

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 051**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2015 E 22181403 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024 EP 4176894**

54 Título: **Proteínas quiméricas de factor VIII y usos de las mismas**

30 Prioridad:

10.01.2014 US 201461926226 P
02.05.2014 US 201461988104 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.10.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CHHABRA, EKTA, SETH;
LIU, TONGYAO;
PETERS, ROBERT T. y
KULMAN, JOHN

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

ES 2 982 051 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas quiméricas de factor VIII y usos de las mismas

5 Antecedentes de la invención

La hemofilia A es un trastorno hemorrágico provocado por defectos en el gen que codifica el factor de coagulación VIII (FVIII) y afecta a 1-2 de cada 10 000 nacimientos de sexo masculino. Graw *et al.*, Nat. Rev. Genet. 6(6): 488-501 (2005). Los pacientes afectados con hemofilia A pueden tratarse con infusión de FVIII purificado o producido de forma recombinante. Se sabe que todos los productos de FVIII disponibles en el mercado, sin embargo, tiene una semivida de aproximadamente 8-12 horas, lo que requiere administración intravenosa frecuente a los pacientes. Véase Weiner M.A. y Cairo, M.S., Pediatric Hematology Secrets, Lee, M.T., 12. Disorders of Coagulation, Elsevier Health Sciences, 2001; Lillicrap, D. Thromb. Res. 122 Supl. 4:S2-8 (2008). Además, se han intentado varias estrategias para prolongar la semivida de FVIII. Por ejemplo, las estrategias en desarrollo para prolongar la semivida de factores de coagulación incluyen pegilación, glucopegilación y conjugación con albúmina. Véase Dumont *et al.*, Blood. 119(13): 3024-3030 (publicado en línea, 13 de enero de 2012). Independientemente de la manipulación proteínica usada, sin embargo, se ha informado de que los productos de FVIII de acción prolongada actualmente en desarrollo tienen semividas limitadas, únicamente hasta aproximadamente 1,5 a 2 horas en modelos animales preclínicos. Véase *id.* Se han demostrado resultados coherentes en seres humanos, por ejemplo, se informó de que rFVIII_{Fc} mejora la semivida hasta ~1,7 veces en comparación con ADVATE[®] en pacientes con hemofilia A. Véase *id.* Por lo tanto, los aumentos de la semivida, a pesar de mejoras mínimas, pueden indicar la presencia de otros factores limitantes de T1/2. Véase Liu, T. *et al.*, 2007 ISTH meeting, resumen n.º P-M-035; Henrik, A. *et al.*, 2011 ISTH meeting, resumen n.º P=MO-181; Liu, T. *et al.*, 2011 ISTH meeting resumen n.º P-WE-131.

25 El factor de Von Willebrand (VWF) en plasma tiene una semivida de aproximadamente 16 horas (que varía de 13 a 18 horas). Goudemand J, *et al.* J Thromb Haemost 2005;3:2219-27. La semivida de VWF puede verse afectada por varios factores: patrón de glucosilación, ADAMTS-13 (una desintegrina y metaloproteasa con el motivo 13 de trombospondina) y diversas mutaciones en VWF.

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

45 Debido a la dosificación frecuente y las inconveniencias provocadas por la pauta de dosificación, aún hay una necesidad de desarrollar productos de FVIII que requieran administración menos frecuente, es decir, un producto de FVIII que tenga una semivida más larga que 1,5 a 2 veces la limitación de la semivida.

Breve resumen de la invención

50 La presente invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto. Específicamente, la presente invención proporciona una proteína quimérica que comprende (i) una primera cadena polipeptídica que comprende (a) una proteína de factor VIII ("FVIII") que comprende una parte N terminal y una parte C terminal, en la que la parte N terminal de la proteína FVIII comprende el dominio A1, dominio A2 y una parte del dominio B de FVIII maduro de longitud completa (SEQ ID NO: 65), de modo que la parte N terminal comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos 1 a 745 de SEQ ID NO: 65 fusionada a una primera secuencia de XTEN insertada inmediatamente posterior al aminoácido 745 de SEQ ID NO: 65, y en la que la parte C terminal comprende el dominio A3, el dominio C1 y el dominio C2; (b) una primera región Fc; y (ii) un segundo polipéptido que comprende, del extremo N al extremo C del mismo: (a) un fragmento de factor de Von Willebrand ("VWF") que comprende un dominio D' y un dominio D3 de VWF, con una sustitución aminoacídica en cada uno de los residuos 1099 y 1142 de SEQ ID NO: 21; (b) una segunda secuencia de XTEN, en la que segunda secuencia de XTEN contiene menos de 288 aminoácidos; (c) un conector escindible que comprende una región a2 de FVIII que comprende la secuencia de aminoácidos de Glu720 a Arg740 correspondiente a SEQ ID NO: 65, en la que la región a2 puede escindirarse por trombina; y (d) una segunda región Fc en la que la primera región Fc se liga a o se asocia con la segunda región Fc. Determinadas realizaciones incluyen la proteína quimérica descrita en este documento, en la que la secuencia de XTEN en el segundo polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud entre 12 aminoácidos y 287 aminoácidos.

65 También se divulga la proteína quimérica como se describe en el presente documento, en la que la proteína quimérica

exhibe una semivida más larga en comparación con una proteína de fusión correspondiente que comprende el primer polipéptido y el segundo polipéptido en el que el segundo polipéptido de la proteína de fusión comprende una secuencia XTEN que contiene al menos 288 aminoácidos. Algunas realizaciones incluyen la secuencia XTEN AE288, que contiene al menos 288 aminoácidos. En algunas realizaciones AE288 es SEQ ID NO: 8.

También se divulga la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que la secuencia de XTEN del segundo polipéptido contiene aproximadamente 36, aproximadamente 42, aproximadamente 72 o aproximadamente 144 aminoácidos. En algunas realizaciones, la secuencia de XTEN del segundo polipéptido se selecciona de AE42, AE72, AE144, AG42, AG72 o AG144.

Algunas realizaciones incluyen la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que la secuencia de XTEN del segundo polipéptido se selecciona de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO 55; SEQ ID NO 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; o SEQ ID NO: 63.

En determinadas realizaciones, el primer polipéptido comprende además una tercera secuencia de XTEN que liga la proteína FVIII con la primera región Fc. También se divulga la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que el primer polipéptido comprende una tercera secuencia de XTEN que se inserta en uno o más sitios de inserción dentro de la proteína FVIII. En algunas realizaciones, el primer polipéptido comprende además una tercera secuencia de XTEN que se inserta en uno o más sitios de inserción dentro de la proteína FVIII. En determinadas realizaciones, el primer polipéptido comprende una tercera secuencia de XTEN que liga la proteína FVIII con la primera región Fc.

También se divulga la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que la primera secuencia de XTEN, la tercera secuencia de XTEN o la primera y tercera secuencia de XTEN cada una se selecciona independientemente de AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288 y AG144. En algunas realizaciones, la primera secuencia de XTEN, la tercera secuencia de XTEN o la primera y tercera secuencia de XTEN cada una se selecciona independientemente de SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; o SEQ ID NO: 63. En determinadas realizaciones, la primera secuencia de XTEN, la tercera secuencia de XTEN o tanto la primera como la tercera secuencia de XTEN son cada una independientemente AE288 o AG288.

En algunas realizaciones, la primera región Fc y la segunda región Fc prolongan la semivida de la proteína quimérica. En determinadas realizaciones, la primera región Fc se asocia con la segunda región Fc mediante un enlace covalente. En algunas realizaciones, el enlace covalente es un enlace disulfuro.

También se divulga la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que la región a2 de FVIII comprende la secuencia de aminoácidos ISDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFS (SEQ ID NO: 106).

También se divulga la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que la semivida de la proteína quimérica es al menos aproximadamente 17 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 19 horas, al menos aproximadamente 20 horas, al menos aproximadamente 21 horas, al menos aproximadamente 22 horas, al menos aproximadamente 23 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 25 horas, al menos aproximadamente 26 horas, al menos aproximadamente 27 horas, al menos aproximadamente 28 horas, al menos aproximadamente 29 horas, al menos aproximadamente 30 horas, al menos aproximadamente 31 horas, al menos aproximadamente 32 horas, al menos aproximadamente 33 horas, al menos aproximadamente 34 horas, al menos aproximadamente 35 horas, al menos aproximadamente 36 horas, al menos aproximadamente 48 horas, al menos aproximadamente 60 horas, al menos aproximadamente 72 horas, al menos aproximadamente 84 horas, al menos aproximadamente 96 horas o al menos aproximadamente 108 horas. En algunas realizaciones, la semivida de la proteína quimérica es aproximadamente 40 horas en ratones HemA. En determinadas realizaciones, el fragmento de VWF no se une sustancialmente a un receptor de eliminación de VWF. En algunas realizaciones, el fragmento de VWF puede proteger la proteína FVIII de una o más escisiones por proteasa, proteger la proteína FVIII de la activación, estabilizar la cadena pesada y/o la cadena ligera de la proteína FVIII o evitar la eliminación de la proteína FVIII por uno o más receptores depuradores.

Algunas realizaciones incluyen la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que el fragmento de VWF inhibe o evita que VWF endógeno se una a la proteína FVIII protegiendo o bloqueando un sitio de unión a VWF en la proteína FVIII. En determinadas realizaciones, el sitio de unión de VWF está localizado en el dominio A3 o el dominio C2 de la proteína FVIII o tanto el dominio A3 como el dominio C2. En algunas realizaciones, el sitio de unión a VWF comprende la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 1669 a 1689 y 2303 a 2332 de SEQ ID NO: 65. En algunas realizaciones, la primera región Fc y la segunda región Fc son idénticas o diferentes. En determinadas realizaciones, la proteína FVIII se liga a y/o se inserta con al menos dos secuencias de XTEN, al menos tres secuencias de XTEN, al menos cuatro secuencias de XTEN, al menos cinco secuencias de XTEN o al menos seis secuencias de XTEN.

También se divulga la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que la proteína FVIII comprende, además del dominio A1, dominio A2 y una parte del dominio B, uno o más dominios de FVIII seleccionados de una región ácida a1, una región ácida a2, un dominio A3, una región ácida a3, un dominio C1, un dominio C2, uno o más fragmentos de los mismos, y cualquier combinación de los mismos.

5 También se divulga la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que el uno o más sitios de inserción adicionales en la proteína FVIII están localizados dentro de uno o más dominios de la proteína FVIII seleccionados del dominio A1, la región ácida a1, el dominio A2, la región ácida a2, el dominio A3, el dominio B, el dominio C1, el dominio C2 y cualquier combinación de los mismos o entre uno o más dominios de la proteína FVIII seleccionados del grupo que consiste en el dominio A1 y región ácida a1, la región ácida a1 y dominio A2, el dominio A2 y región ácida a2, la región ácida a2 y dominio B, el dominio B y dominio A3, el dominio A3 y dominio C1, el dominio C1 y dominio C2, y cualquier combinación de los mismos o entre dos dominios de la proteína FVIII seleccionados del dominio A1 y región ácida a1, la región ácida a1 y dominio A2, el dominio A2 y región ácida a2, la región ácida a2 y dominio B, el dominio B y dominio A3, el dominio A3 y dominio C1, el dominio C1 y dominio C2, y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el uno o más sitios de inserción adicionales en la proteína FVIII son uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los residuos aminoacídicos de la tabla 7, tabla 8, tabla 9 y tabla 10. En determinadas realizaciones, los sitios de inserción adicionales en la proteína FVIII están localizados inmediatamente posteriores al aminoácido 745 correspondiente a la proteína FVIII madura (SEQ ID NO: 65). En algunas realizaciones, los sitios de inserción adicionales en la proteína FVIII están localizados inmediatamente posteriores al residuo 1656 y residuo 1900 correspondientes a la proteína FVIII madura (SEQ ID NO: 65). En algunas realizaciones, los sitios de inserción adicionales en la proteína FVIII están inmediatamente posteriores a los residuos 26, 1656 y 1900 correspondientes a la proteína FVIII madura (SEQ ID NO: 65). En determinadas realizaciones, los sitios de inserción adicionales en la proteína FVIII están inmediatamente posteriores a los residuos 403 y 745 correspondientes a la proteína FVIII madura (SEQ ID NO: 65). En algunas realizaciones, los sitios de inserción adicionales en la proteína FVIII están inmediatamente posteriores a los residuos 745 y 1900 correspondientes a la proteína FVIII madura (SEQ ID NO: 65). En determinadas realizaciones, los sitios de inserción adicionales en la proteína FVIII están inmediatamente posteriores a los residuos 18 y 745 correspondientes a la proteína FVIII madura (SEQ ID NO: 65). En algunas realizaciones, la proteína FVIII es una isoforma de FVIII de cadena doble. En algunas realizaciones, la proteína FVIII es una isoforma de FVIII de cadena sencilla. También se divulga la proteína quimérica como se describe en este documento, que comprende al menos dos fragmentos de VWF, al menos tres fragmentos de VWF, al menos cuatro fragmentos de VWF, al menos cinco fragmentos de VWF o al menos seis frgmentos de VWF. En determinadas realizaciones, el fragmento de VWF comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 21. En algunas realizaciones, la proteína VWF consiste esencialmente en o consiste en los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 21. De acuerdo con la presente invención, la proteína VWF contiene una sustitución aminoacídica en el residuo 1099 y en el residuo 1142 de SEQ ID NO: 21. Por tanto, el fragmento de VWF contiene un aminoácido distinto de cisteína sustituido en un residuo correspondiente al residuo 1099 y residuo 1142 de SEQ ID NO: 21. En determinadas realizaciones, el fragmento de VWF comprende además el dominio D1, el dominio D2 o los dominios D1 y D2 de VWF.

40 Algunas realizaciones incluyen la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que el fragmento de VWF comprende además un dominio de VWF seleccionado del dominio A1, el dominio A2, el dominio A3, el dominio D4, el dominio B1, el dominio B2, el dominio B3, el dominio C1, el dominio C2, el dominio CK, uno o más fragmentos de los mismos, y cualquier combinación de los mismos.

45 También se divulga la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que el fragmento de VWF consiste esencialmente en o consiste en: (1) los dominios D' y D3 de VWF; (2) los dominios D1, D' y D3 de VWF; (3) los dominios D2, D' y D3 de VWF; (4) los dominios D1, D2, D' y D3 de VWF; o (5) los dominios D1, D2, D', D3 y A1 de VWF.

50 Algunas realizaciones incluyen la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que el fragmento de VWF comprende además un péptido señal de VWF o FVIII que está unido de forma funcional a la proteína VWF.

También se divulga la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que uno o más de los conectores tienen una longitud de al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 o 2000 residuos aminoacídicos. En algunas realizaciones, uno o más de los conectores tienen una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 residuos aminoacídicos. En determinadas realizaciones, uno o más de los conectores comprenden un péptido de gly/ser. En algunas realizaciones, el péptido de gly/ser tiene una fórmula de $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 94) o $\text{S}(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 164), en la que n es un número entero positivo seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En determinadas realizaciones, el conector $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ es $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ (SEQ ID NO: 100) o $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$ (SEQ ID NO: 165). En algunas realizaciones, el conector comprende 20 aminoácidos, 35 aminoácidos, 48 aminoácidos, 73 aminoácidos o 95 aminoácidos. En determinadas realizaciones, el conector escindible es SGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLVPRGSGG (SEQ ID NO: 166).

En algunas realizaciones, la proteína quimérica como se describe en este documento está polisialilada, pegilada o

hesilada.

5 También se divulga la proteína quimérica como se describe en este documento, en la que el primer polipéptido comprende al menos aproximadamente un 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % idéntico a FVIII161 (SEQ ID NO: 69), FVIII169 (SEQ ID NO: 70), FVIII173 (SEQ ID NO: 72), FVIII195 (SEQ ID NO: 73), FVIII196 (SEQ ID NO: 74), FVIII199 (SEQ ID NO: 75), FVIII201 (SEQ ID NO: 76), FVIII203 (SEQ ID NO: 77), FVIII204 (SEQ ID NO: 78), FVIII205 (SEQ ID NO: 79), FVIII266 (SEQ ID NO: 80), FVIII267 (SEQ ID NO: 81), FVIII268 (SEQ ID NO: 82), FVIII269 (SEQ ID NO: 83), FVIII271 (SEQ ID NO: 84), FVIII272 (SEQ ID NO: 85), o FVIII282 (SEQ ID NO: 159) y el segundo polipéptido
 10 comprende al menos aproximadamente un 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % idéntico a VWF057 (SEQ ID NO: 152) o VWF059 (SEQ ID NO: 197). En algunas realizaciones, el primer polipéptido comprende FVIII169 (SEQ ID NO: 70) y el segundo polipéptido comprende VWF057 (SEQ ID NO: 152). En otras realizaciones, el primero polipéptido comprende FVIII169 (SEQ ID NO: 70) y el segundo polipéptido comprende VWF059 (SEQ ID NO: 197). En otra realización más, el primer polipéptido comprende FVIII169 (SEQ ID NO: 70) y el segundo polipéptido comprende VWF062 (SEQ ID NO: 199). En algunas realizaciones, la proteína quimérica es eficaz en la prevención y/o detención
 15 de la hemorragia de un sujeto que lo necesita.

20 También se divulga un polinucleótido o un conjunto de polinucleótidos que codifica la proteína quimérica como se describe en este documento. En algunas realizaciones, el polinucleótido como se describe en este documento, comprende además una cadena polinucleotídica, que codifica PC5 o PC7.

También se divulga un vector que comprende el polinucleótido como se describe en este documento y uno o más promotores unidos de forma funcional al polinucleótido o el conjunto de polinucleótidos.

25 También se divulga una célula hospedadora que comprende el polinucleótido o el vector como se describe en este documento. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de mamífero. En determinadas realizaciones la célula de mamífero se selecciona de célula HEK293, célula CHO y célula BHK.

30 También se divulga una composición farmacéutica que comprende la proteína quimérica, el polinucleótido, el vector o la célula hospedadora como se describe en este documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la proteína quimérica tiene semivida prolongada en comparación con la proteína FVIII de tipo silvestre. En determinadas realizaciones, la semivida de la proteína quimérica se prolonga al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces o al menos aproximadamente 12 veces más
 35 que FVIII de tipo silvestre.

40 Algunas realizaciones incluyen la composición como se describe en este documento, en la que la semivida de la proteína quimérica es al menos aproximadamente 17 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 19 horas, al menos aproximadamente 20 horas, al menos aproximadamente 21 horas, al menos aproximadamente 22 horas, al menos aproximadamente 23 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 25 horas, al menos aproximadamente 26 horas, al menos aproximadamente 27 horas, al menos aproximadamente 28 horas, al menos aproximadamente 29 horas, al menos aproximadamente 30 horas, al menos aproximadamente 31 horas, al menos aproximadamente 32 horas, al menos aproximadamente 33 horas, al menos
 45 aproximadamente 34 horas, al menos aproximadamente 35 horas, al menos aproximadamente 36 horas, al menos aproximadamente 48 horas, al menos aproximadamente 60 horas, al menos aproximadamente 72 horas, al menos aproximadamente 84 horas, al menos aproximadamente 96 horas o al menos aproximadamente 108 horas. En determinadas realizaciones, la semivida de la proteína quimérica es aproximadamente 40 horas en ratones HemA. En algunas realizaciones, la composición como se describe en este documento se administra mediante una vía seleccionada del grupo que consiste en administración tópica, administración intraocular, administración parenteral, administración intratecal, administración subdural y administración oral. En determinadas realizaciones, la administración parenteral es administración intravenosa o subcutánea.

50 En algunas realizaciones, la composición como se describe en este documento es para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección hemorrágica en un sujeto que lo necesita. En determinadas realizaciones, la enfermedad o afección hemorrágica se selecciona del grupo que consiste en un trastorno hemorrágico de coagulación, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia en músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo en la cabeza, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de hueso, sangrado en el sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, sangrado en la vaina del iliopsoas y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el sujeto se somete a cirugía programada. En determinadas realizaciones, el tratamiento es
 60 profiláctico o a demanda.

