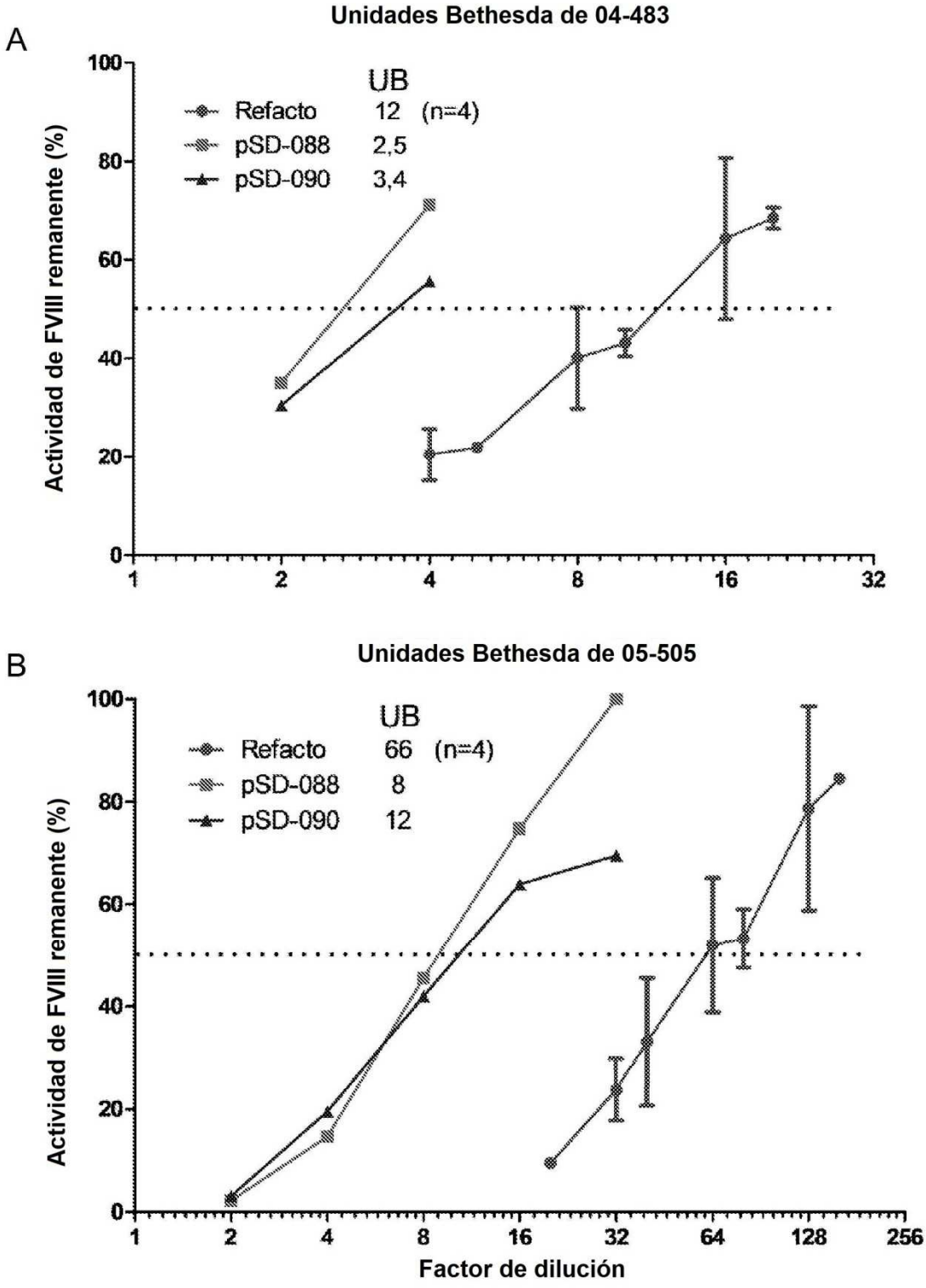
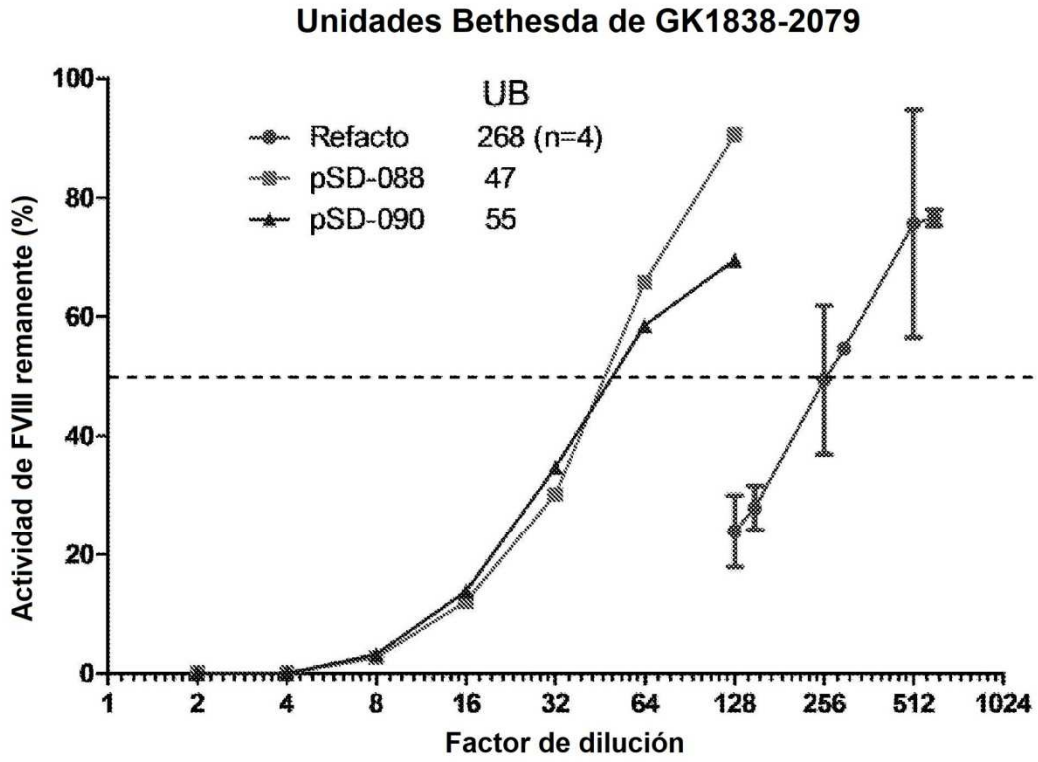

A
Unidades Bethesda de 04-483
UB
Refacto 12 (n=4)
pSD-088 2,5
pSD-090 3,4
Actividad de FVIII remanente (%)
100
80
60
40
20
0
1
2
4
8
16
32
B
Unidades Bethesda de 05-505
UB
Refacto 66 (n=4)
pSD-088 8
pSD-090 12
Actividad de FVIII remanente (%)
100
80
60
40
20
0
1
2
4
8
16
32
64
128
256
Factor de dilución

FIG. 49

C


Unidades Bethesda de GK1838-2079
UB
Refacto 268 (n=4)
pSD-088 47
pSD-090 55
Actividad de FVIII remanente (%)
Factor de dilución
0
20
40
60
80
100
1
2
4
8
16
32
64
128
256
512
1024

D

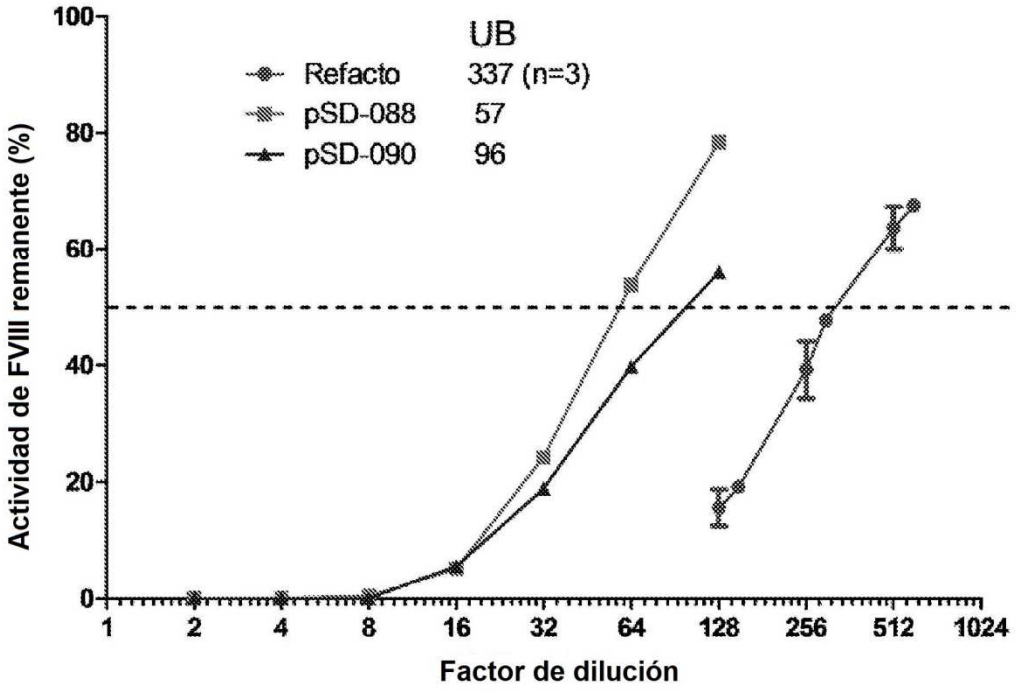

Unidades Bethesda de anticuerpo de oveja anti-FVIII
UB
Refacto 337 (n=3)
pSD-088 57
pSD-090 96
Actividad de FVIII remanente (%)
Factor de dilución
0
20
40
60
80
100
1
2
4
8
16
32
64
128
256
512
1024

FIG. 49