65 Aspectos y realizaciones adicionales llegarán a ser evidentes a partir del conjunto de reivindicaciones adjunto y la descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos/figuras

- La figura 1 muestra un diagrama esquemático de una proteína quimérica que comprende un primer polipéptido que comprende una proteína FVIII (A1-A2-parcial o completo B-A3-C1-C2) fusionado a una región Fc, en la que se inserta un XTEN en un sitio de inserción dentro de la proteína FVIII y un segundo polipéptido que comprende una proteína VWF que comprende dominios D'D3, un XTEN que tiene menos de 288 aminoácidos, un conector escindible por trombina, y una segunda región Fc. Las inserciones de XTEN en la proteína FVIII y/o las fusiones a la proteína VWF prolongan la semivida de la proteína quimérica aumentando el radio hidrodinámico y bloqueando la eliminación mediada por receptor. Los dominios D'D3 de VWF bloquean la interacción de FVIII con VWF endógeno, estabilizan la proteína FVIII y prolongan la semivida de la proteína quimérica. Los dominios Fc pueden ligar covalentemente los dominios D'D3 con la proteína FVIII y prolongar la semivida de la proteína quimérica a través de la ruta de reciclado mediada por FcRn. El conector escindible por trombina posibilita la liberación de los dominios D'D3 tras activación de FVIII y garantiza la correcta alineación entre FVIII y los dominios D'D3 de VWF.
- La figura 2 muestra un sistema de expresión de tres plásmidos para heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc:D'D3-XTEN-Fc: un primer plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica FVIII-XTEN-Fc monocatenario en que se inserta un XTEN en el dominio B; un segundo plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica D1D2D'D3-XTEN-Fc, en que la secuencia de XTEN comprende menos de 288 aminoácidos; y un tercer plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica PACE, una enzima procesadora de propeptidos. Cuando los tres polipéptidos se expresan a partir de los tres plásmidos, los dominios propeptídicos D1D2 de VWF pueden procesarse a partir de los dominios D'D3 por procesamiento intracelular. El complejo resultante contiene tres productos, siendo la primera molécula heterodímeros de FVIII-XTEN/D'D3, siendo la segunda molécula un subproducto, homodímero de D'D3-XTEN-Fc, y siendo la tercera molécula otro subproducto, es decir, FVIII(XTEN)-Fc.
- La figura 3 muestra los efectos aditivos de las inserciones de XTEN sobre la prolongación de la semivida de los heterodímeros. FVIII169 comprende una proteína FVIII con el dominio B eliminado, fusionada a una región Fc, en la que se inserta una secuencia de XTEN (por ejemplo, AE288) en el aminoácido 745 correspondiente a FVIII de longitud completa maduro. FVIII205 comprende una proteína FVIII con el dominio B eliminado, fusionada a una región Fc, en la que se inserta una secuencia de XTEN (por ejemplo, AE144) en el aminoácido 18 correspondiente a FVIII de longitud completa maduro y se inserta otra secuencia de XTEN (por ejemplo, AE288) en el aminoácido 745 correspondiente a FVIII de longitud completa maduro. VWF031 comprende un dominio D' y un dominio D3 de VWF fusionado a una región Fc mediante un conector escindible por trombina (que no es XTEN). VWF034 comprende un dominio D' y un dominio D3 de VWF fusionado a AE288 y una región Fc. La semivida de FVIII169/VWF031 (triángulo invertido) es 16,7 horas en ratones HemaA; la semivida de FVIII205/VWF031 (círculo) es 29,4 horas en ratones HemaA; y la semivida de FVIII169/VWF034 (cuadrado) es 31,1 horas en ratones HemaA.
- La figura 4 muestra que un XTEN AE144 confiere mejor prolongación de la semivida que un XTEN AE288 cuando se inserta entre los dominios D'D3 de VWF y los dominios Fc. Por ejemplo, aunque la semivida de VWF169/VWF034 (cuadrado) es 31,1 horas en ratones HemaA, la semivida de FVIII169/VWF057 (círculo) es 42 horas en ratones HemaA. VWF057 comprende dominios D'D3 de VWF fusionados a un AE144 y una región Fc.
- La figura 5 muestra que los dominios Fc son necesarios para la prolongación de la semivida de los heterodímeros de la proteína quimérica. Cuando la semivida de FVIII205/VWF031 (círculo) se comparaba en ratones HemaA con la de FVIII263/VWF050 (cuadrado), que contiene mutaciones en los sitios de unión a FcRn (Fc con triple mutación IHH) y, por tanto, no podía reciclarse a través de la ruta de FcRn, la semivida de FVIII263/VWF050 (23 horas) es más corta que la de VWF205/VWF031 (29,4 horas). Esto indica que las regiones Fc son necesarias para la prolongación de la semivida.
- La figura 6A muestra eficacia aguda similar de heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc en comparación con FVIII con el dominio B eliminado (FVIII BDD SQ) en modelo de perforación de la cola de ratones HemaA. A los ratones se les dosificó 75 UI/kg, y se midió la actividad por ensayo de aPTT. FVIII BDD SQ se muestra como un círculo, mientras que FVIII169/VWF034 se muestra como un cuadrado, FVIII169/VWF057 se muestra como un rombo y el vehículo se muestra como un triángulo invertido. Los detalles de construcción de FVIII169, VWF034 y VWF057 se muestran en otra parte en este documento. La figura 6B muestra una comparación de la eficacia aguda de FVIII169/VWF034 con FVIII con el dominio B eliminado (FVIII BDD SQ) en ratones HemaA a dosis de 37,5 UI/kg, y se midió la actividad mediante ensayo de aPTT. La mediana de pérdida de sangre (ul) de ratones en cada grupo de tratamiento se indica mediante las líneas horizontales, la pérdida de sangre (ul) en ratones C57BL6 se muestra como un triángulo vacío; la pérdida de sangre (ul) después de dosificar 37,5 UI/kg de rBDD-FVIII se muestra como un círculo vacío; la pérdida de sangre (ul) después de dosificar 37,5 UI/kg de FVIII169/VWF034 se muestra como un cuadrado vacío y la pérdida de sangre (ul) después de dosificar el vehículo se muestra como un triángulo invertido.
- Las figuras 7A-B muestran que el heterodímero de rFVIII169/VWF057 proporciona protección más larga a ratones HemaA en modelo de hemorragia por corte transversal de la vena de la cola. La figura 7A muestra los datos de hemorragia recurrente en ratones que recibieron rFVIII169/VWF057 a las 72 horas antes de la lesión en la cola (cuadrado), FVIII BDD SQ a las 48 horas antes de la lesión en la cola (rombo), FVIII BDD SQ a las 24 horas antes de

la lesión en la cola (triángulo invertido) y vehículo (círculo). Se midió la actividad mediante ensayo de aPTT. El eje de abscisas muestra el tiempo en horas, y el eje de ordenadas muestra el porcentaje de no hemorrágicos. La figura 7B muestra los datos de supervivencia correspondientes en las cuatro categorías de los ratones mostrados en la figura 7A. Los ratones que recibieron 12 UI/kg de FVIII169/VWF057 72 horas antes de la lesión en la cola mostraron protección similar en hemorragia recurrente y supervivencia en comparación con los ratones que recibieron tratamiento con FVIII BDD SQ 24 horas antes de la lesión en la cola.

La figura 8A muestra los datos de hemorragia recurrente comparable en ratones que recibieron heterodímeros de rFVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc a las 96 horas frente a rBDD-FVIII a las 24 horas antes de la lesión. Los cuadrados rellenos muestra los datos de hemorragia recurrente en ratones que recibieron FVIII169/VWF034 a las 24 horas antes de la lesión; los cuadrados vacíos muestran los datos de hemorragia recurrente en ratones que recibieron FVIII169/VWF034 a las 96 horas antes de la lesión; los rombos rellenos muestran los datos de hemorragia recurrente en ratones que recibieron FVIII169/VWF057 a las 24 horas antes de la lesión; los rombos vacíos muestran los datos de hemorragia recurrente en ratones que recibieron FVIII169/VWF057 a las 96 horas antes de la lesión; los círculos rellenos muestran los datos de hemorragia recurrente en ratones que recibieron rBDD-FVIII a las 24 horas antes de la lesión; los círculos vacíos muestran los datos de hemorragia recurrente en ratones que recibieron rBDD-FVIII a las 48 horas antes de la lesión; y los triángulos rellenos muestran los datos de hemorragia recurrente en ratones que recibieron vehículo. El eje de abscisas muestra el tiempo en horas, y el eje de ordenadas muestra el porcentaje de no hemorrágicos.

La figura 8B muestra la curva de supervivencia en ratones que recibieron heterodímeros de rFVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc a las 96 horas frente a rBDD-FVIII a las 24 horas antes de la lesión. El eje de abscisas muestra el tiempo en horas, y el eje de ordenadas muestra el porcentaje de supervivencia. Los símbolos son iguales que en la figura 8A.

La figura 9 muestra un diagrama de heterodímeros de FVIII-VWF representativos y construcciones de FVIII169, FVIII286, VWF057, VWF059 y VWF062. Por ejemplo, la construcción de FVIII169 comprende una proteína FVIII con el dominio B eliminado con sustitución R1648A fusionada a una región Fc, en la que se inserta una secuencia de XTEN (por ejemplo, AE288) en el aminoácido 745 correspondiente a FVIII de longitud completa maduro (A1-a1-A2-a2-288XTEN-a3-A3-C1-C2-Fc). La construcción de FVIII286 comprende una proteína FVIII con el dominio B eliminado con sustitución R1648 fusionada a una región Fc, en la que se inserta una secuencia de XTEN (por ejemplo, AE288) en el aminoácido 745 correspondiente a FVIII de longitud completa maduro, con región a2 adicional entre FVIII y Fc (A1-a1-A2-a2-288XTEN-a3-A3-C1-C2-a2-Fc). VWF057 es una construcción de fusión de VWF-Fc que comprende el dominio D'D3 de la proteína VWF (con dos sustituciones aminoacídicas en el dominio D'D3, es decir, C336A y C379A) ligada a la región Fc mediante un conector de VWF, que comprende el sitio de trombina LVPRG ("LVPRG"; SEQ ID NO: 6) y el conector GS ("GS"), en la que se inserta una secuencia de XTEN (es decir, AE144) entre el dominio D'D3 y el conector de VWF (D'D3-144XTEN-GS+LVPRG-Fc). VWF059 es una construcción de fusión de VWF-Fc que comprende el dominio D'D3 de la proteína VWF (con dos sustituciones aminoacídicas en el dominio D'D3, es decir, C336A y C379A) ligada a la región Fc mediante una región ácida 2 (a2) de FVIII como un conector de VWF, en la que se inserta una secuencia de XTEN (es decir, AE144) entre el dominio D'D3 y el conector de VWF. VWF062 es una construcción de fusión de VWF-Fc que comprende el dominio D'D3 de la proteína VWF (con dos sustituciones aminoacídicas en el dominio D'D3, es decir, C336A y C379A) ligada a la región Fc, en la que se inserta una secuencia de XTEN (es decir, AE144) entre el dominio D'D3 y la región Fc (D'D3-144XTEN-Fc).

La figura 10 muestra un diagrama esquemático que representa construcciones heterodiméricas de FVIII/VWF, por ejemplo, FVIII169/VWF057, FVIII169/VWF059, FVIII 169/VWF059A y FVIII169/VWF073. La flecha muestra el sitio donde se añade un conector opcional para introducir un sitio de escisión por trombina. FVIII169/VWF057 tiene un conector que comprende LVPRG (SEQ ID NO: 6). FVIII169/VWF059 tiene un conector que comprende la región a2 de FVIII (es decir, ISDKNTGDYYEPSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSDKTH (SEQ ID NO: 106)). FVIII169/VWF059A tiene un conector que comprende una región a2 de FVIII truncada (es decir, DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSDKTH (SEQ ID NO: 88)). FVIII169/VWF073 tiene un conector dentro de la construcción de VWF073 (SEQ ID NO: 175) que comprende un fragmento de la región a2 de FVIII que consiste en IEPRFS (SEQ ID NO: 194).

Las figuras 11A-C muestran imágenes de SDS-PAGE después de digestión con trombina de FVIII169/VWF057 y un control de FVIII-Fc. La figura 11A muestra la tinción del gel de SDS-PAGE con un anticuerpo anti-D3 (AB 96340). Las flechas resaltan "LCFc:D'D3-XTEN-Fc", que es FVIII169/VWF057 de longitud completa sin escindir; y "D'D3-144 XTEN", que es el fragmento resultante después de escisión mediante trombina. La figura 11B muestra la tinción del gel de SDS-PAGE con un anticuerpo anti-HC (GMA012). Las flechas resaltan la cadena pesada de FVIII ("HC") y el dominio A2 de FVIII. La figura 11C muestra la superposición de los paneles A y B. Se recogieron muestras en los puntos temporales indicados en la parte superior de cada panel. Las flechas señalan las proteínas pertinentes.

Las figuras 12A-C muestran imágenes de SDS-PAGE después de digestión con trombina de FVIII169/VWF059. La figura 12A muestra la tinción del gel de SDS-PAGE con un anticuerpo anti-D3 (AB 96340). Las flechas resaltan "LCFc:D'D3-XTEN-Fc", que es FVIII169/VWF059 de longitud completa sin escindir; y "D'D3-144 XTEN", que es el fragmento resultante después de escisión mediante trombina. La figura 12B muestra la tinción del gel de SDS-PAGE con un anticuerpo anti-HC (GMA012). Las flechas resaltan FVIII169/VWF059 de longitud completa sin escindir; D'D3-

144 XTEN-a3, que es el fragmento resultante después de escisión mediante trombina; y "A2", que es el dominio A2 de FVIII. La figura 12C muestra la superposición de los paneles A y B. Se recogieron muestras en los puntos temporales indicados en la parte superior de cada panel.

- 5 La figura 13 muestra los datos de eficacia aguda de ratones HemA tratados con FVIII169/VWF059 (círculo) en comparación con ratones HemA tratados con un control de BDD-FVIII (cuadrado). Se midió el valor de pérdida de sangre después de perforación de cola. $p = 0,9883$.

Descripción detallada de la invención

10

La presente invención se refiere a una proteína quimérica como se define en la reivindicación 1.

I. Definiciones

- 15 Debe apreciarse que el término "un/o" o "una" entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "una secuencia de nucleótidos" representa una o más secuencias de nucleótidos. Por tanto, las expresiones "un/o" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en este documento.

- 20 Además, "y/o" cuando se usa en este documento debe aceptarse como divulgación específica de cada uno de los dos elementos o componentes especificados con o sin el otro. Por tanto, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A y/o B" en este documento pretende incluir "A y B," "A o B," "A" (en solitario) y "B" (en solitario). Asimismo, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A, B y/o C" pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (en solitario); B (en solitario); y C (en solitario).

- 25 Se entiende que en cualquier parte que se describan aspectos en este documento con la expresión "que comprende", también se proporcionan aspectos análogos de otro modo descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

- 30 Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que se refiere esta divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2.^a ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3.^a ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos usados en esta divulgación.

35

- Las unidades, prefijos y símbolos se indican en la forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Salvo que se indique de otro modo, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amínica a carboxílica. Los encabezados proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos de la divulgación, que se puede obtener por referencia a la memoria descriptiva como un todo. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

40

- 45 El término "aproximadamente" se usa en para indicar de forma aproximada a, prácticamente, alrededor de o en las regiones de. Cuando el término "aproximadamente" se usa junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo ampliando los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. En general, el término "aproximadamente" puede modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado mediante una variación de, por ejemplo, un 10 por ciento, por encima o por debajo (mayor o menor).

- 50 Se pretende que el término "polinucleótido" o "nucleótido" abarque un ácido nucleico único, así como múltiples ácidos nucleicos, y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN plasmídico (ADNp). En determinadas realizaciones, un polinucleótido comprende un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en ácidos peptidonucleicos (APN)). La expresión "ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha retirado de su entorno natural. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido de factor VIII contenido en un vector se considera aislado para los propósitos de la presente invención. Ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospedadoras heterólogas o purificados (parcial o sustancialmente) de otros polinucleótidos en una solución. Moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente invención. Polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente invención incluyen además dichas moléculas producidas de forma sintética. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede incluir elementos reguladores tales como promotores, potenciadores, sitios de unión al ribosoma o señales de terminación de la transcripción.

60

- 65 Como se usa en este documento, una "región codificante" o "secuencia codificante" es una parte de polinucleótido que consiste en codones traducibles en aminoácidos. Aunque típicamente un "codón de parada" (TAG, TGA o TAA)

- no se traduce en un aminoácido, puede considerarse que forma parte de una región codificante, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión al ribosoma, terminadores transcripcionales, intrones y similares, no forman parte de una región codificante. Los límites de una región codificante se determinan típicamente mediante un codón de inicio en el extremo 5', que codifica el extremo amínico del polipéptido resultante, y un codón de parada traduccional en el extremo 3', que codifica el extremo carboxílico del polipéptido resultante. Dos o más regiones codificantes de la presente invención pueden estar presentes en una sola construcción polinucleotídica, por ejemplo, en un solo vector, o en construcciones polinucleotídicas separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Se deduce, entonces, que un solo vector puede contener exactamente una sola región codificante, o comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un solo vector puede codificar por separado un dominio de unión A y un dominio de unión B como se describe a continuación. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, fusionadas o no fusionadas a un ácido nucleico que codifica un dominio de unión de la invención. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo.
- 15 Determinadas proteínas secretadas por células de mamífero se asocian con un péptido señal secretor que se escinde de la proteína madura una vez se ha iniciado la exportación de la cadena proteínica creciente a través del retículo endoplásmico rugoso. Los expertos en la materia son conscientes de que los péptidos señal en general se fusionan en el extremo N del polipéptido, y se escinden del polipéptido completo o "de longitud completa" para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinadas realizaciones, un péptido señal natural o un derivado funcional de esa secuencia que retiene la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido se asocia de manera funcional con el mismo. Como alternativa, puede usarse un péptido señal de mamífero heterólogo, por ejemplo, un péptido señal del activador tisular del plasminógeno (TPA) humano o la β -glucuronidasa de ratón, o un derivado funcional del mismo.
- 25 El término "posterior", cuando se refiere a una secuencia de nucleótidos, significa que un ácido nucleico o una secuencia de nucleótidos está ubicada 3' a una secuencia de nucleótidos de referencia. En determinadas realizaciones, las secuencias de nucleótidos posteriores se refieren a secuencias que siguen al punto de inicio de la transcripción. Por ejemplo, el codón de inicio de la traducción de un gen está ubicado posterior del sitio de inicio de la transcripción. El término "posterior", cuando se refiere a una secuencia polipeptídica, significa que el aminoácido o un sitio de inserción de aminoácido está ubicado en el extremo C de los aminoácidos de referencia. Por ejemplo, un sitio de inserción inmediatamente posterior del aminoácido 745 correspondiente a la proteína FVIII de tipo silvestre madura significa que el sitio de inserción está entre el aminoácido 745 y el aminoácido 746 correspondientes a la proteína FVIII de tipo silvestre madura.
- 35 El término "anterior" se refiere a una secuencia de nucleótidos que está ubicada 5' a una secuencia de nucleótidos de referencia. En determinadas realizaciones, las secuencias de nucleótidos anteriores se refieren a secuencias que están ubicadas en el lado 5' de una región codificante o punto de inicio de la transcripción. Por ejemplo, la mayoría de los promotores están ubicados anteriores al sitio de inicio de la transcripción.
- 40 Como se usa en este documento, la expresión "región reguladora" se refiere a secuencias de nucleótidos ubicadas anteriores (secuencias no codificantes 5'), dentro de, o posteriores (secuencias no codificantes 3') de una región codificante, y que influyen en la transcripción, procesamiento del ARN, estabilidad o traducción de la región codificante asociada. Las regiones reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitios de procesamiento de ARN, sitios de unión de efectores y estructuras de tallo-bucle. Si una región codificante está destinada a expresión en una célula eucariótica, una señal de poliadenilación y secuencia de terminación de la transcripción habitualmente estarán ubicadas 3' a la secuencia codificante.
- 50 Un polinucleótido que codifica un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, puede incluir un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o traducción asociados de forma funcional con una o más regiones codificantes. En una asociación funcional, una región codificante de un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más regiones reguladoras de tal manera que sitúe la expresión del producto génico bajo la influencia o control de la región o regiones reguladoras. Por ejemplo, una región codificante y un promotor están "asociados de forma funcional" si la inducción de la función promotora provoca la transcripción del ARNm que codifica el producto génico codificado por la región codificante, y si la naturaleza de la vinculación entre el promotor y la región codificante no interfiere con la capacidad del promotor de dirigir la expresión del producto génico o no interfiere con la capacidad del molde de ADN de transcribirse. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, también pueden asociarse de forma funcional con una región codificante para dirigir la expresión del producto génico.
- 60 Los expertos en la materia conocen una diversidad de regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción que funcionan en células de vertebrado, tales como, aunque sin limitación, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (el promotor temprano inmediato, junto con intrón-A), virus de simio 40 (el promotor temprano) y retrovirus (tal como virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrado tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovina y β -globina de conejo, así como otras secuencias que pueden controlar la expresión génica en células eucarióticas. Regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen

promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles por linfocinas (por ejemplo, promotores inducibles por interferones o interleucinas).

5 Asimismo, los expertos en la materia conocen una diversidad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, aunque sin limitación, sitios de unión al ribosoma, codones de inicio y terminación de la traducción, y elementos derivados de picornavirus (particularmente un sitio interno de entrada del ribosoma, o IRES, también denominado secuencia CITE).

10 El término "expresión", como se usa en este documento, se refiere a un proceso por el que un polinucleótido produce un producto génico, por ejemplo, un ARN o un polipéptido. Incluye, sin limitación, la transcripción del polinucleótido en ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN en horquilla pequeño (ARNhp), ARN interferente pequeño (ARNip) o cualquier otro producto de ARN, y la traducción de un ARNm en un polipéptido. La expresión produce un "producto génico". Como se usa en este documento, un producto génico puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido por transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce desde un transcrito.

15 Los productos génicos descritos en este documento incluyen además ácidos nucleicos con modificaciones postranscripcionales, por ejemplo, poliadenilación o empalme, o polipéptidos con modificaciones postraduccionales, por ejemplo, metilación, glucosilación, adición de lípidos, asociación con otras subunidades proteínicas o escisión proteolítica.

20 Un "vector" se refiere a cualquier vehículo para la clonación y/o transferencia de un ácido nucleico en una célula hospedadora. Un vector puede ser un replicón al que puede unirse otro segmento de ácido nucleico para conseguir la replicación del segmento unido. Un "replicón" se refiere a cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que funcione como una unidad autónoma de replicación *in vivo*, es decir, con capacidad de replicación bajo su propio control. El término "vector" incluye vehículos tanto víricos como no víricos para introducir el ácido nucleico en una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Se conoce y se usa una gran cantidad de vectores en la técnica incluyendo, por ejemplo, plásmidos, virus eucarióticos modificados o virus bacterianos modificados. La inserción de un polinucleótido en un vector adecuado puede realizarse ligando los fragmentos polinucleotídicos apropiados en un vector escogido que tiene extremos cohesivos complementarios.

30 Los vectores pueden manipularse para que codifiquen marcadores de selección o indicadores que proporcionan la selección o identificación de células que tienen el vector incorporado. La expresión de marcadores de selección o indicadores permite la identificación y/o selección de células hospedadoras que incorporan y expresan otras regiones codificantes contenidas en el vector. Ejemplos de genes marcadores de selección conocidos y usados en la técnica incluyen: genes que proporcionan resistencia a ampicilina, estreptomina, gentamicina, kanamicina, higromicina, herbicida bialafós, sulfonamida y similares; y genes que se usan como marcadores fenotípicos, es decir, genes reguladores de antocianina, gen de la isopentanol transferasa y similares. Ejemplos de indicadores conocidos y usados en la técnica incluyen: luciferasa (Luc), proteína fluorescente verde (GFP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), -galactosidasa (LacZ), -glucuronidasa (Gus) y similares. Los marcadores de selección también pueden considerarse indicadores.

40 El término "plásmido" se refiere a un elemento extracromosómico que a menudo porta un gen que no forma parte del metabolismo central de la célula, y habitualmente en forma de moléculas de ADN bicatenarias circulares. Dichos elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias de integración genómica, secuencias fágicas o de nucleótidos, lineales, circulares o superenrolladas, de un ADN o ARN mono- o bicatenario, derivadas de cualquier fuente, en que varias secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una construcción única que puede introducir un fragmento promotor y secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con una secuencia sin traducir 3' apropiada en una célula.

50 Vectores víricos eucarióticos que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, vectores adenovíricos, vectores retrovíricos, vectores víricos adenoasociados y poxvirus, por ejemplo, vectores víricos variolovacunales, vectores baculovíricos o vectores herpesvíricos. Vectores no víricos incluyen plásmidos, liposomas, líquidos cargados eléctricamente (citofectinas), complejos de ADN-proteína y biopolímeros.

55 Un "vector de clonación" se refiere a un "replicón", que es una longitud unitaria de un ácido nucleico que se replica secuencialmente y que comprende un origen de replicación, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que puede unirse otro segmento de ácido nucleico para conseguir la replicación del segmento unido. Determinados vectores de clonación tienen capacidad de replicación en un tipo de célula, por ejemplo, bacterias y expresión en otro, por ejemplo, células eucarióticas. Los vectores de clonación típicamente comprenden una o más secuencias que pueden usarse para la selección de células que comprenden el vector y/o uno o más sitios de clonación múltiple para la inserción de secuencias de ácido nucleico de interés.

60 La expresión "vector de expresión" se refiere a un vehículo diseñado para posibilitar la expresión de una secuencia de ácido nucleico insertada después de su inserción en una célula hospedadora. La secuencia de ácido nucleico insertada se sitúa en asociación funcional con regiones reguladoras como se describe anteriormente.

65 Los vectores se introducen en células hospedadoras por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo,

transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión de células, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, lipofección (fusión de lisosomas), uso de una pistola génica o un transportador de vector de ADN.

5 "Cultivo", "cultivar" y "cultivando", como se usan en este documento, significan incubar células en condiciones *in vitro* que permitan el crecimiento o división celular o para mantener las células en un estado vivo. "Células cultivadas", como se usa en este documento, significa células que se propagan *in vitro*.

10 Como se usa en este documento, el término "polipéptido" pretende abarcar un "polipéptido" único, así como múltiples "polipéptidos", y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) unidos linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por tanto, se incluyen péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos" o cualquier otro término usado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" puede usarse en lugar de, o indistintamente con cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" puede usarse en lugar de, o indistintamente con cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de modificaciones tras la expresión del polipéptido incluyendo, sin limitación, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica o modificación mediante aminoácidos que no son de origen natural. Un polipéptido puede obtenerse de una fuente biológica natural o producirse por tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Puede generarse de cualquier manera, incluyendo por síntesis química.

20 Un polipéptido "aislado" o un fragmento, variante o derivado del mismo se refiere a un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere un nivel particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado simplemente puede retirarse de su entorno original o natural. Las proteínas y polipéptidos producidos de forma recombinante expresados en células hospedadoras se consideran aislados para el propósito de la invención, ya que son polipéptidos naturales o recombinantes que se han separado, fraccionado o purificado parcial o sustancialmente por cualquier técnica adecuada.

25 También se incluyen en la presente invención fragmentos o variantes de polipéptidos, y cualquier combinación de los mismos. El término "fragmento" o "variante", cuando se refiere a dominios de unión o moléculas de unión a polipéptido de la presente invención incluyen cualquier polipéptido que retenga al menos algunas de las propiedades (por ejemplo, afinidad de unión a FcRn para un dominio de unión a FcRn o variante de Fc, actividad de coagulación para una variante de FVIII, o actividad de unión a FVIII para el fragmento de VWF) del polipéptido de referencia. Fragmentos de polipéptidos incluyen fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de eliminación, además de fragmentos de anticuerpo específicos analizados en otra parte en este documento, pero no incluyen el polipéptido de longitud completa de origen natural (o polipéptido maduro). Variantes de dominios de unión o moléculas de unión a polipéptido de la presente invención incluyen fragmentos como se describe anteriormente, y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones aminoacídicas, eliminaciones o inserciones. Las variantes pueden ser de origen natural o no natural. Las variantes que no son de origen natural pueden producirse usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Los polipéptidos variantes pueden comprender sustituciones aminoacídicas conservativas o no conservativas, eliminaciones o adiciones.

30 La expresión "proteína VWF" o "proteínas VWF" usada en este documento significa cualquier fragmento de VWF que interactúe con FVIII y retenga al menos una o más propiedades que se proporcionan normalmente a FVIII mediante VWF de longitud completa, por ejemplo, prevención de la activación prematura de FVIIIa, prevención de la proteólisis prematura, prevención de la asociación con membranas fosfolípídicas que podría dar lugar a eliminación prematura, prevención de la unión a receptores de eliminación de FVIII que pueden unirse a FVIII desnudo, pero no a FVIII unido a VWF, y/o estabilización de las interacciones de la cadena pesada y cadena ligera de FVIII.

35 Una "sustitución aminoacídica conservativa" es una en que el residuo aminoacídico se reemplaza con un residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, si un aminoácido en un polipéptido se reemplaza con otro aminoácido de la misma familia de cadena lateral, la sustitución se considera conservativa. En otra realización, una serie de aminoácidos puede reemplazarse de forma conservativa con una serie estructuralmente similar que difiere en el orden y/o composición de miembros de la familia de cadena lateral.

40 Como se sabe en la técnica, la "identidad de secuencia" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Cuando se analiza en este documento, que cualquier polipéptido particular sea al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % idéntico a otro polipéptido puede determinarse usando métodos y programas informáticos o de ordenador conocidos en la técnica tales como, aunque sin limitación, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence

Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981), para hallar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa BESTFIT o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un 95 % idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente invención, los parámetros se establecen, por supuesto, de modo que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud completa de la secuencia polipeptídica de referencia y que se permitan huecos en la homología de hasta un 5 % del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Como se usa en este documento, un "aminoácido correspondiente a" o un "aminoácido equivalente" en una secuencia de VWF o una secuencia de la proteína FVIII se identifica por alineación para maximizar la identidad o similitud entre una primera secuencia de VWF o FVIII y una segunda secuencia de VWF o FVIII. El número usado para identificar un aminoácido equivalente en una segunda secuencia de VWF o FVIII se basa en el número usado para identificar el aminoácido correspondiente en la primera secuencia de VWF o FVIII.

Como se usa en este documento, la expresión "sitio de inserción" se refiere a una posición en un polipéptido de FVIII, o fragmento, variante o derivado del mismo, que está inmediatamente anterior de la posición en la que puede insertarse un resto heterólogo. Un "sitio de inserción" se especifica como un número, siendo este número el número del aminoácido en el FVIII natural maduro (SEQ ID NO: 65) al que corresponde el sitio de inserción, que está inmediatamente N terminal a la posición de la inserción. Por ejemplo, la expresión "a3 comprende un XTEN en un sitio de inserción que corresponde al aminoácido 1656 de SEQ ID NO: 65" indica que el resto heterólogo está ubicado entre dos aminoácidos correspondientes al aminoácido 1656 y el aminoácido 1657 de SEQ ID NO: 65.

La expresión "inmediatamente posterior de un aminoácido", como se usa en este documento, se refiere una posición exactamente al lado del grupo carboxilo terminal del aminoácido. Asimismo, la expresión "inmediatamente anterior de un aminoácido" se refiere a la posición exactamente al lado del grupo amina terminal del aminoácido. Por lo tanto, la expresión "entre dos aminoácidos de un sitio de inserción", como se usa en este documento, se refiere a una posición en que un XTEN o cualquier otro polipéptido se inserta entre dos aminoácidos adyacentes. Por tanto, las expresiones "insertado inmediatamente posterior de un aminoácido" e "insertado entre dos aminoácidos de un sitio de inserción" se usan como sinónimos de "insertado en un sitio de inserción".

Las expresiones "insertado", "se inserta", "insertado en" o expresiones gramaticalmente relacionadas, como se usan en este documento, se refieren a la posición de un XTEN en un polipéptido quimérico con respecto a la posición análoga en FVIII humano maduro natural. Como se usan en este documento, las expresiones se refieren a las características del polipéptido de FVIII recombinante con respecto a FVIII humano maduro natural, y no indican, implican o insinúan ningún método o proceso por el que se preparó el polipéptido quimérico. Por ejemplo, en referencia a un polipéptido quimérico proporcionado en este documento, la expresión "se inserta un XTEN inmediatamente posterior al residuo 745 del polipéptido de FVIII" significa que el polipéptido quimérico comprende un XTEN inmediatamente posterior de un aminoácido que corresponde al aminoácido 745 en FVIII humano maduro natural, por ejemplo, unido por aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 745 y 746 de FVIII humano maduro natural.

Una proteína "de fusión" o "quimérica" comprende una primera secuencia de aminoácidos ligada a una segunda secuencia de aminoácidos con la que no está ligada de forma natural en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos que existen normalmente en proteínas separadas pueden ponerse juntas en el polipéptido de fusión, o las secuencias de aminoácidos que existen normalmente en la misma proteína pueden colocarse en una nueva disposición en el polipéptido de fusión, por ejemplo, fusión de un dominio de factor VIII de la invención con un dominio Fc de Ig. Una proteína de fusión se crea, por ejemplo, por síntesis química, o creando y traduciendo un polinucleótido en que las regiones peptídicas están codificadas en la relación deseada. Una proteína quimérica puede comprender además una segunda secuencia de aminoácidos asociada con la primera secuencia de aminoácidos mediante un enlace covalente no peptídico o un enlace no covalente.

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

El término "ligado", como se usa en este documento, se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos unida covalente o no covalentemente a una segunda secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos, respectivamente. La primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos puede unirse o yuxtaponerse directamente a la segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos o, como alternativa, una secuencia intermedia

puede unir covalentemente la primera secuencia a la segunda secuencia. El término "ligado" significa no solamente una fusión de una primera secuencia de aminoácidos a una segunda secuencia de aminoácidos en el extremo C o el extremo N, sino que también incluye la inserción de la primera secuencia de aminoácidos completa (o la segunda secuencia de aminoácidos) en dos aminoácidos cualesquiera en la segunda secuencia de aminoácidos (o la primera secuencia de aminoácidos, respectivamente). En una realización, la primera secuencia de aminoácidos puede ligarse a una segunda secuencia de aminoácidos mediante un enlace peptídico o un conector. La primera secuencia de nucleótidos puede ligarse a una segunda secuencia de nucleótidos mediante un enlace fosfodiéster o un conector. El conector puede ser un péptido o un polipéptido (para cadenas polinucleotídicas) o un nucleótido o cadena de nucleótidos (para cadenas de nucleótidos) o cualquier resto químico (tanto para cadenas polipeptídicas como polinucleotídicas). El término "ligado" también se indica mediante un guion (-).

Como se usa en este documento, la expresión "asociado con" se refiere a un enlace covalente o no covalente formado entre una primera cadena de aminoácidos y una segunda cadena de aminoácidos. En una realización, la expresión "asociado con" significa un enlace no peptídico covalente o un enlace no covalente. Esta asociación puede indicarse mediante dos puntos, es decir, (:). En otra realización, significa un enlace covalente excepto un enlace peptídico. Por ejemplo, el aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un grupo tiol en un segundo residuo de cisteína. En la mayoría de moléculas de IgG de origen natural, las regiones CH1 y CL se asocian mediante un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas se asocian mediante dos enlaces disulfuro en las posiciones correspondientes a 239 y 242 usando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración EU). Ejemplos de enlaces covalentes incluyen, aunque sin limitación, un enlace peptídico, un enlace metálico, un enlace de hidrógeno, un enlace disulfuro, un enlace sigma, un enlace pi, un enlace delta, un enlace glucosídico, un enlace indiferente, un enlace curvado, un enlace dipolar, un contraenlace Pi, un doble enlace, un triple enlace, un cuádruple enlace, un quíntuple enlace, un séxtuple enlace, conjugación, hiperconjugación, aromaticidad, hapticidad o antiunión. Ejemplos no limitantes de enlace no covalente incluyen un enlace iónico (por ejemplo, enlace catiónico pi o enlace salino), un enlace metálico, un enlace de hidrógeno (por ejemplo, enlace de dihidrógeno, complejo de dihidrógeno, enlace de hidrógeno de barrera baja o enlace de hidrógeno simétrico), fuerza de van der Waals, fuerza de dispersión de London, un enlace mecánico, un enlace de halógeno, aurofilia, intercalación, apilamiento, fuerza entrópica o polaridad química.

La expresión "híbrido de monómero-dímero" usada en este documento se refiere a una proteína quimérica que comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, que se asocian entre sí por un enlace disulfuro, en el que la primera cadena comprende un factor de coagulación, por ejemplo, factor VIII y una primera región Fc y la segunda cadena comprende, consiste esencialmente en o consiste en una segunda región Fc sin el factor de coagulación. La construcción de híbrido de monómero-dímero, por tanto, es un híbrido que comprende un aspecto monomérico que tiene solamente un factor de coagulación y un aspecto dimérico que tiene dos regiones Fc.

Como se usa en este documento, la expresión "sitio de escisión" o "sitio de escisión enzimática" se refiere a un sitio reconocido por una enzima. Determinados sitios de escisión enzimática comprenden un sitio de procesamiento intracelular. En una realización, un polipéptido tiene un sitio de escisión enzimática escindido mediante una enzima que se activa durante la reacción en cadena de coagulación, de modo que la escisión de dichos sitios se produce en el sitio de formación del coágulo. Dichos sitios ejemplares incluyen, por ejemplo, los reconocidos por trombina, factor XIa o factor Xa. Sitios de escisión de FXIa ejemplares incluyen, por ejemplo, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 1) y SVSQTSLKTR (SEQ ID NO: 3). Sitios de escisión de trombina ejemplares incluyen, por ejemplo, DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 4), TTKIKPR (SEQ ID NO: 5), LVPRG (SEQ ID NO: 6), ALRPR (SEQ ID NO: 7), ISDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFS (SEQ ID NO: 106), DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFS (SEQ ID NO: 88) e IEPFS (SEQ ID NO: 194). Otros sitios de escisión enzimática son conocidos en la técnica y se describen en otra parte en este documento.

Como se usa en este documento, la expresión "sitio de procesamiento" o "sitio de procesamiento intracelular" se refiere a un tipo de sitio de escisión enzimática en un polipéptido que es una diana para enzimas que funcionan después de la traducción del polipéptido. En una realización, dichas enzimas funcionan durante el transporte desde la luz del Golgi hasta el compartimento trans-Golgi. Las enzimas de procesamiento intracelular escinden los polipéptidos antes de la secreción de la proteína desde la célula. Ejemplos de dichos sitios de procesamiento incluyen, por ejemplo, los abordados por la familia de endopeptidasas de PACE/furina (donde PACE es un acrónimo de enzima de escisión de aminoácidos básicos emparejados - *Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme*). Estas enzimas se localizan en la membrana del Golgi y escinden proteínas en el lado carboxiterminal del motivo de secuencia Arg-[cualquier residuo]- (Lys o Arg)-Arg. Como se usa en este documento la familia de enzimas de "furina" incluye, por ejemplo, PCSK1 (también conocida como PC1/Pc3), PCSK2 (también conocida como PC2), PCSK3 (también conocida como furina o PACE), PCSK4 (también conocida como PC4), PCSK5 (también conocida como PC5 o PC6), PCSK6 (también conocida como PACE4) o PCSK7 (también conocida como PC7/LPC, PC8 o SPC7). Otros sitios de procesamiento son conocidos en la técnica.

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

El término "furina" se refiere a las enzimas correspondientes a EC n.º 3.4.21.75. Furina es proproteína convertasa similar a subtilisina, que también se conoce como PACE (enzima de escisión de aminoácidos básicos emparejados). La furina elimina secciones de proteínas precursoras inactivas para convertirlas en proteínas biológicamente activas. Durante su transporte intracelular, el propéptido de VWF puede escindirarse de la molécula de VWF madura mediante una enzima furina. En algunas realizaciones, la furina escinde D1D2 de D'D3 del VWF. En otras realizaciones, puede expresarse una secuencia de nucleótidos que codifica furina junto con la secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de VWF, de modo que puedan eliminarse por escisión los dominios D1D2 de forma intracelular mediante furina.

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

Un "conector procesable", como se usa en este documento, se refiere a un conector que comprende al menos un sitio de procesamiento intracelular, que se describe en otra parte de este documento.

Trastorno hemostático, como se usa en este documento, significa una afección hereditaria o adquirida caracterizada por una tendencia a hemorragia, espontáneamente o como resultado de traumatismo, debido a una capacidad alterada o incapacidad de formar un coágulo de fibrina. Ejemplos de dichos trastornos incluyen las hemofilias. Las tres formas principales son hemofilia A (deficiencia de factor VIII), hemofilia B (deficiencia de factor IX o "enfermedad de Christmas") y hemofilia C (deficiencia de factor XI, diátesis hemorrágica leve). Otros trastornos hemostáticos incluyen, por ejemplo, enfermedad de Von Willebrand, deficiencia de factor XI (deficiencia de PTA), deficiencia de factor XII, deficiencias o anomalías estructurales en el fibrinógeno, protrombina, factor V, factor VII, factor X o factor XIII, síndrome de Bernard-Soulier, que es un defecto o deficiencia en GPIb. GPIb, el receptor para VWF, puede ser defectuoso y dar lugar a la ausencia de formación del coágulo primario (hemostasis primaria) y diátesis hemorrágica aumentada, y trombostenia de Glanzman y Naegeli (trombostenia de Glanzmann). En insuficiencia hepática (formas aguda y crónica), hay producción insuficiente de factores de coagulación por parte del hígado; esto puede aumentar el riesgo de hemorragia.

Las moléculas quiméricas de la invención pueden usarse profilácticamente. Como se usa en este documento la expresión "tratamiento profiláctico" se refiere a la administración de una molécula antes de un episodio hemorrágico. En una realización, el sujeto que necesita un agente hemostático general se está sometiendo, o se va a someter, a cirugía. La proteína quimérica de la invención puede administrarse antes o después de cirugía de manera profiláctica. La proteína quimérica de la invención puede administrarse durante o después de cirugía para controlar un episodio hemorrágico agudo. La cirugía puede incluir, aunque sin limitación, trasplante de hígado, resección hepática, procedimientos dentales o trasplante de células madre.

La proteína quimérica de la invención también se usa para tratamiento a demanda. La expresión "tratamiento a demanda" se refiere a la administración de una molécula quimérica en respuesta a síntomas de un episodio hemorrágico o antes de una actividad que pueda provocar hemorragia. En un aspecto, el tratamiento a demanda puede administrarse a un sujeto cuando empieza la hemorragia, tal como después de una lesión, o cuando se espera hemorragia, tal como antes de cirugía. En otro aspecto, el tratamiento a demanda puede administrarse antes de actividades que aumenten el riesgo de hemorragia, tal como deportes de contacto.

Como se usa en este documento, la expresión "hemorragia aguda" se refiere a un episodio hemorrágico independientemente de la causa subyacente. Por ejemplo, un sujeto puede tener traumatismo, uremia, un trastorno hemorrágico hereditario (por ejemplo, deficiencia de factor VII), un trastorno de las plaquetas o resistencia debida al desarrollo de anticuerpos contra factores de coagulación.

Tratar, tratamiento, que trata, como se usan en este documento, se refieren a, por ejemplo, la reducción de la gravedad de una enfermedad o afección; la reducción de la duración del desarrollo de una enfermedad; la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o afección; el aporte de efectos beneficiosos a un sujeto con una enfermedad o afección, sin curar necesariamente la enfermedad o afección, o la profilaxis de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o afección. En una realización, el término "tratar" o "tratamiento" significa mantener un nivel mínimo de FVIII de al menos aproximadamente 1 IU/dL, 2 IU/dL, 3 IU/dL, 4 IU/dL, 5 IU/dL, 6 IU/dL, 7 IU/dL, 8 IU/dL, 9 IU/dL, 10 IU/dL, 11 IU/dL, 12 IU/dL, 13 IU/dL, 14 IU/dL, 15 IU/dL, 16 IU/dL, 17 IU/dL, 18 IU/dL, 19 IU/dL, o 20 IU/dL en un sujeto, administrando una proteína quimérica o un fragmento de VWF de la invención. En otra realización, tratar o tratamiento significa mantener un nivel mínimo de FVIII entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 UI/dl, aproximadamente 2 y aproximadamente 20 UI/dl, aproximadamente 3 y aproximadamente 20 UI/dl, aproximadamente 4 y aproximadamente 20 UI/dl, aproximadamente 5 y aproximadamente 20 UI/dl, aproximadamente 6 y aproximadamente 20 UI/dl, aproximadamente 7 y aproximadamente 20 UI/dl, aproximadamente 8 y aproximadamente 20 UI/dl, aproximadamente 9 y aproximadamente 20 UI/dl o aproximadamente 10 y aproximadamente 20 UI/dl. Tratamiento o tratar una enfermedad o afección también puede incluir mantener la actividad de FVIII en un sujeto a un nivel comparable a al menos aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % de la actividad de FVIII en un sujeto no hemofílico. El nivel mínimo requerido para tratamiento puede medirse por uno o más métodos conocidos y puede ajustarse (aumentarse o disminuirse) para cada persona.

II. Proteínas quiméricas

La presente invención se refiere a prolongar la semivida de una proteína quimérica usando un fragmento de VWF fusionado a una secuencia de XTEN evitando o inhibiendo que un factor limitante de la semivida de FVIII, es decir, VWF endógeno, se asocie con la proteína FVIII. El VWF endógeno se asocia con aproximadamente un 95 % a aproximadamente un 98 % de FVIII en complejos no covalentes. Aunque el VWF endógeno es un factor limitante de la semivida de FVIII, también se sabe que el VWF endógeno unido a una proteína FVIII protege FVIII de diversas maneras. Por ejemplo, el VWF de longitud completa (como un multímero que tiene aproximadamente 250 kDa) puede proteger a FVIII de la escisión por proteasa y la activación de FVIII, estabilizar la cadena pesada y/o cadena ligera de FVIII, y evitar la eliminación de FVIII por receptores depuradores. Pero, al mismo tiempo, el VWF endógeno limita la semivida de FVIII evitando la pinocitosis y purgando el complejo de FVIII-VWF del sistema a través de la ruta de eliminación de VWF. Se cree, aunque sin limitarse a teoría alguna, que el VWF endógeno es un factor limitante de la semivida que evita que la semivida de una proteína quimérica fusionada a un prolongador de la semivida sea más larga de aproximadamente dos veces la de FVIII de tipo silvestre. Por lo tanto, la presente invención se refiere a prevenir o inhibir la interacción entre VWF endógeno y una proteína FVIII usando un fragmento de VWF que comprende un dominio D' y un dominio D3 (por ejemplo, un fragmento de VWF) y al mismo tiempo aumentar la semivida de una o más proteínas FVIII resultantes usando una secuencia de XTEN en combinación con una región constante de Ig o una parte de la misma. En particular, la presente invención muestra que una secuencia de XTEN más corta (es decir, XTEN que contiene menos de 288 aminoácidos de longitud, es decir, XTEN que es más corto que 288 aminoácidos) es mejor para prolongar la semivida de la proteína quimérica.

La invención se refiere una proteína quimérica que comprende (i) una primera cadena polipeptídica que comprende: (i) una proteína FVIII que comprende una parte N terminal y una parte C terminal, en la que la parte N terminal de la proteína FVIII comprende el dominio A1, dominio A2 y una parte del dominio B de FVIII maduro de longitud completa (SEQ ID NO: 65), de modo que la parte N terminal comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos 1 a 745 de SEQ ID NO: 65 fusionada a una primera secuencia de XTEN insertada inmediatamente posterior al aminoácido 745 de SEQ ID NO: 65, y en la que la parte C terminal comprende el dominio A3, el dominio C1 y el dominio C2; (b) una primera región Fc; y (ii) un segundo polipéptido que comprende, del extremo N al extremo C del mismo: (a) un fragmento de VWF que comprende un dominio D' y un dominio D3 de VWF, con una sustitución aminoacídica en cada uno de los residuos 1099 y 1142 de SEQ ID NO: 21; (b) una segunda secuencia de XTEN, en la que segunda secuencia de XTEN contiene menos de 288 aminoácidos; (c) un conector escindible que comprende una región a2 de FVIII que comprende la secuencia de aminoácidos de Glu720 a Arg740 correspondiente a SEQ ID NO: 65, en la que la región a2 puede escindirse por trombina; y (d) una segunda región Fc, en la que la primera región Fc se liga a o se asocia con la segunda región Fc. En otras realizaciones, la proteína quimérica presenta una semivida más larga en comparación con una proteína de fusión correspondiente que comprende el primer polipéptido y el segundo polipéptido, en la que el segundo polipéptido comprende una secuencia de XTEN que contiene al menos 288 aminoácidos, por ejemplo, AE288, por ejemplo, SEQ ID NO: 8. En otras realizaciones más, la secuencia de XTEN en el segundo polipéptido contiene al menos aproximadamente 36, al menos aproximadamente 42, al menos aproximadamente 72 o al menos aproximadamente 144 aminoácidos, pero menos de 288 aminoácidos, por ejemplo, AE42, AE72, AE144 (AE144, AE144_2A, AE144_3B, AE144_4A, AE144_5A, AE144_6B), AG42, AG72 o AG144 (AG144, AG144_A, AG144_B, AG144_C, AG144_F), por ejemplo, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; o SEQ ID NO: 63.

La proteína quimérica de la invención puede comprender además una secuencia de XTEN que liga la proteína FVIII con la primera región Fc.

La primera y/o tercera secuencia de XTEN puede ser cualquier longitud de aminoácidos de XTEN. Por ejemplo, la primera y/o tercera secuencia de XTEN se divulgan en otra parte de este documento, por ejemplo, AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288, y AG144, por ejemplo, SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; o SEQ ID NO: 63. En una realización particular, la primera y/o tercera secuencia de XTEN es AE288 o AG288, por ejemplo, SEQ ID NO: 8 o 19.

II.A. Proteínas de factor de Von Willebrand (VWF)

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

gonadotropina coriónica humana β (β HCG)).

De acuerdo con la presente invención, la proteína VWF es un fragmento de VWF. La expresión "un fragmento de VWF", como se usa en este documento, incluye, aunque sin limitación, fragmentos de VWF funcionales que comprenden un dominio D' y un dominio D3, que pueden inhibir la unión de VWF endógeno a FVIII y que tiene una sustitución aminoacídica en cada uno de los residuos 1099 a 1142 de SEQ ID NO: 21. En una realización, el fragmento de VWF se une a la proteína FVIII. En otra realización, el fragmento de VWF bloquea el sitio de unión a VWF en la proteína FVIII, inhibiendo de ese modo la interacción de la proteína FVIII con VWF endógeno. Los fragmentos de VWF incluyen derivados, variantes, mutantes o análogos que retienen estas actividades de VWF.

La secuencia del monómero de 2813 aminoácidos para VWF humano se presenta como el número de acceso NP_000543.2 en Genbank. La secuencia de nucleótidos que codifica el VWF humano se presenta como el número de acceso NM_000552.3 en Genbank. Una secuencia de nucleótidos de VWF humano se denomina SEQ ID NO: 20. SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de VWF de longitud completa. Cada dominio de VWF se enumera en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de VWF

ES 2 982 051 T3

Tabla 1. Secuencias de VWF

Dominios de VWF	Secuencia de aminoácidos	
Péptido señal de VWF (aminoácidos 1 a 22 de SEQ ID NO: 21)	1	<u>MIPARFAGVL LALALILPGT LC</u> 22
Región D1D2 de VWF (aminoácidos 23 a 763 de SEQ ID NO: 21)	23	<u>AEGTRGRS STARCSLFGS</u>
	51	<u>DFVNTFDGSM</u> <u>YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE</u> <u>FFDIHLFVNG</u>
	101	<u>TVTQGDQRVSPYASKGLYL ETEAGYKLS GEAYGFVARI</u> <u>DGSGNFQVLL</u>
	151	<u>SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS</u> <u>WALSSGEQWC</u>
	201	<u>ERASPPSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL</u> <u>VDPEPFVALC</u>
	251	<u>EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA</u> <u>CSPVCPAGME</u>
	301	<u>YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG</u> <u>LCVESTTEPC</u>
	351	<u>VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECIV</u> <u>TGQSHFKSFD</u>
	401	<u>NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC</u> <u>TRSVTVRLPG</u>
	451	<u>LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV</u> <u>RLSYGEDLQM</u>
	501	<u>DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG</u> <u>LAEPRVEDFG</u>
	551	<u>NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP</u> <u>TFEACHRAVS</u>
	601	<u>PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV</u> <u>AWREPGRCEL</u>
	651	<u>NCPKQVYLQ CGTPCNLTCT SLSYPDEECN EACLEGCFCP</u> <u>PGLYMDERGD</u>
	701	<u>CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM</u> <u>SGVPGSLLPD</u>
	751	<u>AVLSSPLSHR SKR</u> 763
Dominio D' de VWF	764	<u>SLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK</u>
	801	<u>TCQNYDLECM</u> <u>SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE</u> <u>TVKIGCNTCV</u>
	851	<u>CRDRKWNCTD HVCDAT</u> 866
Dominio D3 de VWF	867	<u>CSTI_GMAHYLTFDG LKYLFPGEQ</u>
	901	<u>YVLVQDYCGS</u> <u>NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE</u> <u>VNVKREMKDE</u>
	951	<u>THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE</u> <u>KVCGLCGNFD</u>
	1001	<u>GIONNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD</u> <u>SSPATCHNNI</u>
	1051	<u>MKQTMVDSSC RILTSDFVD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCS</u> <u>CESIGDCACF</u>
	1101	<u>CDTIAAYAHV CAQHGVVTV RTATLCPQSC EERNLRENGY</u> <u>ECEWRYNSCA</u>
	1151	<u>PACQVTCQHE EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC</u> <u>VDPEDCPVCE</u>
	1201	<u>VAGRRFASGK KVTILNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP</u>
	1240	

ES 2 982 051 T3

<p>Dominio A1 de VWF</p>	<p>1241 GGLVVPPTDA 1251 PVSPTTLYVE DISEPPLHDF YCSRLLDLVF LLDGSSRLSE AEFEVLKAFV 1301 VDMMERLRIS OKWVRVAVVE YHDGSHAYIG LKDRKRPSSEL RRIASQVKYA 1351 GSQVASTSEV LKYTLFQIFS KIDRPEASRI ALLLMASQEP QRMSRNFVRY 1401 VQGLKKKKVI VIPVGIGPHA NLKQIRLIEK QAPENKAFVL SSVDELEQQR 1451 DEIVSYLCDL APEAPPPTLP PDMAQVTVG 1479</p>
	<p>1480 P GLLGVSTLGP KRNSMVLDDVA 1501 FVLEGS DKIG EADFNRSKEF MEEVIQRMVDV GQDSIHVTVL QYSYMTVEY 1551 PFSEAQSKGD ILQVRREIRY QGGNRTNTGL ALRYLSDHSF LVSQGDREQA 1600 1601 PNLVYMTGN PASDEIKRLP GDIQVPIGV GPNANVQELE RIGWPNAPIL 1651 IQDFETLPRE APDLVLQRCC SGEGLQIPTL SPAPDCSQPL DVILLLDGSS 1701 SFPASYFDEM KSEFAKAFISK ANIGPRLTQV SVLQYGSITT IDVPWNVVPE 1751 KAHLLSLVDV MQREGGPSQI GDALGFAVRY LTSEMHCARP GASKAVVILV 1801 TDVSVDSVDA AADAARSNRV TVFPIGIGDR YDAAQLRILA GPAGDSNVVK 1851 LQRIEDLPTM VTLGNSFLHK LCSGFVRICM DEDGNEKRP DVWTLPDQCH</p>
	<p>1901 TVTCQPDGQT LLKSHRVNCD RGLRPSCPNS QSPVKVEETC GCRWTCPCVC 1951 TGSSTRHIVT FDGQNFKLTG SCSYVLFQNK EQDLEVILHN GACSPGARQG 2001 CMKSIEVKHS ALSVEXHSDM EVTVNGRLVS VPYVGGNMEV NVYGAIMHEV 2051 RFNHLGHIFT FTPQNEFQL QLSPKTFASK TYGLCGICDE NGANDFMLRD 2101 GTVTTDWKTLL VQEWTVQRPG QTCQPILEEQ CLVPDSSHQ VLLLPLFAEC 2151 HKVLAPATFY AICQQDSCHQ EQVCEVIASY AHLCRTNGVC VDWRTPDFCA 2201 MSCPPSLVYN HCEHGCPRHC DGNVSSCGDH PSEGCFCPPD KVMLEGSCVP 2251 EEACTQCIGE DGVQHOFLEA WVPDHQPCQI CTCLSGRKVN CTTQPCPTAK 2301 APTCGLCEVA RLRQNADQCC PEYECVCDPV SCDLPPVPHC ERGLQPTLTN 2351 PGECPNFETC ACRKEECKRV SPPSCPPHRL PTLRKTQCCD EYECACNCVN 2401 STVSCPLGYL ASTATNDCGC TTTTCLPDKV CVHRSTIYPV GQFWEEGCDV 2451 CTCTMEDAV MGLRVAQCSQ KPCEDSCRSG FTYVLHEGEC CGRCLPSACE 2501 VVTGSPRGDS QSSWKS VGSQ WASPENPCLI NECVRVKEEV FIQQRNVSCP 2551 QLEVPVCPSPG FQLSCKTSAC CPSCRCERME ACMLNGTVIG PGKTVMIDVC 2601 TTRCRMVQVG VISGFKLECR KTTCNPCPLG YKEENNTGEC CGRCLPTACT 2651 IQLRGGQIMT LKRDETLQDG CDTHFCKVNE RGEYFWEKRV TGCPPFDEHK 2701 CLAEGGKIMK IPGTCCDTCE EPECNDITAR LQYVKVGSK SEVEVDIHYC 2751 QGKCASKAMY SIDINDVQDQ CSCCSPTRTE PMQVALHCTN GSVVYHEVLN 2801 AMECKCSPRK CSK</p>

ES 2 982 051 T3

	Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 20)
VWF de longitud completa	<p>1 ATGATTCCCTG CCAGATTTCG CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTT</p> <p>51 GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACTCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC</p> <p>101 GATGCAGCCT TTTCGGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG</p> <p>151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA</p> <p>201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC</p> <p>251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTGTGACA TCCATTTGTT TGTCAATGGT</p> <p>301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG</p> <p>351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCTT</p> <p>401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCCTGCTG</p> <p>451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT</p> <p>501 CTTTGCTGAA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC</p>

ES 2 982 051 T3

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 20)	
551	CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT
601	GAACGGGCAT CTCCTCCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT
651	GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT
701	TTGCCCGCTG CCACCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT
751	GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGGC CCTGCCCTGC
801	CCTCCTGGAG TACGCCCGGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG
851	GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAAGCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG
901	TATAGCCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT
951	CAATGAAATG TGTCAAGAGC GATGCGTGGG TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG
1001	GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCCGTG AGACCACCGA GTGTCCCTGC
1051	GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG
1101	CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT
1151	GTCCAGGGGA GTGCCTTGTG ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC
1201	AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC CAGIACCTGC TGGCCCGGGA
1251	TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG
1301	ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCTGGC
1351	CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA
1401	TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC
1451	ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
1501	GACTGGGATG GCCCGGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC
1551	CGGGAAGACC TGCGGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGAGC
1601	ACTTCCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCRGAGC CCCGGGTGGA GGACTTCGGG
1651	AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGACTGCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG
1701	CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGTTCTPCC GAGGAGGCGT
1751	GCGCGGTCTT GACGTCCCC ACATTGAGG CCTGCCATCG TGCCGTCAGC
1801	CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACCTGTGCT CCTGTCTGGA
1851	CGGCCCGGAG TGCCGTGTGG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCCTGGC
1901	CGGGGAGAGG CGTGCGCGTC GCGTGGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG
1951	AACTGCCCCA AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TGCGGGACCC CCTGCAACCT
2001	GACCTGCCGC TCTCTCTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCTGCC
2051	TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACAITGGATGA GAGGGGGGAC
2101	TGCGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTTAC TATCACGGTG AGATCTTCCA
2151	GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG

ES 2 982 051 T3

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 20)	
2201	GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC
2251	GCTGTCCCTCA GCAGTCCCCT GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCCTG
2301	TCGGCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGGGGGCTG
2351	AAGGGCTCGA GTGTACCAA ACGTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG
2401	AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCCTGGCA TGGTCCGGCA
2451	TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGAAAAGTG TCCCTGCCTC CATCAGGGCA
2501	AGGAGTATGC CCGTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC
2551	TGTGCGGACC GGAAGTGGAA CTGCACAGAC CATCTGTGTG ATGCCACGTG
2601	CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTGACGGG CTCAAATACC
2651	TGTTCCCCGG GAGTGGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGGGCCAGT
2701	AACCCCTGGG CTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC
2751	CTCAGTGAAG TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA
2801	TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG
2851	ACTCACTTTG AGGTGGTGGG GTCTGGCCGG TACATCATTC TGCTGCTGGG
2901	CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC
2951	TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGAT
3001	GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGCAAGA
3051	CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA
3101	CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC
3151	ATGAAGCAGA CGATGGTGGG TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT
3201	CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT
3251	GCATTIACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCTGCTTC
3301	TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCCACGTG TGTGCCCAGC ATGGCAAGGT
3351	GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATGTGCCCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA
3401	ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGTGTGAGT GGCCCTATAA CAGCTGTGCA
3451	CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT
3501	GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCCCTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG
3551	ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG
3601	GTGGCTGGCC GCGTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCCAG
3651	TGACCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGAIGTTGTC AACCTCACCT
3701	GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG GGAGGCCCTGG TGGIGCCCTCC CACAGATGCC
3751	CCGGTGAAGC CCACCACTCT GTATGTGGAG GACATCTCGG AACCGCCGTT
3801	GCACGATTC TACTGCAGCA GGCTACTGGA CCTGGTCTTC CTGCTGGATG

ES 2 982 051 T3

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 20)	
3851	GCTCCTCCAG GCTGTCCGAG GCTGAGTTG AAGTGCTGAA GGCCTTTGTG
3901	GTGGACATGA TGGAGCGGCT GCGCATCTCC CAGAAGTGGG TCCGCGTGGC
3951	CGTGGTGGAG TACCACGACG GCTCCCACGC CTACATCGGG CTCAAGGACC
4001	GAAGCGGACC GTCAGAGCTG CGGCGCATTG CCAGCCAGGT GAAGTATGCG
4051	GGCAGCCAGG TGGCCTCCAC CAGCGAGGTC TTGAAATACA CACTGTTCOA
4101	AATCTTCAGC AAGATCGACC GCCCTGAAGC CTCGCCGATC GCCCTGCTCC
4151	TGATGGCCAG CCAGGAGCCC CAACGGATGT CCCGGAACCT TGTCCGCTAC
4201	GTCCAGGGCC TGAAGAAGAA GAAGGTCATT GTGATCCCGG TGGGCATTGG
4251	GCCCCATGCC AACCTCAAGC AGATCCGCCT CATCGAGAAG CAGGCCCTG
4301	AGAACAAGGC CTTCTGTGCTG AGCAGTGTGG ATGAGCTGGA GCAGCAAAGG
4351	GACGAGATCG TTAGCTACCT CTGTGACCTT GCCCTGAAG CCCCCTCTCC
4401	TACTCTGCCC CCCGACATGG CACAAGTCAC TGTGGGCCCG GGGCTCTTGG
4451	GGGTTTCGAC CCTGGGGCCC AAGAGGAACT CCATGGTTCT GGATGTGGCG
4501	TTCGTCCTGG AAGGATCGGA CAAAATTGGT GAAGCCGACT TCAACAGGAG
4551	CAAGGAGTTC ATGGAGGAGG TGATTGAGCG GATGGATGTG GGCCAGGACA
4601	GCATCCACGT CACGGTGTG CAGTACTCCT ACATGGTGAC CGTGGAGTAC
4651	CCCTTCAGCG AGGCACAGTC CAAAGGGGAC ATCCTGCAGC GGGTGCGAGA
4701	GATCCGCTAC CAGGGCGGCA ACAGGACCAA CACTGGGCTG GCCCTGGGGT
4751	ACCTCTCTGA CCACAGCTTC TTGGTCAGCC AGGGTGACCG GGAGCAGGCG
4801	CCCAACCTGG TCTACATGGT CACCGGAAAT CCTGCCTCTG ATGAGATCAA
4851	GAGGCTGCCT GGAGACATCC AGGTGGTGCC CATTGGAGTG GGCCCTAATG
4901	CCAACGTGCA GGAGCTGGAG AGGATTGGCT GGCCCAATGC CCCTATCCTC
4951	ATCCAGGACT TTGAGACGCT CCCCCGAGAG GCTCCTGACC TGGTGCTGCA
5001	GAGGTGCTGC TCCGGAGAGG GGCTGCAGAT CCCACCCTC TCCCCTGCAC
5051	CTGACTGCAG CCAGCCCCTG GACGTGATCC TTCTCCTGGA TGGCTCCTCC
5101	AGTTTCCCAG CTTCTTATTT TGATGAAATG AAGAGTTTCG CCAAGGCTTT
5151	CATTTCAAAA GCCAATATAG GGCTCGTCT CACTCAGGTG TCAGTGCTGC
5201	AGTATGGAAG CATCACCACC ATTGACGTGC CATGGAACGT GGTCCCGGAG
5251	AAAGCCCATT TGCTGAGCCT TGTGGACGTC ATGCAGCGGG AGGGAGGCC
5301	CAGCCAAATC GGGGATGCCT TGGGCTTTGC TGTGCGATAC TTGACTTCAG
5351	AAATGCATGG TGCCAGGCCG GGAGCCTCAA AGGCGGTGGT CATCCTGGTC
5401	ACGGACSTCT CTGTGGATTC AGTGGATGCA GCAGCTGATG CCGCCAGGTC
5451	CAACAGAGTG ACAGTGTTC CTATTGGAAT TGGAGATCGC TACGATGCAG

ES 2 982 051 T3

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 20)	
5501	CCCAGCTACG GATCTTGGCA GGCCCAGCAG GCGACTCCAA CGTGGTGAAG
5551	CTCCAGCGAA TCGAAGACCT CCCTACCATG GTCACCTTGG GCAATTCCTT
5601	CCTCCACAAA CTGTGCTCTG GATTTGTIAG GATTTGCATG GATGAGGATG
5651	GGAATGAGAA GAGGCCGGG GACGTCTGGA CCTTGCCAGA CCAGTGCCAC
5701	ACCGTGACTT GCCAGCCAGA TGGCCAGACC TTGCTGAAGA GTCATCGGGT
5751	CAACTGTGAC CGGGGGCTGA GGCCTTCTGT CCCTAACAGC CAGTCCCCTG
5801	TTAAAGTGG AAGACCTGT GGCTGCCGCT GGACCTGCCC CTGYGTGTGC
5851	ACAGGCAGCT CCACTCGGCA CATCGTGACC TTGATGGGC AGAATTTCAA
5901	GCTGACTGGC AGCTGTCTT ATGTCCTATT TCAAAACAAG GAGCAGGACC
5951	TGGAGGTGAT TCTCCATAAT GGTGCCTGCA GCCCTGGAGC AAGGCAGGGC
6001	TGCATGAAAT CCACTGAGGT GAAGCACAGT GCCCTCTCCG TCGAGSTGCA
6051	CAGTGACATG GAGGTGACGG TGAATGGGAG ACTGGTCTCT GTTCTTACG
6101	TGGGTGGGAA CATGGAAGTC AACGTTTATG GTGCCATCAT GCATGAGGTC
6151	AGATTCAATC ACCTTGGTCA CATCTTCACA TTCACTCCAC AAAACAATGA
6201	GTTCCAAC TG CAGCTCAGCC CCAAGACTTT TGCTTCAAAG ACGTATGGTC
6251	TGTGTGGGAT CTGTGATGAG AACGGAGCCA ATGACTTCAT GCTGAGGGAT
6301	GGCACAGTCA CCACAGACTG GAAAACACTT GTTCAGGAAT GGACTGTGCA
6351	GCGGCCAGGG CAGACGTGCC AGCCCATCCT GGAGGAGCAG TGTCTTGTCC
6401	CCGACAGCTC CCACTGCCAG GTCCTCCTCT TACCCTGTT TGCTGAATGC
6451	CACAAGGTCC TGGCTCCAGC CACATTCTAT GCCATCTGCC AGCAGGACAG
6501	TTGCCACCAG GAGCAAGTGT GTGAGGTGAT CGCCTCTTAT GCCCACCTCT
6551	GTCGGACCAA CGGGGCTGC GTTGACTGGA GGACACCTGA TTTCTGTGCT
6601	ATGTCATGCC CACCATCTCT GGTCTACAAC CACTGTGAGC ATGGCTGTCC
6651	CCGGCACTGT GATGGCAACG TGAGCTCTG TGGGGACCAT CCCTCCGAAG
6701	GCTGTTTCTG CCCTCCAGAT AAAGTCATGT TGGAAGGCAG CTGTGTCCCT
6751	GAAGAGGCCT GCACTCAGTG CATTGGTGAG GATGGAGTCC AGCACCAGTT
6801	CCTGGAAGCC TGGGTCCCG ACCACCAGCC CTGTGAGATC TGCACATGCC
6851	TCAGCGGGCG GAAGGTCAAC TGCACAACGC AGCCCTGCCC CACGGCCAAA
6901	GCTCCCACGT GTGGCCTGTG TGAAGTAGCC CGCCTCCGCC AGAATGCAGA
6951	CCAGTGCTGC CCCGAGTATG AGTGTGTGTG TGACCCAGTG AGCTGTGACC
7001	TGCCCCAGT GCCTCACTGT GAACGTGGCC TCCAGCCCAC ACTGACCAAC
7051	CCTGGCCAGT GCAGACCCAA CTTACCTGCG GCCTGCAGGA AGGAGGAGTG
7101	CAAAAGAGTG TCCCCACCCT CCTGCCCCCC GCACCCTTTC CCCACCCTTC

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 20)	
7151	GGAAGACCCA GTGCTGTGAT GAGTATGAGT GTGCCTGCAA CTGTGTCAAC
7201	TCCACAGTGA GCTGTCCCCT TGGGTACTTG GCCTCAACCG CCACCAATGA
7251	CTGTGGCTGT ACCACAACCA CCTGCCTTCC CGACAAGGTG TGTGTCCACC
7301	GAAGCACCAT CTACCCTGTG GGCCAGTTCT GGGAGGAGGG CTGCCATGTG
7351	TGCACCTGCA CCGACATGGA GGATGCCGTG ATGGGCCTCC GCGTGGCCCA
7401	GTGCTCCCAG AAGCCCTGTG AGGACAGCTG TCGGTGCGGC TTCACTTACG
7451	TTCTGCATGA AGGCGAGTGC TGTGGAAGGT GCCTGCCATC TGCCTGTPGAG
7501	GTGGTGACTG GCTCACCGCG GGGGGACTCC CAGTCTTCCT GGAAGAGTGT
7551	CGGCTCCCAG TGGGCCTCCC CGGAGAACCC CTGCCTCATC AATGAGTGTG
7601	TCCGAGTGAA GGAGGAGGTC TTTATACAAC AAAGGAACGT CTCCTGCCCC
7651	CAGCTGGAGG TCCCTGTCTG CCCCTCGGGC TTTAGCTGA GCTGTAAGAC
7701	CTCAGCGTGC TGCCCAAGCT GTCGCTGTGA GCGCATGGAG GCCTGCATGC
7751	TCAATGGCAC TGTCAATGGG CCCGGGAAGA CTGTGATGAT CGATGTGTGC
7801	ACGACCTGCC GCTGCATGGT GCAGGTGGGG GTCATCTCTG GATTCAGCT
7851	GGAGTGCAGG AAGACCACCT GCAACCCCTG CCCCTGGGT TACAAGGAAG
7901	AAAATAACAC AGGTGAATGT TGTGGGAGAT GTTTGCCTAC GGCTTGCACC
7951	ATTTCAGCTAA GAGGAGGACA GATCATGACA CTGAAGCGTG ATGAGACGCT
8001	CCAGGATGGC TGTGATACTC ACTTCTGCAA GGTCAATGAG AGAGGAGAGT
8051	ACTTCTGGGA GAAGAGGGTC ACAGGCTGCC CACCCTTGA TGAACACAAG
8101	TGCTCTGCTG AGGGAGGTAA AATTATGAAA ATTCCAGGCA CCTGCTGTGA
8151	CACATGTGAG GAGCCTGAGT GCAACGACAT CACTGCCAGG CTGCAGTATG
8201	TCAAGTGGG AAGCTGTAAG TCTGAAGTAG AGGTGGATAT CCTACTTGC
8251	CAGGGCAAAT GTGCCAGCAA AGCCATGTAC TCCATTGACA TCAACGATGT
8301	GCAGGACCAG TGCTCCTGCT GCTCTCCGAC ACGGACGGAG CCCATGCAGG
8351	TGGCCCTGCA CTGCACCAAT GGCTCTGTTG TGTACCATGA GGTCTCAAT
8401	GCCATGGAGT GCAAATGCTC CCCAGGAAG TGCAGCAAGT GA

5 El fragmento de VWF comprende un dominio D' y un dominio D3 de VWF, en el que el fragmento de VWF se une al factor VIII (FVIII) e inhibe la unión de VWF endógeno (VWF de longitud completa) a FVIII. El fragmento de VWF que comprende el dominio D' y el dominio D3 puede comprender además un dominio de VWF seleccionado del grupo que consiste en un dominio A1, un dominio A2, un dominio A3, un dominio D1, un dominio D2, un dominio D4, un dominio B1, un dominio B2, un dominio B3, un dominio C1, un dominio C2, un dominio CK, uno o más fragmentos de los mismos y cualquier combinación de los mismos. En una realización, un fragmento de VWF comprende, consiste esencialmente en o consiste en: (1) los dominios D' y D3 de VWF o fragmentos de los mismos; (2) los dominios D1, D' y D3 de VWF o fragmentos de los mismos; (3) los dominios D2, D' y D3 de VWF o fragmentos de los mismos; (4) los dominios D1, D2, D' y D3 de VWF o fragmentos de los mismos; o (5) los dominios D1, D2, D', D3 y A1 de VWF o fragmentos de los mismos. El fragmento de VWF descrito en este documento no contiene un sitio de unión a un receptor de eliminación de VWF. En otra realización, el fragmento de VWF descrito en este documento no es los aminoácidos 764 a 1274 de SEQ ID NO: 21. El fragmento de VWF de la presente invención puede comprender cualquier otra secuencia ligada o fusionada al fragmento de VWF. Por ejemplo, un fragmento de VWF descrito en este documento puede comprender además un péptido señal.

En una realización, el fragmento de VWF que comprende un dominio D' y un dominio D3 se une a o se asocia con una proteína FVIII. Mediante la unión a o la asociación con una proteína FVIII, un fragmento de VWF de la invención protege a FVIII de la escisión por proteasa y la activación de FVIII, estabiliza la cadena pesada y la cadena ligera de

FVIII, y evita la eliminación de FVIII por receptores depuradores. En otra realización, el fragmento de VWF se une a o se asocia con una proteína FVIII y bloquea o evita la unión de la proteína FVIII a fosfolípido y proteína C activada. Evitando o inhibiendo la unión de la proteína FVIII con VWF de longitud completa endógeno, el fragmento de VWF de la invención reduce la eliminación de FVIII mediante receptores de eliminación de VWF y, por tanto, prolonga la semivida de la proteína quimérica. La prolongación de la semivida de una proteína quimérica, por tanto, se debe a la unión de o la asociación con el fragmento de VWF que carece de un sitio de unión al receptor de eliminación de VWF de la proteína FVIII y el blindaje o protección de la proteína FVIII mediante el fragmento de VWF contra VWF endógeno, que contiene el sitio de unión al receptor de eliminación de VWF. La proteína FVIII unida a o protegida por el fragmento de VWF también puede permitir el reciclado de una proteína FVIII. Eliminando los sitios de unión al receptor de la ruta de eliminación de VWF contenidos en la molécula de VWF de longitud completa, los heterodímeros de FVIII/VWF de la invención se protegen contra la ruta de eliminación de VWF, prolongando más la semivida de FVIII.

En una realización, un fragmento de VWF útil para la presente invención comprende un dominio D' y un dominio D3 de VWF, en el que el dominio D' es al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntico a los aminoácidos 764 a 866 de SEQ ID NO: 21, en el que el fragmento de VWF evita o inhibe la unión de VWF endógeno a FVIII. En otra realización, un fragmento de VWF comprende el dominio D' y el dominio D3 de VWF, en el que el dominio D3 es al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntico a los aminoácidos 867 a 1240 de SEQ ID NO: 21, en el que el fragmento de VWF evita o inhibe la unión de VWF endógeno a FVIII. En algunas realizaciones, un fragmento de VWF descrito en este documento comprende, consiste esencialmente en o consiste en el dominio D' y dominio D3 de VWF, que son al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idénticos a los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 21, en la que el fragmento de VWF evita o inhibe la unión de VWF endógeno a FVIII. En otras realizaciones, un fragmento de VWF comprende, consiste esencialmente en o consiste en los dominios D1, D2, D' y D3 al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idénticos a los aminoácidos 23 a 1240 de SEQ ID NO: 21, en el que el fragmento de VWF evita o inhibe la unión de VWF endógeno a FVIII. En otras realizaciones más, el fragmento de VWF comprende además un péptido señal unido de forma funcional al mismo.

En algunas realizaciones, un fragmento de VWF útil para la invención consiste esencialmente en o consiste en (1) el dominio D'D3, el dominio D1D'D3, el dominio D2D'D3 o el dominio D1D2D'D3 y (2) una secuencia de VWF adicional de hasta aproximadamente 10 aminoácidos (por ejemplo, cualquier secuencia de los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 21 a los aminoácidos 764 a 1250 de SEQ ID NO: 21), hasta aproximadamente 15 aminoácidos (por ejemplo, cualquier secuencia de los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 21 a los aminoácidos 764 a 1255 de SEQ ID NO: 21), hasta aproximadamente 20 aminoácidos (por ejemplo, cualquier secuencia de los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 21 a los aminoácidos 764 a 1260 de SEQ ID NO: 21), hasta aproximadamente 25 aminoácidos (por ejemplo, cualquier secuencia de los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 21 a los aminoácidos 764 a 1265 de SEQ ID NO: 21), o hasta aproximadamente 30 aminoácidos (por ejemplo, cualquier secuencia de los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 21 a los aminoácidos 764 a 1260 de SEQ ID NO: 21). En una realización particular, el fragmento de VWF que comprende o consiste esencialmente en el dominio D' y el dominio D3 no es los aminoácidos 764 a 1274 de SEQ ID NO: 21 ni el VWF maduro de longitud completa. En algunas realizaciones, el dominio D1D2 se expresa en *trans* con el dominio D'D3. En algunas realizaciones, el dominio D1D2 se expresa en *cis* con el dominio D'D3.

En otras realizaciones, el fragmento de VWF que comprende los dominios D'D3 ligados a los dominios D1D2 comprende además un sitio de escisión intracelular, por ejemplo, (un sitio de escisión por PACE (furina) o PC5), que permite la escisión de los dominios D1D2 con respecto a los dominios D'D3 tras la expresión. Ejemplos no limitantes del sitio de escisión intracelular se divulgan en otra parte de este documento.

En otras realizaciones más, un fragmento de VWF comprende un dominio D' y un dominio D3, pero no comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (1) los aminoácidos 1241 a 2813 correspondientes a SEQ ID NO: 21, (2) los aminoácidos 1270 a 2813 correspondientes a SEQ ID NO: 21, (3) los aminoácidos 1271 a 2813 correspondientes a SEQ ID NO: 21, (4) los aminoácidos 1272 a 2813 correspondientes a SEQ ID NO: 21, (5) los aminoácidos 1273 a 2813 correspondientes a SEQ ID NO: 21, (6) los aminoácidos 1274 a 2813 correspondientes a SEQ ID NO: 21, y cualquier combinación de los mismos.

En otras realizaciones más, un fragmento de VWF comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio D', dominio D3 y dominio A1, en el que la secuencia de aminoácidos es al menos un 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a los aminoácidos 764 a 1479 de SEQ ID NO: 21, en el que el fragmento de VWF evita la unión de VWF endógeno a FVIII. En una realización particular, el fragmento de VWF no es los aminoácidos 764 a 1274 de SEQ ID NO: 21.

En algunas realizaciones, un fragmento de VWF de la invención comprende un dominio D' y un dominio D3, pero no comprende al menos un dominio de VWF seleccionado del grupo que consiste en (1) un dominio A1, (2) un dominio A2, (3) un dominio A3, (4) un dominio D4, (5) un dominio B1, (6) un dominio B2, (7) un dominio B3, (8) un dominio C1, (9) un dominio C2, (10) un dominio CK, (11) un dominio CK y un dominio C2, (12) un dominio CK, un dominio C2 y un dominio C1, (13) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, (14) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, un dominio B2, (15) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, un dominio B2 y un dominio B1, (16) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, un dominio B2, un

dominio B1 y un dominio D4, (17) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, un dominio B2, un dominio B1, un dominio D4 y un dominio A3, (18) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, un dominio B2, un dominio B1, un dominio D4, un dominio A3 y un dominio A2, (19) un dominio CK, un dominio C2, un dominio C1, un dominio B3, un dominio B2, un dominio B1, un dominio D4, un dominio A3, un dominio A2 y un dominio A1, y (20) cualquier combinación de los mismos.

En otras realizaciones más, el fragmento de VWF comprende los dominios D'D3 y uno o más dominios o módulos. Ejemplos de dichos dominios o módulos incluyen, aunque sin limitación, los dominios y módulos divulgados en Zhou *et al.*, Blood publicado en línea el 6 de abril 2012: DOI 10.1182/blood-2012-01-405134. Por ejemplo, el fragmento de VWF puede comprender el dominio D'D3 y uno o más dominios o módulos seleccionados del grupo que consiste en dominio A1, dominio A2, dominio A3, módulo D4N, módulo VWD4, módulo C8-4, módulo TIL-4, módulo C1, módulo C2, módulo C3, módulo C4, módulo C5, módulo C6 y cualquier combinación de los mismos.

En otras realizaciones más, el fragmento de VWF se liga a un resto heterólogo, en el que el resto heterólogo se liga al extremo N o el extremo C del fragmento de VWF o se inserta inmediatamente posterior a uno o más aminoácidos (por ejemplo, uno o más sitios de inserción de XTEN) en la proteína VWF. Por ejemplo, los sitios de inserción para el resto heterólogo en la proteína VWF pueden estar en el dominio D', el dominio D3 o ambos. El resto heterólogo puede ser un prolongador de la semivida.

En determinadas realizaciones, un fragmento de VWF útil para la invención forma un multímero, por ejemplo, dímero, trímero, tetramero, pentámero, hexámero, heptámero o los multímeros de orden superior. En otras realizaciones, el fragmento de VWF es un monómero que tiene solamente un fragmento de VWF. En algunas realizaciones, el fragmento de VWF de la presente invención puede tener una o más sustituciones aminoacídicas, eliminaciones, adiciones o modificaciones. En una realización, el fragmento de VWF puede incluir sustituciones aminoacídicas, eliminaciones, adiciones o modificaciones de modo que el fragmento de VWF no pueda formar un enlace disulfuro o formar un dímero o un multímero. En otra realización, la sustitución aminoacídica es dentro del dominio D' y el dominio D3. Cada sustitución aminoacídica puede ser cualquier aminoácido que no sea de origen natural en el VWF de tipo silvestre. Por ejemplo, la sustitución aminoacídica puede ser cualquier aminoácido distinto de cisteína, por ejemplo, isoleucina, alanina, leucina, asparagina, lisina, ácido aspártico, metionina, fenilalanina, ácido glutámico, treonina, glutamina, triptófano, glicina, valina, prolina, serina, tirosina, arginina o histidina. En otro ejemplo, la sustitución aminoacídica tiene uno o más aminoácidos que evitan o inhiben que las proteínas VWF formen multímeros.

En determinadas realizaciones, el fragmento de VWF útil en este documento puede modificarse además para mejorar su interacción con FVIII, por ejemplo, para mejorar la afinidad de unión a FVIII. Como ejemplo no limitante, el fragmento de VWF comprende un residuo de serina en el residuo correspondiente al aminoácido 764 de SEQ ID NO: 21 y un residuo de lisina en el residuo correspondiente al aminoácido 773 de SEQ ID NO: 21. Los residuos 764 y/o 773 pueden contribuir a la afinidad de unión de las proteínas VWF a FVIII. En otras realizaciones, los fragmentos de VWF útiles para la invención pueden tener otras modificaciones, por ejemplo, la proteína puede pegilarse, glucosilarse, hesilarse o polisialilarse.

II. B. Secuencias de XTEN

Como se usa en este documento "secuencia de XTEN" se refiere a polipéptidos de longitud ampliada con secuencias que no son de origen natural, sustancialmente no repetitivas que están compuestas principalmente de pequeños aminoácidos hidrófilos, teniendo la secuencia un bajo grado o nada de estructura secundaria o terciaria en condiciones fisiológicas. Como compañero de la proteína, los XTEN pueden servir como vehículo, que confiere determinadas propiedades farmacocinéticas, fisicoquímicas y farmacéuticas deseables cuando se ligan a una proteína VWF o una secuencia de FVIII de la invención para crear una proteína quimérica. Dichas propiedades deseables incluyen, aunque sin limitación, parámetros farmacocinéticos y características de solubilidad potenciados. Como se usa en este documento, "XTEN" excluye específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpo tales como anticuerpos monocatenarios o fragmentos Fc de una cadena ligera o una cadena pesada.

La presente invención proporciona que una secuencia de XTEN más corta proporciona una propiedad prolongadora de la semivida mejorada en comparación con una secuencia de XTEN más larga cuando la secuencia de XTEN se fusiona a un fragmento de VWF. Por lo tanto, la secuencia de XTEN fusionada a un fragmento de VWF contiene menos de 288 aminoácidos de longitud, es decir, es más corta que 288 aminoácidos. En una realización, la secuencia de XTEN fusionada a un fragmento de VWF consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud entre 12 aminoácidos y 287 aminoácidos. En otra realización, la secuencia de XTEN fusionada a un fragmento de VWF comprende al menos aproximadamente 36 aminoácidos, al menos aproximadamente 42 aminoácidos, al menos aproximadamente 72 aminoácidos o al menos aproximadamente 144 aminoácidos, pero menos de 288 aminoácidos. En otras realizaciones, la secuencia de XTEN fusionada a un fragmento de VWF se selecciona de AE36, AG36, AE42, AG42, AE72, AG72, AE144 y/o AG144. En una realización, la secuencia de XTEN fusionada a un fragmento de VWF es una secuencia de aminoácido al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 14, en la que la proteína quimérica presenta una semivida mejorada en comparación con una proteína quimérica sin la secuencia de XTEN.

La proteína quimérica de la invención puede comprender además una (tercera o más) secuencia de XTEN adicional. La secuencia de XTEN adicional puede fusionarse además a la proteína FVIII o la primera región Fc. Las secuencias de XTEN adicionales pueden ser de cualquier longitud. Por ejemplo, la secuencia de XTEN adicional fusionada a la proteína FVIII o la primera región Fc es un péptido o un polipéptido que tiene más de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, o 2000 residuos aminoacídicos. En determinadas realizaciones, la secuencia de XTEN adicional es un péptido o un polipéptido que tiene más de aproximadamente 20 a aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos, más de aproximadamente 30 a aproximadamente 2500 residuos, más de aproximadamente 40 a aproximadamente 2000 residuos, más de aproximadamente 50 a aproximadamente 1500 residuos, más de aproximadamente 60 a aproximadamente 1000 residuos, más de aproximadamente 70 a aproximadamente 900 residuos, más de aproximadamente 80 a aproximadamente 800 residuos, más de aproximadamente 90 a aproximadamente 700 residuos, más de aproximadamente 100 a aproximadamente 600 residuos, más de aproximadamente 110 a aproximadamente 500 residuos o más de aproximadamente 120 a aproximadamente 400 residuos.

Las secuencias de XTEN (es decir, la secuencia de XTEN fusionada a la proteína VWF y/o la segunda región Fc o la secuencia de XTEN fusionada a la proteína FVIII y/o la primera región Fc o insertada en uno o más sitios de inserción dentro de la proteína FVIII) pueden comprender uno o más motivos de secuencia de 9 a 14 residuos aminoacídicos o una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica al motivo de secuencia, en la que el motivo comprende, consiste esencialmente en o consiste en 4 a 6 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P). Véase el documento US 2010-0239554 A1.

En algunas realizaciones, la secuencia de XTEN comprende motivos de secuencia no solapantes en que al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 85 %, 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 la secuencia consiste en múltiples unidades de secuencias no solapantes seleccionadas de una sola familia de motivos seleccionada de la tabla 2A, produciendo una secuencia de la familia. Como se usa en este documento, "familia" significa que el XTEN tiene motivos seleccionados solamente de una sola categoría de motivos de la tabla 2A; es decir, XTEN AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC o BD, y que cualquier otro aminoácido en el XTEN que no sea de un motivo de la familia se selecciona para conseguir una propiedad necesaria, tal como para permitir la incorporación de un sitio de restricción mediante los nucleótidos codificantes, la incorporación de una secuencia de escisión o para conseguir una mejor unión a FVIII o VWF. En algunas realizaciones de 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, presentando el XTEN resultante el intervalo de homología descrito anteriormente. En otras realizaciones, el XTEN comprende múltiples unidades de secuencias de motivo de dos o más de las familias de motivos de la tabla 2A. 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 las confiere la composición de aminoácidos de los motivos, descritos más completamente a continuación. En las realizaciones descritas anteriormente en este documento en este párrafo, los motivos incorporados en el XTEN pueden seleccionarse y ensamblarse usando los métodos descritos en este documento para conseguir un XTEN de aproximadamente 36 a aproximadamente 3000 residuos aminoacídicos.

Tabla 2A. Motivos de secuencia de XTEN de 12 aminoácidos y familias de motivos

Familia del motivo*	Secuencia del motivo
AD	GESPGGSSGSES (SEQ ID NO: 24)
AD	GSEGSSGPGESS (SEQ ID NO: 25)
AD	GSSGESGSEGGP (SEQ ID NO: 26)
AD	GSGGEPSESGSS (SEQ ID NO: 27)
AE, AM	GSPAGSPTSTEE (SEQ ID NO: 28)
AE, AM, AQ	GSEPATSGSETP (SEQ ID NO: 29)
AE, AM, AQ	GTSESATPESGP (SEQ ID NO: 30)
AE, AM, AQ	GTSTEPSEGSAP (SEQ ID NO: 31)
AF, AM	GSTSESPSGTAP (SEQ ID NO: 32)
AF, AM	GTSTPESGSASP (SEQ ID NO: 33)
AF, AM	GTSPSGESSTAP (SEQ ID NO: 34)
AF, AM	GSTSSTAESPGP (SEQ ID NO: 35)
AG, AM	GTPGSGTASSSP (SEQ ID NO: 36)
AG, AM	GSSTPSGATGSP (SEQ ID NO: 37)
AG, AM	GSSPSASTGTGP (SEQ ID NO: 38)

Familia del motivo*	Secuencia del motivo
AG, AM	GASPGTSSTGSP (SEQ ID NO: 39)
AQ	GEPAGSPTSTSE (SEQ ID NO: 40)
AQ	GTGEPSSSTPASE (SEQ ID NO: 41)
AQ	GSGPSTESAPTE (SEQ ID NO: 42)
AQ	GSETPSGPSETA (SEQ ID NO: 43)
AQ	GPSETSTSEPGA (SEQ ID NO: 44)
AQ	GSPSEPTEGTSA (SEQ ID NO: 45)
BC	GSGASEPTSTEP (SEQ ID NO: 46)
BC	GSEPATSGTEPS (SEQ ID NO: 47)
BC	GTSEPSTSEPGA (SEQ ID NO: 48)
BC	GTSTEPSEPGSA (SEQ ID NO: 49)
BD	GSTAGSETSTEA (SEQ ID NO: 50)
BD	GSETATSGSETA (SEQ ID NO: 51)
BD	GTSESATSESGA (SEQ ID NO: 52)
BD	GTSTEASEGSAS (SEQ ID NO: 53)
* Indica secuencias de motivo individuales que, cuando se usan juntas en diversas permutaciones, producen una "secuencia de familia"	

5 En algunas realizaciones, la secuencia de XTEN usada en la invención es al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en AE42, AG42, AE48, AM48, AE72, AG72, AE108, AG108, AE144, AF144, AG144, AE180, AG180, AE216, AG216, AE252, AG252, AE288, AG288, AE324, AG324, AE360, AG360, AE396, AG396, AE432, AG432, AE468, AG468, AE504, AG504, AF504, AE540, AG540, AF540, AD576, AE576, AF576, AG576, AE612, AG612, AE624, AE648, AG648, AG684, AE720, AG720, AE756, AG756, AE792, AG792, AE828, AG828, AD836, AE864, AF864, AG864, AM875, AE912, AM923, AM1318, BC864, BD864, AE948, AE1044, AE1140, AE1236, AE1332, AE1428, AE1524, AE1620, AE1716, AE1812, AE1908, AE2004A, AG948, AG1044, AG1140, AG1236, AG1332, AG1428, AG1524, AG1620, AG1716, AG1812, AG1908, y AG2004. Véase el documento US 2010-0239554 A1.

15 En una realización, la secuencia de XTEN es al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en AE42 (SEQ ID NO: 9), AE72 (SEQ ID NO: 10), AE144 2A (SEQ ID NO: 55), AE144 3B (SEQ ID NO: 56), AE144 4A (SEQ ID NO: 57), AE144 5A (SEQ ID NO: 58), AE144 6B (SEQ ID NO: 59), AG144 A (SEQ ID NO: 60), AG144 B (SEQ ID NO: 61), AG144 C (SEQ ID NO: 62), AG144 F (SEQ ID NO: 63), AE864 (SEQ ID NO: 15), AE576 (SEQ ID NO: 16), AE288 (SEQ ID NO: 8), AE288 2 (SEQ ID NO: 54), AE144 (SEQ ID NO: 11), AG864 (SEQ ID NO: 17), AG576 (SEQ ID NO: 18), AG288 (SEQ ID NO: 19), AG144 (SEQ ID NO: 14), y cualquier combinación de las mismas. En otra realización, la secuencia de XTEN se selecciona del grupo que consiste en AE42 (SEQ ID NO: 9), AE72 (SEQ ID NO: 10), AE144 2A (SEQ ID NO: 55), AE144 3B (SEQ ID NO: 56), AE144 4A (SEQ ID NO: 57), AE144 5A (SEQ ID NO: 58), AE144 6B (SEQ ID NO: 59), AG144 A (SEQ ID NO: 60), AG144 B (SEQ ID NO: 61), AG144 C (SEQ ID NO: 62), AG144 F (SEQ ID NO: 63), AE864 (SEQ ID NO: 15), AE576 (SEQ ID NO: 16), AE288 (SEQ ID NO: 8), AE288 2 (SEQ ID NO: 54), AE144 (SEQ ID NO: 11), AG864 (SEQ ID NO: 17), AG576 (SEQ ID NO: 18), AG288 (SEQ ID NO: 19), AG144 (SEQ ID NO: 14), y cualquier combinación de las mismas. En una realización específica, la secuencia de XTEN es AE288. Las secuencias de aminoácidos para determinadas secuencias de XTEN de la invención se muestran en la tabla 2B.

Tabla 2B. Secuencias de XTEN

XTEN	Secuencia de aminoácidos
AE42 SEQ ID NO: 9	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS
AE72 SEQ ID NO: 10	GAP TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG TSTEPSEGSAPGASS
AE144 SEQ ID NO: 11	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESA PESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144 2A (SEQ ID NO: 55)	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPG

ES 2 982 051 T3

XTEN	Secuencia de aminoácidos
AE144_3B (SEQ ID NO: 56)	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
AE144_4A (SEQ ID NO: 57)	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_5A (SEQ ID NO: 58)	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEG
AE144_6B (SEQ ID NO: 59)	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AG144 SEQ ID NO:14	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTSGTASSSPGSSTPSGATGSP
AG144_A (SEQ ID NO: 60)	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_B (SEQ ID NO: 61)	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_C (SEQ ID NO: 62)	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS PSGATGSPGASPGTSSTGSP
AG144_F (SEQ ID NO: 63)	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS PSGATGSPGASPGTSSTGSP
AE288 SEQ ID NO: 8	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE288_2 (SEQ ID NO: 54)	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT
	SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG288 SEQ ID NO:19	PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP

XTEN	Secuencia de aminoácidos
AE576 SEQ ID NO:16	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG576 SEQ ID NO:18	PGTPGSGTASSSPGSSPTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPTPSGATG SPGSSPTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTSPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPTPSGATGSPGSSPTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPTPSGATGSPGSSPTPSGATGSPGSSPTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG TSSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPT PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS
AE864 SEQ ID NO:15	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG864 SEQ ID NO:17	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPTPSGATGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSPTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPTPSGA TGSPGSSPTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPTPSGATGSPGSSPT SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPTPSGATGSPGSSPTPSGATGSPGSS PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPTPSGATGSPG SSPTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSPTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGSSPTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSPTPSGATGSPGSSPTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

En esas realizaciones en las que uno o más componentes del XTEN tienen menos de un 100 % de sus aminoácidos que consisten en 4, 5 o 6 tipos de aminoácido 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 contiene al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de aminoácidos hidrófilos. Los aminoácidos de XTEN que no son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P) se intercalan por toda la secuencia de XTEN, se localizan dentro o entre los motivos de secuencia, o se concentran en uno o más tramos cortos de la secuencia de XTEN, por ejemplo, para crear un conector entre los componentes de XTEN y de FVIII o VWF. En dichos casos donde el componente de XTEN 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 en general carezcan de

estructura secundaria, por ejemplo, que no tienen más de un 2 % de hélices alfa o un 2 % de láminas beta, como se determina por los métodos divulgados en este documento. Los residuos hidrófobos que están menos favorecidos en la construcción de XTEN incluyen triptófano, fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina, valina y metionina. Además, se pueden diseñar las secuencias de 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 nada 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 algunas realizaciones, el componente de XTEN 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 las láminas beta como se mide por el algoritmo de Chou-Fasman y tener al menos un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % o más de formación de enrollamiento aleatorio como se mide por el algoritmo GOR.

En otras realizaciones, la secuencia de XTEN usada en la invención afecta a la propiedad física o química, por ejemplo, farmacocinética, de la proteína quimérica de la presente invención. La secuencia de XTEN usada en la presente invención puede presentar una o más de las siguientes propiedades ventajosas: flexibilidad conformacional, solubilidad acuosa potenciada, alto grado de resistencia a proteasa, baja inmunogenia, baja unión a receptores de mamífero, o radios hidrodinámicos (o de Stokes) aumentados. En una realización específica, la secuencia de XTEN ligada a una proteína FVIII en esta invención aumenta las propiedades farmacocinéticas tales como semivida terminal más larga o área bajo la curva (ABC) aumentada, de modo que la proteína quimérica descrita en este documento permanece *in vivo* durante un periodo aumentado de tiempo en comparación con FVIII de tipo silvestre. En otras realizaciones, la secuencia de XTEN usada en esta invención aumenta las propiedades farmacocinéticas tales como semivida terminal más larga o área bajo la curva (ABC) aumentada, de modo que la proteína FVIII permanece *in vivo* durante un periodo aumentado de tiempo en comparación con FVIII de tipo silvestre.

De acuerdo con la presente invención, una proteína de fusión de FVIII/VWF quimérica comprende una parte de FVIII fusionada a una región Fc y una parte de VWF fusionada a una región Fc, en la que se inserta una secuencia de XTEN (por ejemplo, AE288) dentro de la parte de FVIII, y en la que se inserta una secuencia de XTEN que tiene menos de 288 aminoácidos (por ejemplo, AE144) entre la parte de VWF y la parte de Fc. Como se describe en los ejemplos, la inserción de un XTEN que tiene menos de 288 aminoácidos entre la parte de VWF y la parte de Fc tiene un mayor efecto sobre la farmacocinética de la proteína quimérica que la inserción de un XTEN que tiene 288 aminoácidos entre la parte de VWF y la parte de Fc. Por ejemplo, la inserción de una secuencia de XTEN que tiene menos de 288 aminoácidos entre la parte de VWF y la parte de Fc en la proteína de fusión de FVIII/VWF puede aumentar la semivida terminal de la proteína quimérica en comparación con un XTEN que tiene 288 aminoácidos. En algunas realizaciones, la semivida terminal aumenta en al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 % o al menos aproximadamente un 30 %, con respecto a la inserción de una secuencia de XTEN que tiene 288 aminoácidos. En una realización particular, la semivida terminal aumenta en al menos aproximadamente un 35 % con respecto a la inserción de un XTEN que tiene 288 aminoácidos. La inserción de una secuencia de XTEN que tiene menos de 288 aminoácidos también puede aumentar el valor de ABC de la proteína quimérica. En algunas realizaciones, la ABC aumenta en al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 100 % o al menos aproximadamente un 200 % con respecto a la inserción de un XTEN que tiene 288 aminoácidos. En una realización particular, la ABC aumenta en aproximadamente dos veces. La inserción de una secuencia de XTEN que tiene menos de 288 aminoácidos también puede reducir la eliminación de la proteína quimérica. Por ejemplo, la eliminación puede disminuirse en al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 % o al menos aproximadamente un 30 %, con respecto a la inserción de una secuencia de XTEN que tiene 288 aminoácidos. La inserción de una secuencia de XTEN que tiene menos de 288 aminoácidos puede aumentar el tiempo medio de residencia (MRT) y/o disminuir el volumen aparente de distribución en estado de equilibrio (V_{ss}) con respecto a la inserción de un XTEN que tiene 288 aminoácidos.

Puede emplearse una diversidad de métodos y ensayos para determinar las propiedades físicas/químicas de proteínas que comprenden la secuencia de XTEN. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, 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 UV/visible. Se divulgan métodos adicionales en Amau *et al.*, Prot Expr and Purif 48, 1-13 (2006).

Ejemplos adicionales de secuencias de XTEN que pueden usarse de acuerdo con la presente invención y se divulgan en las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2010/023954 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 o 2011/0172146 A1, o las publicaciones de patente internacional n.º WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1, WO 2011028344 A2 o WO 20130122617 A1.

II.C. Proteína de factor VIII (FVIII)

"Una proteína FVIII", como se usa en este documento, significa un polipéptido FVIII funcional en su función normal en

coagulación, salvo que se indique de otro modo. La expresión una proteína FVIII incluye un fragmento funcional, variante, análogo o derivado del mismo que retiene la función del factor VIII de tipo silvestre de longitud completa en la ruta de coagulación. "Una proteína FVIII" se usa indistintamente con polipéptido (o proteína) de FVIII o FVIII. Ejemplos de las funciones de FVIII incluyen, aunque sin limitación, una capacidad de activar la coagulación, una capacidad de actuar como cofactor para el factor IX, o una capacidad para formar un complejo de tenasa con factor IX en presencia de Ca^{2+} y fosfolípidos, que entonces convierte el factor X en la forma activada Xa. La proteína FVIII puede ser la proteína FVIII humana, porcina, canina, de rata o murina. Además, comparaciones entre FVIII de seres humanos y otras especies han identificado residuos conservados que probablemente se requieren para la función (Cameron *et al.*, *Thromb. Haemost.* 79:317-22 (1998); documento US 6.251.632). De acuerdo con la presente invención, la proteína FVIII comprende el dominio A1, dominio A2 y una parte del dominio B de FVIII maduro de longitud completa (SEQ ID NO: 65).

Están disponibles varios ensayos para evaluar la función del sistema de coagulación: ensayos de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), ensayo cromogénico, ensayo de ROTEM, ensayo de tiempo de protrombina (PT) (también usado para determinar INR), ensayo de fibrinógeno (a menudo mediante el método de Clauss), recuento de plaquetas, ensayo de función plaquetaria (a menudo mediante PFA-100), TCT, tiempo de hemorragia, ensayo de mezcla (donde se corrige una anomalía si el plasma del paciente se mezcla con plasma normal), ensayos de factor de coagulación, anticuerpos antifosfolípido, dímero D, ensayos genéticos (por ejemplo, factor V Leiden, mutación de protrombina G20210A), tiempo de dilución de veneno de víbora de Russell (dRVVT), ensayos variados de función plaquetaria, tromboelastografía (TEG o Sonoclot), tromboelastometría (TEM[®], por ejemplo, ROTEM[®]) o tiempo de lisis de euglobulina (ELT).

El ensayo de aPTT es un indicador de funcionamiento que mide la eficacia tanto de la ruta de coagulación "intrínseca" (también denominada ruta de activación por contacto) como de la común. Este ensayo se usa normalmente para medir la actividad de coagulación de factores de coagulación recombinantes disponibles en el mercado, por ejemplo, FVIII o FIX. Se usa junto con el tiempo de protrombina (PT), que mide la ruta extrínseca.

El análisis ROTEM proporciona información sobre la cinética global de la hemostasis: tiempo de coagulación, formación del coágulo, estabilidad del coágulo y lisis. Los diferentes parámetros en tromboelastometría dependen de la actividad del sistema de coagulación plasmático, la función plaquetaria, la fibrinólisis o muchos factores que influye en estas interacciones. Este ensayo puede proporcionar una visión completa de la hemostasis secundaria.

Las secuencias polipeptídicas y polinucleotídicas de FVIII son conocidas, como lo son muchos fragmentos funcionales, mutantes y versiones modificadas. Ejemplos de secuencias de FVIII humanas (de longitud completa) se muestran a continuación.

Tabla 3. Secuencia de aminoácidos de factor VIII de longitud completa

(FVIII de longitud completa (péptido señal de FVIII subrayado; cadena pesada de FVIII con doble subrayado; dominio B en cursiva; y cadena ligera de FVIII en texto sin formato)

<p>Péptido señal: (SEQ ID NO: 64) <u>MQIELSTCFFLCLLRFCFS</u></p>
<p>Factor VIII maduro (SEQ ID NO: 65)*</p> <p><u>ATRRYYLGAVELSDYMQSDLDGELPVDARFPPRPVKSPFPNTSVVYKKTFLVVEFTDHLFNI AKPRPPW MGLL</u> <u>GPTIQAEVYDVTVITLTKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYWQVLKEN</u> <u>GPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDGKSWHSETKNSL</u> <u>MQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPLGIGCHRKSVYWHVIGMGTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEI</u> <u>SPITFLTAQTLMLDLGQFLFLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCEPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDS EMDVVR</u> <u>DDNSPSTFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSOYLNNGPORIGRKYKVKVRFMAYT</u> <u>DEFKKTREAIQHESGILGPLYLGEVGDILLIIFKNQASRPYNTIYPHGTITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPIL</u> <u>PGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFNMERDLASGLIGPLLIICYKESVDQRGNQIMSDKRNVI L F</u> <u>SVFDENRSWYLTENIQRF LNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYIILSIGAQTDF</u> <u>LSVFFSGYTFKHKMVEYEDTTLFPFSGETVFMSEMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVS SCDKNTGDYIE</u> <u>DSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD PWF AHRTPMPKI QNVSSDLLM</u> <u>LLPQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGALDSNNSLSEMT HFRPQLHHS GDMVFT PESGLQLRLNEKLG</u> <u>TTAAETLKKLDFKVSSTSNL ISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLD TTF LGKKSSPLTESGGPL</u> <u>SLSEENNDKLLSGLMNSQESSWGKNVSTESGRLFKGKRAHG PALLTKDNALFKVSI SL LKTKNTSNNSA</u> <u>TNRKTHIDGPSLLIENS PSVWQNI LESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTS SKNMEMVQQK</u> <u>KEGPIPPDAQNPMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPS PKQLVSLGFEKSVEGQNFLESKNKVVV</u> <u>GRGEFTKDVGLKEMVEPSSRNLF LTNLDNLHENNTHNQEKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFM</u> <u>KNLFLLS TRQNVESYDGAYAPVLQDFRSLNDS TNRKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTR</u> <u>ISEPNTSQNFVTRQSKRALQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQS</u> <u>PLSDCLTRSHSIPQANRSLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAAS YRKKDSGVQESSHPLQGAKK</u> <u>NNLSLAILLTEM TG DQREVGS LGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSCKVELLPKVHIYQKDLFP TETS N</u> <u>GSFPGHLDLVEGSLIQGTGEGAIKWNEANRP GKVPFLRVATESSAKT PSKLLDPLAWDNHYGTQIPKBEWKSQE</u> <u>KSFEKTAFFKKKDTIISLNACESNHAAIAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVPLKRHQREITRTTLQ</u> <u>SDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKT RHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVP</u> <u>QFKKVVQFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYI RAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSI SYEEDQRQGA</u> <u>EPRKNFVKPNETKTYFQVQHHMAPTKDEFDC KAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVT</u> <u>VQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFAINGYIMDTLPLGLVMAQDQIRIRWYL</u> <u>LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV</u> <u>YSNKCQTFPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHGIKTQG</u> <u>ARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTG TLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIARYIRLHPHYSIRS</u> <u>TLRMELMGCDLNSC S M PLG M ESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPEKWLQV</u> <u>DFQKTMKVTGVTQGVKSLLSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTR</u> <u>YLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY</u></p>

Tabla 4. Secuencia de nucleótidos que codifica FVIII de longitud completa (SEQ ID NO: 66)*

661					ATG CAAATAGAGC TCTCCACCTG
721	CTTCTTTCTG	TGCCTTTTGC	GATTCTGCTT	TAGTGCCACC	AGAAGATACT ACCTGGGTGC
781	AGTGGAAC TG	TCATGGGACT	ATATGCAAAG	TGATCTCGGT	GAGCTGCCTG TGGACGCAAG
841	ATTTCCTCCT	AGAGTGCCAA	AATCTTTTCC	ATTCAACACC	TCAGTCGTGT ACAAAAAGAC
901	TCTGTTTGTA	GAATTCACGG	ATCACCTTTT	CAACATCGCT	AAGCCAAGGC CACCCTGGAT
961	GGGTCTGCTA	GGTCC TACCA	TCCAGGCTGA	GGTTTATGAT	ACAGTGGTCA TTACACTTAA
1021	GAACATGGCT	TCCCATCCTG	TCAGTCTTCA	TGCTGTGGT	GTATCCTACT GGAAAGCTTC
1081	TGAGGGAGCT	GAATATGATG	ATCAGACCAG	TCAAAGGGAG	AAAGAAGATG ATAAAGTCTT
1141	CCCTGGTGGA	AGCCATACAT	ATGTCTGGCA	GGTCTGAAA	GAGAA TGGTC CAATGGCCTC
1201	TGACCCACTG	TGCCTTACCT	ACTCATATCT	TTCTCATGTG	GACCTGGTAA AAGACTTGAA
1261	TTCAGGCCTC	ATTGGAGCCC	TACTAGTATG	TAGAGAAGGG	AGTCTGGCCA AGGAAAAGAC
1321	ACAGACCTTG	CACAAATTTA	TACTACTTTT	TGCTGTATTT	GATGAAGGCA AAAGTTGGCA
1381	CTCAGAAACA	AAGAATCCTT	TGATGCAGGA	TAGGGATGCT	GCATCTGCTC GGGCCTGGCC
1441	TAAAAATGCAC	ACAGTCAATG	GTTATGTAAG	CAGGTCTCTG	CCAGGTCTGA TTGGATGCCA
1501	CAGGAAATCA	GTCTATGGC	ATGPGATTGG	AATGGGCACC	ACTCCTGAAG TGC ACTCAAT
1561	ATTCTCTGAA	GGTCACACAT	TTCTTGTGAG	GAACCATCGC	CAGGCGTCTT TGGAAATCTC
1621	GCCAATAACT	TTCTTACTG	CTCAAACACT	CTTGATGGAC	CTTGGACAGT TTCTACTGTT

ES 2 982 051 T3

1681 TTGTCATATC TCTTCCCACC AACATGATGG CATGGAAGCT TATGTCAAAG TAGACAGCTG
1741 TCCAGAGGAA CCCCAACTAC GAATGAAAA TAATGAAGAA GCGGAAGACT ATGATGATGA
1801 TCTTACTGAT TCTGAAATGG ATGTGGTCAG GTTTGATGAT GACAACTCTC CTTCCTTTAT
1861 CCAAATTCGC TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAAACCTGG GTACATTACA TTGCTGCTGA
1921 AGAGGAGGAC TGGGACTATG CTCCCTTAGT CCTCGCCCCC GATGACAGAA GTTATAAAAAG
1981 TCAATATTTG AACCAATGGCC CTCAGCGGAT TGGTAGGAAG TACAAAAAAG TCCGATTTAT
2041 GGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTATP CAGCATGAAT CAGGAATCPT
2101 GGGACCTTTA CTTTATGGGG AAGTTGGAGA CACACTGTTG ATTATATTTA AGAATCAAGC
2161 AAGCAGACCA TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT GTCCGTCCCT TGTATTC AAG
2221 GAGATTACCA AAAGTGTA AACTTTGAA GGATTTTCCA ATTCTGCCAG GAGAAATATT
2281 CAAATATAAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT AAATCAGATC CTCGGTGCCT
2341 GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATAT GGAGAGAGAT CTAGCTTCAG GACTCATTGG
2401 CCTCTCCCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGA GGAACCAGA TAATGTCAGA
2461 CAAGAGGAAT GTCATCCTGT TTTCTGTATT TGATGAGAAC CGAAGCTGGT ACCTCACAGA
2521 GAATATACAA CGCTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCAG CTTGAGGATC CAGAGTTCCA
2581 AGCCTCCAAC ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTI GATAGTTTGC AGTTGTCAGT
2641 TTGTTTGCA T GAGGTGGCAT ACTGGTACAT TTAAGCATP GGAGCACAGA CTGACTTCCT
2701 TTCTGTCTTC TTCTCTGGAT ATACCTTCAA ACACAAAATG GTCTATGAAG ACACACTCAC
2761 CCTATTTCCA TTCTCAGGAG AAACCTGTCTT CATGTCCATG GAAAACCCAG GTCTATGGAT
2821 TCTGGGGTGC CACAACCTCAG ACTTTCCGAA CAGAGGCATG ACCGCCTTAC TGAAGTPTC
2881 TAGTTGTGAC AAGAACA CTG GTGATTATTA CGAGGACAGT TATGAAGATA TTTCAGCATA
2941 CTTGCTGAGT AAAAAAATG CCATTTGACC AAGAAGCTTC TCCAGAATT CAAGACACCC
3001 TAGCACTAGG CAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTCCA GAAAATGACA TAGAGAGAC
3061 TGACCCTTGG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAATA CAAAATGTCT CCTCTAGTGA
3121 TTTGTTGATG CTCTTGGCAG AGAGTCCCTAC TCCACATGGG CTATCCTTAT CTGATCTCCA
3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT GGAGCAATAG ACAGTAATAA
3241 CAGCCTGTCT GAAATGACAC ACTTCAGGCC ACAGCTCCAT CACAGTGGGG ACATGTTATT
3301 TACCCCTGAG TCAGGCCCTCC AATTAAGATT AAATGAGAAA CTGGGGACAA CTGCAGCAAC
3361 AGAGTTGAAG AAACCTGATT TCAAAGTTT TTAGTACATCA AATAATCTGA TTTCAACAAT
3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTACTGA TAATACAAGT TCCTTAGGAC CCCC AAGTAT
3481 GCCAGTTTCA TATGATAGTC AATTAGATAC CACTCTATTT GGC AAAAAGT CATCTCCCT
3541 TACTGAGTCT GGTGGACCTC TGAGCTTGAG TGAAGAAAAT AATGATTC AAGTTGTAGA
3601 ATCAGGTTTA ATGAATAGCC AAGAAAGTTC ATGGGGAAAA AATGTATCTG ACACAGAGAG
3661 TGGTAGGTTA TTTAAAGGGA AAAGAGCTCA TGGACCTGCT TTTGTTGACTA AAGATAATGC
3721 CTTATTCAA GTTAGCATCT CTTTGTAAA GACAAAACAA ACTTCCAATA ATTCAGCAAC
3781 TAATAGAAAG ACTCACATTG ATGGCCCATC ATTATTAATP GAGAATAGTC CATCAGTCTG
3841 GCAAAATATA TTAGAAAGTG AACTGAGTT TAAAAAAGTG ACACCTTTGA TTCATGACAG
3901 AATGCTTATG GACAAAATG CTACAGCTTT GAGGCTAAAT CATATGTCAA ATAAAAC TAC
3961 TTCTACAAA AACATGGAAA TGGTCCACA GAAAAAAGAG GGCCCATTC CACAGATGC
4021 ACAAATCCA GATATGTCGT TCTTTAAGAT GCTATTCTTG CCAGAATCAG CAAGGTGGAT
4081 ACAAAGGACT CATGGAAGA ACTCTCTGAA CTCTGGGCAA GGCCCGACTC CAAAGCAATT
4141 AGTATCCTTA GGACCAGAAA AATCTGTGGA AGGTGAGAA TTTCTGTCTG AGAAAAACAA
4201 AGTGGTAGTA GGAAGGGTG AATTTACAAA GGACGTAGGA CTC AAAGAGA TGGTTTTTCC
4261 AAGCAGCAGA AACCTATTT TACTAACTT GGATAATTTA CATGAAAATA ATACACACAA
4321 TCAAGAAAA AAAATTCAGG AAGAAATAGA AAAGAAGGAA ACATTAATCC AAGAGAATGT
4381 AGTTTGCCT CAGATACATA CAGTACTGG CACTAAGAA TTTATGAAGA ACCTTTTCTT
4441 ACTGAGCACT AGGCAAAATG TAGAAGGTTT ATATGACGGG GCATATGCTC CAGTACTTCA
4501 AGATTTTAGG TCATTAATG ATTTCAACAA TGAACAAAC AAACACACAG CTCATTTCTC
4561 AAAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGG AAGG CTGGGAAAT CAAACCAAGC AAATTTGAGA
4621 GAAATATGCA TGCACCACAA GGATATCTCC TAATACAAGC CAGCAGAATT TTGTCACGCA
4681 ACGTAGTAAG AGAGCTTTGA AACAATTCAG ACTCCCCTA GAAGAAACAG AACTTGAAAA
4741 AAGGATAATT GTGGATGACA CCTCAACCCA GTGGTCCAAA AACATGAAAC ATTTGACCCC
4801 GAGCACCCCTC ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA GGGGCCATTA CTCAGTCTCC
4861 CTTATCAGAT TGCCCTACGA GGAGTCTATG CATCCCTCAA GCAAATAGAT CTC CATTACC
4921 CATTGCAAAG GTATCATCAT TTCCATCTAT TAGACCTATA TATCTGACCA GGGTCTTATT
4981 CCAAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA AAGAAAGATT CTGGGGTCCA
5041 AGAAAGCAGT CATTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAAC CTTTCTTTAG CCATTC AAC
5101 CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGAGAGGT TGGCTCCCTG GGGACAAGTG CCACAATTC
5161 AGTCACATAC AAGAAAGTTG AGAACACTGT TCTCCCGAAA CCAGACTTGC CCAAAACATC

5221	TGGCAAAGTT	GAATTGCTTC	CAAAAGTTC	CATTTATCAG	AAGGACCTAT	TCCCTACGGA
5281	AACTAGCAAT	GGGTCTCCTG	GCCATCTGGA	TCTCGTGGAA	GGGAGCCTTC	TTCAGGGAAC
5341	AGAGGGAGCG	ATTAAGTGG	ATGAAGCAAA	CAGACCTGGA	AAAGTTCCCT	TTCTGAGAGT
5401	AGCAACAGAA	AGCTCTGCAA	AGACTCCCTC	CAAGCTATTG	GATCCTCTTG	CTTGGAATAA
5461	CCACTATGGT	ACTCAGATAC	CAAAAGAAGA	GTGGAAATCC	CAAGAGAAGT	CACCAGAAAA
5521	AACAGCTTTT	AAGAAAAAGG	ATACCATTTT	GTCCCTGAAC	GCTTGTGAAA	GCAATCATGC
5581	AATAGCAGCA	ATAAATGAGG	GACAAAAATA	GCCCGAAATA	GAAGTCACCT	GGGCAAAGCA
5641	AGGTAGGACT	GAAAGGCTGT	GCTCTCAAAA	CCCACCAGTC	TTGAAACGCC	ATCAACGGGA
5701	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG	ATACCATATC
5761	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC	AGAGCCCCCG
5821	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC	TCTGGGATTA
5881	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA	GTGTCCCTCA
5941	GTTCAAGAAA	GTTGTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC	CCTTATAACCG
6001	TGGAGAACTA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG	AAGTTGAAGA
6061	TAATATCATG	GTAACCTTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCCTTCT	ATTCTAGCCT
6121	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAAATC	TTGTCAAGCC
6181	TAATGAAACC	AAAACCTTACT	TTTGGAAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA	CTAAAGATGA
6241	GTTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTCTC	TGATGTTGAC	CTGGAAAAAG	ATGTGCACTC
6301	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA	CACTAACACA	CTGAACCCCTG	CTCATGGGAG
6361	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTCACCATC	TTTGATGAGA	CCAAAAGCTG
6421	GTAATTCACT	GAAAATATGG	AAAGAACTG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC	AGATGGGAAGA
6481	TCCCACTTTT	AAAGAGAATT	ATCGTTCCTA	TGCAATCAAT	GGCTACATAA	TGGATACACT
6541	ACCTGGCTTA	GTAATGGCTC	AGGATCAAAG	GATTTCGATGG	TATCTGCTCA	GCATGGGCAG
6601	CAATGAAAAC	ATCCATTCTA	TTTATTTCTC	TGGACATGTG	TTCACTGTAC	GAAAAAAGA
6661	GGAGTATAAA	ATGGCACTGT	ACAATCTCTA	TCCAGGTGTT	TTTGAGACAG	TGGAAATGTT
6721	ACCATCCAAA	GCTGGAATTT	GGCGGGTGG	ATGCCTTATT	GGCGAGCATC	TACATGCTGG
6781	GATGAGCACA	CTTTTTCTGG	TGTACAGCAA	TAAGTGTGAG	ACTCCCCCTGG	GAATGGCTTC
6841	TGGACACATT	AGAGATTTTC	AGATTACAGC	TTTCAGGACAA	TATGGACAGT	GGGCCCCAAA
6901	GCTGGCCAGA	CTTCATTATT	CCGGATCAAT	CAATGCCTGG	AGCACCAAGG	AGCCCTTTTC
6961	TTGGATCAAG	GTGGATCTGT	TGGCACCAAT	GATTATTCAC	GGCATCAAGA	CCCAGGGTGC
7021	CCGTCCAGAA	TTCCTCCAGCC	TCTACATCTC	TCAGTTTATC	ATCATGTATA	GTCTTGATGG
7081	GAAGAAGTGG	CAGACTTATC	GAGGAAATTC	CACTGGAACC	TTAATGGTCT	TCTTTGGCAA
7141	TGTGGATTCA	TCTGGGATAA	AACACAATAT	TTTTAACCTT	CCAATTATTT	CTCGATACAT
7201	CCGTTTGCAC	CCAACTCATT	ATAGCATTCG	CAGCACTCTT	CGCATGGAGT	TGATGGGCTG
7261	TGATTTAAAT	AGTTGCAGCA	TGCCATTGGG	AATGGAGAGT	AAAGCAATAT	CAGATGCACA
7321	GATTACTGCT	TCATCCTACT	TTACCAATAT	GTTTGCCACC	TGGTCTCCTT	CAAAAGCTCG
7381	ACTTCACCTC	CAAGGGAGGA	GTAATGCCTG	GAGACCTCAG	GTGAATAATC	CAAAAGAGTG
7441	GCTGCAAGTG	GACTTCCAGA	AGACAATGAA	AGTCACAGGA	GTAACTACTC	AGGGAGTAAA
7501	ATCTCTGCTT	ACCAGCATGT	ATGTGAAGGA	GTTCCCTCATC	TCCAGCAGTC	AAGATGGCCA
7561	TCAGTGGACT	CTCTTTTTTC	AGAATGGCAA	AGTAAAGGTT	TTTCAGGGAA	ATCAAGACTC
7621	CTTCACACCT	GTGGTGAAC	CTCTAGACCC	ACCGTTACTG	ACTCGCTACC	TTCGAATTC
7681	CCCCCAGAGT	TGGGTGCACC	AGATTGCCCT	GAGGATGGAG	GTTCGGGCT	GCGAGGCACA
7741	GGACCTCTAC					

*Los ácidos nucleicos subrayados codifican un péptido señal.

- 5 Los polipéptidos de FVIII incluyen FVIII de longitud completa, FVIII de longitud completa menos Met en el extremo N, FVIII maduro (menos la secuencia señal), FVIII maduro con una Met adicional en el extremo N y/o FVIII con una eliminación completa o parcial del dominio B. En determinadas realizaciones, las variantes de FVIII incluyen eliminaciones del dominio B, sean eliminaciones parciales o completas.
- 10 La secuencia de FVIII humano maduro natural se presenta como SEQ ID NO: 65. Una proteína FVIII natural tiene la siguiente fórmula: A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2, donde A1, A2 y A3 son "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. Con referencia a la posición en la secuencia de aminoácidos primaria en SEQ ID NO:65, el dominio A1 de FVIII humano se extiende desde Ala1 hasta aproximadamente Arg336, la región espaciadora a1 se extiende desde aproximadamente Met337 hasta aproximadamente Val374, el dominio A2 se extiende desde aproximadamente Ala375 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 Arg 1648, la región espaciadora a3 se extiende desde aproximadamente Glu1649 hasta aproximadamente Arg1689, el dominio A3 se extiende desde aproximadamente Ser1690 hasta aproximadamente Leu2025, el dominio C1 se extiende desde aproximadamente Gly2026 hasta aproximadamente Asn2072 y el dominio C2 se extiende desde aproximadamente Ser2073 hasta Tyr2332. A diferencia de los sitios de escisión proteolítica específicos, la designación de las ubicaciones de los límites entre los dominios y las regiones de FVIII puede variar en diferentes referencias de la literatura. Los límites indicados en este documento, por lo tanto, se designan como aproximados mediante el uso del término "aproximadamente".

25

El gen de FVIII humano se aisló y se expresó en célula de mamífero (Toole, J. J., *et al.*, Nature 312:342-347 (1984); Gitschier, J., *et al.*, Nature 312:326-330 (1984); Wood, W. I., *et al.*, Nature 312:330-337 (1984); Vehar, G. A., *et al.*, Nature 312:337-342 (1984); documento WO 87/04187; documento WO 88/08035; documento WO 88/03558; y patente de Estados Unidos n.º 4.757.006). La secuencia de aminoácidos de FVIII se dedujo del ADNc como se muestra en la patente de Estados Unidos n.º 4.965.199. Además, FVIII con el dominio B parcial o completamente eliminado se muestra en las patentes de Estados Unidos n.º 4.994.371 y 4.868.112. En algunas realizaciones, el dominio B de FVIII humano se reemplaza con el dominio B del factor V humano como se muestra en la patente de Estados Unidos n.º 5.004.803. La secuencia de ADNc que codifica el factor VIII humano y la secuencia de aminoácidos se muestran en SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente, de la publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 2005/0100990.

La secuencia de FVIII porcino está publicada en Toole, J. J., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5939-5942 (1986). Además, la secuencia de ADNc porcina completa obtenida de la amplificación por PCR de secuencias de FVIII de una colección de ADNc de bazo de cerdo se ha presentado en Healey, J. F., *et al.*, Blood 88:4209-4214 (1996). El FVIII humano/porcino híbrido que tiene sustituciones de todos los dominios, todas las subunidades y secuencias de aminoácidos específicas se divulgaron en la patente de Estados Unidos n.º 5.364.771 de Lollar y Runge, y en el documento WO 93/20093. Más recientemente, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos correspondientes de los dominios A1 y A2 de FVIII porcino y un FVIII quimérico con dominios A1 y/o A2 porcinos sustituidos en los dominios humanos correspondientes se presentaron en el documento WO 94/11503. La patente de Estados Unidos n.º 5.859.204, Lollar, J. S., también divulga el ADNc porcino y las secuencias de aminoácidos deducidas. La patente de Estados Unidos n.º 6.458.563 divulga un FVIII porcino con el dominio B eliminado.

La patente de Estados Unidos n.º 5.859.204 de Lollar, J. S. presenta mutantes funcionales de FVIII que tiene antigenicidad reducida e inmunorreactividad reducida. La patente de Estados Unidos n.º 6.376.463 de Lollar, J. S. también presenta mutantes de FVIII que tienen inmunorreactividad reducida. La publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 2005/0100990 de Saenko *et al.* presenta mutaciones funcionales en el dominio A2 de FVIII.

En una realización, el FVIII (o parte de FVIII de una proteína quimérica) puede ser al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntico a una secuencia de aminoácidos de FVIII de los aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO: 67 o los aminoácidos 1 a 2332 de SEQ ID NO: 65 (sin una secuencia señal) o una secuencia de aminoácidos de FVIII de los aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 64 y 1 a 1438 de SEQ ID NO: 67 o los aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 64 y los aminoácidos 1 a 2332 de SEQ ID NO: 65 (con una secuencia señal), en el que el FVIII tiene una actividad coagulante, por ejemplo, activa el factor IX como cofactor para convertir el factor X en factor X activado. El FVIII (o parte de FVIII de una proteína quimérica) puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos de FVIII de los aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO: 67 o los aminoácidos 1 a 2332 de SEQ ID NO: 65 (sin una secuencia señal). El FVIII puede comprender además una secuencia señal.

El "dominio B" de FVIII, como se usa en este documento, es igual que el dominio B conocido en la técnica que se define por la identidad de secuencia de aminoácidos interna y los sitios de escisión proteolítica, por ejemplo, los residuos Ser741-Arg1648 de FVIII humano de longitud completa. Los otros dominios de FVIII humano se definen por los siguientes residuos aminoacídicos: A1, residuos Ala1-Arg372; A2, residuos Ser373-Arg740; A3, residuos Ser1690-Asn2019; C1, residuos Lys2020-Asn2172; C2, residuos Ser2173-Tyr2332. La secuencia A3-C1-C2 incluye los residuos Ser1690-Tyr2332. La secuencia restante, los residuos Glu1649-Arg1689, habitualmente se denominan región ácida a3. Las ubicaciones de los límites para todos los dominios, incluyendo los dominios B, para FVIII porcino, de ratón y canino también se conocen en la técnica. En una realización, el dominio B de FVIII se elimina ("factor VIII con el dominio B eliminado" o "FVIII BDD"). Un ejemplo de un FVIII BDD es REFACTO® (FVIII BDD recombinante), que tiene la misma secuencia que la parte de factor VIII de la secuencia de la tabla 5. (Cadena pesada de FVIII BDD con doble subrayado; dominio B en cursiva; y cadena ligera de FVIII BDD en texto sin formato). Una secuencia de nucleótidos codificante de la tabla 6 (SEQ ID NO: 68) se muestra en la tabla 6.

Tabla 5. Secuencia de aminoácidos de factor VIII con el dominio B eliminado (FVIII BDD)

BDD FVIII (SEQ ID NO: 67)

ATRRRYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFFENTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLL
GPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDOTSOREKEDDKVFPGSHTYVWQVLKEN
GPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDECKSWHSETKNSL
MQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHROASLEI
SPITFLTAOTLLMDLGOFLLFCHISSHOHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF
DDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKVRFMAYT
DETFKTREAIQHESGILGELLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPIL
PGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDORGNOIMSDKRNVILF
SVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDF
LSVFFSGYTFKHKMVEDTLTLFFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYY
DSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQ
SPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGL
LGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF
DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAP
CNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMA
LYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW
APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGN
STGTLMVFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQI
TASSYFTNMFATWSPSKARLHLQRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLI
SSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSVWHQIALRMEVLGCEAQDLY

ES 2 982 051 T3

Tabla 6. Secuencia de nucleótidos que codifica FVIII BDD (SEQ ID NO: 68)*

	A TGCAATAGA GCTCTCCACC TGCTTCTTTC					
661						
721	TGTGCCTTTT	GCGATTCTGC	TTTAGTGCCA	CCAGAAGATA	CTACCTGGGT	GCAGTGGAAC
781	TGTCATGGGA	CTATATGCAA	AGTGATCTCG	GTGAGCTGCC	TGTGGACGCA	AGATTTCCTC
841	CTAGAGTGCC	AAAATCTTTT	CCATTCAACA	CCTCAGTCGT	GTACAAAAAG	ACTCTGTTTG
901	TAGAATTCAC	GGATCACCTT	TTCAACATCG	CTAAGCCAAG	GCCACCCTGG	ATGGGTCTGC
961	TAGGTCCTAC	CATCCAGGCT	GAGGTTTTATG	ATACAGTGGT	CATTACACTT	AAGAACATGG
1021	CTTCCCATCC	TGTCAGTCTT	CATGCTGTTG	GTGTATCCTA	CTGGAAAGCT	TCTGAGGGAG
1081	CTGAATATGA	TGATCAGACC	AGTCAAAGGG	AGAAAGAAGA	TGATAAAGTC	TTCCCTGGTG
1141	GAAGCCATAC	ATATGTCTGG	CAGGTCCTGA	AAGAGAATGG	TCCAATGGCC	TCTGACCCAC
1201	TGTGGCCTTAC	CTACTCATAT	CTTCTCATG	TGGACCTGGT	AAAAGACTTG	AATTCAGGCC
1261	TCATTGGAGC	CCTACTAGTA	TGTAGAGAAG	GGAGTCTGGC	CAAGGAAAAG	ACACAGACCT
1321	TGCACAAATT	TATACTACTT	TTTGTCTGAT	TTGATGAAGG	GAAAAGTTGG	CACTCAGAAA
1381	CAAAGAACTC	CTTGATGCAG	GATAGGGATG	CTGCATCTGC	TCGGGCCTGG	CCTAAAATGC
1441	ACACAGTCAA	TGGTTATGTA	AACAGGTCCT	TGCCAGGTCCT	GATTGGATGC	CACAGGAAAT
1501	CAGTCTATTG	GCATGTGATT	GGAATGGGCA	CCACTCCTGA	AGTGCACCTA	ATATTCTCTG
1561	AAGGTCACAC	ATTTCTTGTG	AGGAACCATC	GCCAGGCGTC	CTTGGAAATC	TCGCCAATAA
1621	CTTTCCTTAC	TGCTCAAACA	CTCTTGATGG	ACCTTGGACA	GTTTCTACTG	TTTGTGCATA
1681	TCTCTTCCCA	CCAACATGAT	GGCATGGAAG	CTTATGTCAA	AGTAGACAGC	TGTCAGAGG
1741	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG	AAGCGGAAGA	CTATGATGAT	GATCTTACTG
1801	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC	AGGTTTGATG	ATGACAACCTC	TCCTTCCTTT	ATCCAAATTC
1861	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT	CCTAAAACCT	GGGTACATTA	CATTGCTGCT	GAAGAGGAGG
1921	ACTGGGACTA	TGCTCCCTTA	GTCTCGCCC	CCGATGACAG	AAGTTATAAA	AGTCAATATT
1981	TGAACAATGG	CCCTCAGCGG	ATTGGTAGGA	AGTACAAAAA	AGTCCGATTT	ATGGCATAACA
2041	CAGATGAAAC	CTTTAAGACT	CGTGAAGCTA	TTCAGCATGA	ATCAGGAATC	TTGGGACCTT
2101	TACTTTATGG	GGAAAGTTGA	GACACACTGT	TGATTATATT	TAAGAATCAA	GCAAGCAGAC
2161	CATATAACAT	CTACCCTCAC	GGAAATCACG	ATGTCCGTCC	TTTGTATTCA	AGGAGATTAC
2221	CAAAGGTGT	AAAACATTTG	AAGGATTTTC	CAATTCCTGCC	AGGAGAAATA	TTCAAATATA
2281	AATGGACAGT	GACTGTAGAA	GATGGGCCAA	CTAAATCAGA	TCCTCGGTGC	CTGACCCCGT
2341	ATTACTCTAG	TTTCGTAAAT	ATGGAGAGAG	ATCTAGCTTC	AGGACTCATT	GGCCCTCTCC
2401	TCATCTGCTA	CAAAGAATCT	GTAGATCAAA	GAGGAAACCA	GATAATGTCA	GACAAGAGGA
2461	ATGTCATCCT	GTTTTCTGTA	TTTGTATGAGA	ACCGAAGCTG	GTACCTCACA	GAGAATATAC
2521	AACGCTTTCT	CCCCAATCCA	GCTGGAGTGC	AGCTTGAGGA	TCCAGAGTTC	CAAGCCTCCA
2581	ACATCATGCA	CAGCATCAAT	GGCTATGTTT	TTGATAGTTT	GCAGTTGTCA	GTTTGTPTTG
2641	ATGAGGTGGC	ATACTGGTAC	ATTCTAAGCA	TTGGAGCACA	GACTGACTTC	CTTCTGTCT
2701	TCTTCTCTGG	ATATACCTTC	AAACACAAAA	TGGTCTATGA	AGACACACTC	ACCCTATTCC
2761	CATTCTCAGG	AGAAAACGTC	TTTATGTGCA	TGGAAAACCC	AGGTCATATG	ATTCTGGGGT
2821	GCCACAACCT	AGACTTTCGG	AACAGAGGCA	TGACCCGCTT	ACTGAAGGTT	TCTAGTTGTG
2881	ACAAGAACAC	TGGTGATPAT	TACGAGGACA	GTTATGAAGA	TATTTTCAGCA	TACTTGCTGA
2941	GTAAAAACAA	TGCCATTGAA	CCAAGAAGCT	TCTCTCAAAA	CCCACCAGTC	TTGAAACGCC
3001	ATCAACGGGA	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG
3061	ATACCATATC	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC
3121	AGAGCCCCCG	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC
3181	TCTGGGATTA	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA
3241	GTGTCCCTCA	GTTCAAGAAA	GTTGTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC
3301	CCTTATACCG	TGGAGAACTA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG
3361	AAGTTGAAGA	TAATATCATG	GTAACTTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCCTTCT
3421	ATTCTAGCCT	TATTTCTPAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAAACT
3481	TTGTCAAGCC	TAATGAAACC	AAAACCTACT	TTTGGAAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA
3541	CTAAAGATGA	GTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTCTC	TGATGTTGAC	CTGGAAAAAG
3601	ATGTGCACTC	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA	CACTAACACA	CTGAACCCTG
3661	CTCATGGGAG	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGTCTGTT	TTTCACCATC	TTTGTATGAGA
3721	CCAAAAGCTG	GTACTTCACT	GAATAATG	AAAGAACTG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC
3781	AGATGGGAAG	TCCCACCTTT	AAAGAAAT	ATCGCTTCCA	TGCAATCAAT	GGCTACATAA
3841	TGGATACACT	ACCTGGCTTA	GTAATGGCTC	AGGATCAAAG	GATTGATGG	TATCTGCTCA
3901	GCATGGGCAG	CAATGAAAAC	ATCCATTCTA	TTTATTTTCA	TGGACATGTG	TTCACTGTAC
3961	GAAAAAAGA	GGAGTATAAA	ATGGCACTGT	ACAATCTCTA	TCCAGGTGTT	TTTGTAGACAG

```

4021  TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GCGGGGTGGA ATGCCTTATT GGCAGCATC
4081  TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTGAG ACTCCCCTGG
4141  GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT
4201  GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTCATTATT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAAGG
4261  AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACC AAT GATTATTAC GGCATCAAGA
4321  CCCAGGGTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA
4381  GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT
4441  TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCT CCAATTATTG
4501  CTCGATACAT CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT
4561  TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTCAGCA TGCCATPGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT
4621  CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT
4681  CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC
4741  CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACCTACTC
4801  AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCTCATC TCCAGCAGTC
4861  AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA
4921  ATCAAGACTC CTTCACACCT GTGGTGAACT CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC
4981  TTCGAATTCA CCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT
5041  GCGAGGCACA GGACCTCTAC

```

*Los ácidos nucleicos subrayados codifican un péptido señal.

5 Un "FVIII con el dominio B eliminado" puede tener las eliminaciones completas o parciales divulgadas en las patentes de Estados Unidos n.º 6.316.226, 6.346.513, 7.041.635, 5.789.203, 6.060.447, 5.595.886, 6.228.620, 5.972.885, 6.048.720, 5.543.502, 5.610.278, 5.171.844, 5.112.950, 4.868.112 y 6.458.563. En algunas realizaciones, una secuencia de FVIII con el dominio B eliminado de la presente invención comprende una cualquiera de las eliminaciones divulgadas en col. 4, línea 4 a col. 5, línea 28 y los ejemplos 1-5 de la patente de Estados Unidos n.º 6.316.226 (también en el documento US 6.346.513). En otra realización, el factor VIII con el dominio B eliminado es el factor VIII con el dominio B S743/Q1638 eliminado (FVIII BDD SQ) (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 aminoácidos 1638-2332 de SEQ ID NO: 65, es decir, SEQ ID NO: 67). En algunas realizaciones, un FVIII con el dominio B eliminado de la presente invención tiene una eliminación divulgada en col. 2, líneas 26-51 y ejemplos 5-8 de la patente de Estados Unidos n.º 5.789.203 (también documentos US 6.060.447, US 5.595.886 y US 6.228.620). En algunas realizaciones, un factor VIII con el dominio B eliminado tiene una eliminación descrita en col. 1, líneas 25 a col. 2, línea 40 de la patente de Estados Unidos n.º 5.972.885; col. 6, líneas 1-22 y ejemplo 1 de la patente de Estados Unidos n.º 6.048.720; col. 2, líneas 17-46 de la patente de Estados Unidos n.º 5.543.502; col. 4, línea 22 a col. 5, línea 36 de la patente de Estados Unidos n.º 5.171.844; col. 2, líneas 55-68, figura 2 y ejemplo 1 de la patente de Estados Unidos n.º 5.112.950; col. 2, línea 2 a col. 19, línea 21 y tabla 2 de la patente de Estados Unidos n.º 4.868.112; col. 2, línea 1 a col. 3, línea 19, col. 3, línea 40 a col. 4, línea 67, col. 7, línea 43 a col. 8, línea 26 y col. 11, línea 5 a col. 13, línea 39 de la patente de Estados Unidos n.º 7.041.635; o col. 4, líneas 25-53 de la patente de Estados Unidos n.º 6.458.563. En algunas realizaciones, un FVIII 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 el documento WO 91/09122. En algunas realizaciones, un FVIII 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 de FVIII. Meulien P., *et al.* Protein Eng. 2(4): 301-6 (1988). Eliminaciones adicionales del dominio B que forman parte de la invención 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 (Kaufinan (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)). En otras realizaciones, el FVIII BDD incluye un polipéptido de FVIII que contiene fragmentos del dominio B que retienen uno o más sitios de glucosilación ligada a N, por ejemplo, los residuos 757, 784, 828, 900, 963, u opcionalmente 943, que corresponden a la secuencia de aminoácidos de la secuencia de FVIII de longitud completa. Ejemplos de los fragmentos del dominio B incluyen 226 aminoácidos o 163 aminoácidos del dominio B como se divulga en Miao, H.Z., *et al.*, Blood 103(a): 3412-3419 (2004), Kasuda, A, *et al.*, J. Thromb. Haemost. 6: 1352-1359 (2008) y Pipe, S.W., *et al.*, J. Thromb. Haemost. 9: 2235-2242 (2011) (es decir, los primeros 226 aminoácidos o 163 aminoácidos del dominio B se retienen). En otras realizaciones más, el FVIII BDD comprende además una mutación puntual en el residuo 309 (de Phe a Ser) para mejorar la expresión de la proteína FVIII BDD. Véase, Miao, H.Z., *et al.*, Blood 103(a): 3412-3419 (2004). En otras realizaciones más, el FVIII BDD incluye un polipéptido de FVIII que contiene una parte del dominio B, pero que no contiene uno o más sitios de escisión por furina (por ejemplo, Arg1313 y Arg 1648). Véase, Pipe, S.W., *et al.*, J. Thromb. Haemost. 9: 2235-2242 (2011). Cada una de las eliminaciones anteriores puede hacerse en cualquier secuencia de FVIII.

En algunas realizaciones, el FVIII tiene un dominio B parcial. En algunas realizaciones, la proteína FVIII con un dominio B parcial es FVIII198. FVIII198 es un dominio B parcial que contiene la molécula FVIII Fc monocatenaria-226N6. El

número 226 representa el aminoácido 226 del extremo N del dominio B de FVIII, y N6 representa seis sitios de N-glucosilación en el dominio B.

5 En una realización, el FVIII se escinde justo después de la arginina en el aminoácido 1648 (en factor VIII de longitud completa o SEQ ID NO: 65), aminoácido 754 (en el factor VIII con el dominio B S743/Q1638 eliminado o SEQ ID NO: 67), o el residuo de arginina correspondiente (en otras variantes), produciendo de ese modo una cadena pesada y una cadena ligera. En otra realización, el FVIII comprende una cadena pesada y una cadena ligera, que se ligan o asocian mediante un enlace no covalente mediado por ion metálico.

10 En otras realizaciones, el FVIII es un FVIII monocatenario que no se ha escindido justo después de la arginina en el aminoácido 1648 (en FVIII de longitud completa o SEQ ID NO: 65), aminoácido 754 (en el FVIII con el dominio B S743/Q1638 eliminado o SEQ ID NO: 67), o el residuo de arginina correspondiente (en otras variantes). Un FVIII monocatenario puede comprender una o más sustituciones aminoacídicas. En una realización, la sustitución aminoacídica está en un residuo correspondiente al residuo 1648, el residuo 1645 o ambos del polipéptido de factor VIII maduro de longitud completa (SEQ ID NO: 65) o el residuo 754, el residuo 751 o ambos de factor VIII BDD SQ (SEQ ID NO: 67). La sustitución aminoacídica puede ser cualquier aminoácido distinto de arginina, por ejemplo, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, selenocisteína, serina, tirosina, histidina, ornitina, pirrolisina o taurina.

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

25 La proteína que tiene el polipéptido de FVIII ligado a o asociado con el fragmento de VWF puede comprender una secuencia al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 65 o 67, en la que la secuencia tiene la actividad coagulante de FVIII, por ejemplo, activación del factor IX como cofactor para convertir el factor X en factor X activado (FXa).

30 Las proteínas o polipéptidos "híbridos" o "quiméricos", como se usan en este documento, incluyen una combinación de una primera cadena polipeptídica, por ejemplo, la proteína VWF fusionada a una secuencia de XTEN que tiene menos de 288 aminoácidos y una primera región constante de Ig o una parte de la misma, con una segunda cadena polipeptídica, por ejemplo, una proteína FVIII fusionada a una segunda región constante de Ig o una parte de la misma, formando de ese modo un heterodímero. En una realización, el primer polipéptido y el segundo polipéptido en un híbrido se asocian entre sí mediante interacciones de proteína-proteína, tales como interacciones de carga-carga o hidrófobas. De acuerdo con la presente invención, un primer polipéptido comprende una proteína de fusión de FVIII(X)-Fc y un segundo polipéptido comprende una proteína de fusión de proteína FVIII-XTEN-Fc, haciendo que el híbrido sea un heterodímero, en el que el XTEN contiene menos de 288 aminoácidos. El primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden asociarse a través de un enlace covalente, por ejemplo, un enlace disulfuro, entre la primera región Fc y la segunda región Fc. El primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden asociarse además entre sí mediante unión entre el fragmento de VWF y la proteína FVIII.

35 De acuerdo con la presente invención, la proteína FVIII comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos 1 a 745 de SEQ ID NO: 65 fusionada a una primera secuencia de XTEN insertada inmediatamente posterior al aminoácido 745 de SEQ ID NO: 65. Una proteína FVIII útil en la presente invención puede incluir FVIII que tiene una o más secuencias de XTEN adicionales, que no afectan a la actividad de coagulación de FVIII. Dichas secuencias de XTEN pueden fusionarse al extremo C o extremo N de la proteína FVIII o insertarse entre uno o más de los dos residuos aminoacídicos en la proteína FVIII mientras las inserciones no afecten a la actividad de coagulación de FVIII o la función de FVIII. En una realización, las inserciones mejoran las propiedades farmacocinéticas de la proteína FVIII (por ejemplo, semivida). En otra realización, las inserciones pueden ser múltiples inserciones, por ejemplo, más de 40 dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez inserciones. Ejemplos de los sitios de inserción incluyen, aunque sin limitación, los sitios enumerados en las tablas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o cualquier combinación de los mismos.

45 La proteína FVIII ligada a una o más secuencias de XTEN puede representarse como FVIII(X) o FVIII_(a→b)-X-FVIII_(c→d), en la que FVIII_(a→b) comprende, consiste esencialmente en o consiste en una primera parte de una proteína FVIII del residuo aminoacídico "a" al residuo aminoacídico "b"; X comprende, consiste esencialmente en o consiste en una o más secuencias de XTEN, FVIII_(c→d) comprende, consiste esencialmente en o consiste en una segunda parte de una proteína FVIII del residuo aminoacídico "c" al residuo aminoacídico "d";

50 a es el residuo aminoacídico N terminal de la primera parte de la proteína FVIII,

55 b es el residuo aminoacídico C terminal de la primera parte de la proteína FVIII, pero también es el residuo

aminoacídico N terminal de los dos aminoácidos de un sitio de inserción en que se inserta la secuencia de XTEN,

c es el residuo aminoacídico N terminal de la segunda parte de la proteína FVIII, pero también es el residuo aminoacídico C terminal de los dos aminoácidos de un sitio de inserción en que se inserta la secuencia de XTEN, y

d es el residuo aminoacídico C terminal de la proteína FVIII, y

en la que la primera parte de la proteína FVIII y la segunda parte de la proteína FVIII no son idénticas entre sí y son de suficiente longitud juntas, de modo que la proteína FVIII tenga una actividad de coagulación de FVIII.

De acuerdo con la presente invención, la primera parte de la proteína FVIII y la segunda parte de la proteína FVIII son fragmentos de SEQ ID NO: 65 [secuencia de FVIII madura de longitud completa], por ejemplo, parte N terminal y parte C terminal, respectivamente. La primera parte de la proteína FVIII comprende el dominio A1 y el dominio A2 y una parte del dominio B de la proteína FVIII. La segunda parte de la proteína FVIII comprende el dominio A3, el dominio C1 y el dominio C2. En algunas realizaciones, los dos aminoácidos ("b" y "c") pueden ser uno cualquiera o más de los residuos aminoacídicos de los sitios de inserción mostrados en las tablas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15. Por ejemplo, "b" puede ser el residuo aminoacídico inmediatamente anterior del sitio en que se inserta o se liga una o más secuencias de XTEN, y "c" puede ser el residuo aminoacídico inmediatamente posterior del sitio en que se inserta o se liga la una o más secuencias de XTEN. En algunas realizaciones, "a" es la primera secuencia de aminoácidos madura de una proteína FVIII, y "d" es la última secuencia de aminoácidos de una proteína FVIII. De acuerdo con la presente invención, FVIII_(a→b) tiene la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1 a 745 de SEQ ID NO: 65 [FVIII de longitud completa] y FVIII_(c→d) puede ser, por ejemplo, los aminoácidos 746 a 1438 de SEQ ID NO: 67 o los aminoácidos 1641 a 2332 de SEQ ID NO: 65, respectivamente.

De acuerdo con la presente invención, una primera secuencia de XTEN se inserta inmediatamente posterior al aminoácido 745 de SEQ ID NO: 65. En algunos aspectos, un sitio de inserción adicional en la proteína FVIII está ubicado en uno o más dominios de la proteína FVIII, que es el extremo N, el dominio A1, el dominio A2, el dominio A3, el dominio B, el dominio C1, el dominio C2, el extremo C, o dos o más combinaciones de los mismos o entre dos dominios de la proteína FVIII, que son el dominio A1 y la región ácida a1, y la región ácida a1 y el dominio A2, el dominio A2 y la región ácida a2, la región ácida a2 y el dominio B, el dominio B y el dominio A3, y el dominio A3 y el dominio C1, el dominio C1 y el dominio C2, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, los sitios de inserción en que puede insertarse la secuencia de XTEN se seleccionan del grupo que consiste en el extremo N y el dominio A1, el extremo N y el dominio A2, el extremo N y el dominio A3, el extremo N y el dominio B, el extremo N y el dominio C1, el extremo N y el dominio C2, el extremo N y el extremo C, los dominios A1 y A2, los dominios A1 y A3, los dominios A1 y B, los dominios A1 y C1, los dominios A1 y C2, el dominio A1 y el extremo C, los dominios A2 y A3, los dominios A2 y B, los dominios A2 y C1, los dominios A2 y C2, el dominio A2 y el extremo C, los dominios A3 y B, los dominios A3 y C1, los dominios A3 y C2, el dominio A3 y el extremo C, los dominios B y C1, los dominios B y C2, el dominio B y el extremo C, los dominios C1 y C2, el dominio C1 y el extremo C, el dominio C2 y el extremo C, y dos o más combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitantes de sitios de inserción se enumeran en las tablas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

La proteína FVIII, en que se inserta la secuencia de XTEN inmediatamente posterior de uno o más aminoácidos (por ejemplo, uno o más sitios de inserción de XTEN) en la proteína FVIII o se liga en el extremo C o el extremo N, retiene la actividad de FVIII después de la unión a o inserción por la secuencia de XTEN. La secuencia de XTEN puede insertarse en la proteína FVIII una vez o más de una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o seis veces, de modo que las inserciones no afecten a la actividad de FVIII (es decir, la proteína FVIII aún retiene la propiedad de coagulación).

La proteína FVIII útil en la presente invención puede ligarse a uno o más polipéptidos XTEN en el extremo N o el extremo C de la proteína FVIII mediante un conector opcional o insertarse inmediatamente posterior a uno o más aminoácidos (por ejemplo, uno o más sitios de inserción de XTEN) en la proteína FVIII mediante uno o más conectores opcionales. En una realización, los dos residuos aminoacídicos en que se inserta la secuencia de XTEN o el residuo aminoacídico al que se liga la secuencia de XTEN corresponden a los dos residuos aminoacídicos o un residuo aminoacídico de SEQ ID NO: 65 [FVIII maduro de longitud completa] seleccionados del grupo que consiste en los residuos de la tabla 7, tabla 8, tabla 9 y tabla 10 y cualquier combinación de los mismos.

De acuerdo con la presente invención, se inserta al menos una secuencia de XTEN inmediatamente posterior al aminoácido 745 de SEQ ID NO: 65. En un aspecto, se inserta al menos una secuencia de XTEN adicional en uno o más sitios de inserción de XTEN divulgados en uno o más aminoácidos divulgados en la tabla 7.

Tabla 7: Sitios de inserción de XTEN ejemplares

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

ES 2 982 051 T3

n.º	Punto de inserción de XTEN*	Residuo de inserción	Secuencia posterior de FVIII BDD	Dominio de FVIII
4	18	Q	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	Q	REK	A1
21	128	V	FPG	A1
22	129	F	PGG	A1
23	130	P	GGG	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
37	244	G	LIG	A1
38	250	R	KSV	A1
39	318	D	GME	A1
40	333	P	QLR	A1
42	334	Q	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

ES 2 982 051 T3

n.º	Punto de inserción de XTEN*	Residuo de inserción	Secuencia posterior de FVIII BDD	Dominio de FVIII
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	Q	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
83	1640	P	PVL	B
84	1652	R	TTL	B
85	1656	Q	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	BED	A3
98	1793	E	EDQ	A3
99	1796	Q	RQG	A3
100	1798	Q	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

ES 2 982 051 T3

n.º	Punto de inserción de XTEN*	Residuo de inserción	Secuencia posterior de FVIII BDD	Dominio de FVIII
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 o C terminal del aminoácido indicado.

En algunas realizaciones, se inserta una o más secuencias de XTEN adicionales en aproximadamente seis aminoácidos por encima o por debajo de los aminoácidos 32, 220, 224, 336, 339, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 o 1910, correspondientes a SEQ ID NO: 65 o cualquier combinación de los mismos.

5

Tabla 8. Intervalos de inserción de XTEN ejemplares

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	Q	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 señalado (residuo "0") donde puede hacerse una inserción. La denominación "-x" se refiere a un sitio de inserción que está x aminoácidos alejado en el lado N terminal del residuo de inserción señalado. Asimismo, la denominación "+x" se refiere a un sitio de inserción que está x aminoácidos alejado en el lado C terminal del residuo de inserción señalado.
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.

10 En otras realizaciones, se inserta una o más secuencias de XTEN adicionales inmediatamente posteriores de uno o más aminoácidos correspondientes al FVIII humano maduro de longitud completa seleccionados del grupo que consiste en uno o más sitios de inserción de la tabla 9.

Tabla 9. Sitios o intervalos de inserción de XTEN ejemplares

n.º	Intervalo de punto de inserción de XTEN*	Primer residuo de inserción	Dominio de FVIII
3	18-32	Q	A1
8	40	F	A1
18	211-224	E	A1
27	336-403	R	A1, A2
43	599	A	A2

ES 2 982 051 T3

n.º	Intervalo de punto de inserción de XTEN*	Primer residuo de inserción	Dominio de FVIII
50	1656-1728	Q	B, a3, 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

En algunas realizaciones, se inserta uno o más XTEN adicionales en uno o más aminoácidos inmediatamente posteriores de un aminoácido de un sitio de inserción seleccionado del grupo que consiste en los residuos aminoacídicos de la tabla 10.

5

Tabla 10: Sitio de inserción de XTEN en FVIII y denominaciones de construcción

Número de construcción	Dominio	N.º de residuo anterior*	N.º de residuo posterior*	Secuencia anterior	Secuencia posterior
F8X-1	A1	3	4	ATR	RYY
F8X-2	A1	18	19	YMQ	SDL
F8X-3	A1	22	23	DLG	ELP
F8X-4	A1	26	27	LPV	DAR
F8X-5	A1	40	41	FPF	NTS
F8X-6	A1	60	61	LFN	IAK
F8X-7	A1	116	117	YDD	QTS
F8X-8	A1	130	131	VFP	GGG
F8X-9	A1	188	189	KEK	TQT
F8X-10	A1	216	217	NSL	MQD
F8X-11	A1	230	231	WPK	MHT
F8X-12	A1	333	334	EEP	QLR
F8X-13	A2	375	376	SVA	KKH
F8X-14	A2	403	404	APD	DRS
F8X-15	A2	442	443	EAI	QHE
F8X-16	A2	490	491	RRL	PKG
F8X-17	A2	518	519	TVE	DGP
F8X-18	A2	599	600	NPA	GVQ
F8X-19	A2	713	714	CDK	NTG
F8X-20	BD	745	746	SQN	PPV
F8X-21	BD	745	746	SQN	PPV
F8X-22	BD**	745	746	SQN	PPV
F8X-23	A3	1720	1721	APT	KDE
F8X-24	A3	1796	1797	EDQ	RQG
F8X-25	A3	1802	1803	AEP	RKN
F8X-26	A3	1827	1828	PTK	DEF
F8X-27	A3	1861	1862	HTN	TLN
F8X-28	A3	1896	1897	NME	RNC
F8X-29	A3	1900	1901	NCR	APC
F8X-30	A3	1904	1905	PCN	IQM
F8X-31	A3	1937	1938	AQD	QRI
F8X-32	C1	2019	2020	YSN	KCQ
F8X-33	C1	2068	2069	EPF	SWI
F8X-34	C1	2111	2112	GKK	WQT
F8X-35	C1	2120	2121	NST	GTL
F8X-36	C2	2171	2172	CDL	NSC
F8X-37	C2	2188	2189	SDA	QIT
F8X-38	C2	2227	2228	NPK	EWL
F8X-39	C2	2277	2278	FQN	GKV
F8X-40	CT	2332	NA	DLY	NA
F8X-41	CT	2332	NA	DLY	NA
F8X-42	A1	3	4	ATR	ATR
pSD0001	A2	403	404		
pSD0002	A2	599	600		
pSD0021	ext. N	0	1		

Número de construcción	Dominio	N.º de residuo anterior*	N.º de residuo posterior*	Secuencia anterior	Secuencia posterior
pSD0022	A1	32	33		
pSD0023	A1	65	66		
pSD0024	A1	81	82		
pSD0025	A1	119	120		
pSD0026	A1	211	212		
pSD0027	A1	220	221		
pSD0028	A1	224	225		
pSD0029	A1	336	337		
pSD0030	A1	339	340		
pSD0031	A2	378	379		
pSD0032	A2	399	400		
pSD0033	A2	409	410		
pSD0034	A2	416	417		
pSD0035	A2	487	488		
pSD0036	A2	494	495		
pSD0037	A2	500	501		
pSD0038	A2	603	604		
pSD0039	A3	1656	1657		
pSD0040	A3	1711	1712		
pSD0041	A3	1725	1726		
pSD0042	A3	1749	1750		
pSD0043	A3	1905	1906		
pSD0044	A3	1910	1911		
pDS0062	A3	1900	1901		

* Indica el número de aminoácido de la proteína FVIII madura

5 En una realización, el uno o más sitios de inserción de XTEN adicionales están ubicados dentro de una o más estructuras de bucle flexibles, expuestas en la superficie de la proteína FVIII (por ejemplo, un bucle permisivo). Por ejemplo, puede insertarse al menos una secuencia de XTEN en cada dominio "A" de FVIII que comprende al menos dos "bucles permisivos" en que puede insertarse al menos un polipéptido XTEN sin eliminar la actividad procoagulante de la proteína recombinante, o la capacidad de las proteínas recombinantes de expresarse *in vivo* o *in vitro* en una célula hospedadora. Los bucles permisivos son regiones que permiten la inserción de al menos una secuencia de XTEN con, entre otros atributos, alta exposición en superficie o a disolvente y alta flexibilidad conformacional. El dominio A1 comprende una región de bucle permisivo-1 (A1-1) y una región de bucle permisivo-2 (A1-2), el dominio 10 A2 comprende una región de bucle permisivo-1 (A2-1) y una región de bucle permisivo-2 (A2-2), el dominio A3 comprende una región de bucle permisivo-1 (A3-1) y una región de bucle permisivo-2 (A3-2).

15 En un aspecto, un primer bucle permisivo en el dominio A1 de FVIII (A1-1) está ubicado entre la hebra beta 1 y la hebra beta 2, y un segundo bucle permisivo en el dominio A2 de FVIII (A1-2) está ubicado entre la hebra beta 11 y la hebra beta 12. Un primer bucle permisivo en el dominio A2 de FVIII (A2-1) está ubicado entre la hebra beta 22 y la hebra beta 23, y un segundo bucle permisivo en el dominio A2 de FVIII (A2-2) está ubicado entre la hebra beta 32 y la hebra beta 33. Un primer bucle permisivo en el dominio A3 de FVIII (A3-1) está ubicado entre la hebra beta 38 y la hebra beta 39, y un segundo bucle permisivo en el dominio A3 de FVIII (A3-2) está ubicado entre la hebra beta 45 y la hebra beta 46. En determinados aspectos, la estructura de bucle flexible expuesto en la superficie que comprende 20 A1-1 corresponde a una región en el FVIII humano maduro natural de aproximadamente el aminoácido 15 a aproximadamente el aminoácido 45 de SEQ ID NO: 65, por ejemplo, de aproximadamente el aminoácido 18 a aproximadamente el aminoácido 41 de SEQ ID NO: 65. En otros aspectos, la estructura de bucle flexible expuesto en la superficie que comprende A1-2 corresponde a una región en el FVIII humano maduro natural de aproximadamente el aminoácido 201 a aproximadamente el aminoácido 232 de SEQ ID NO: 65, por ejemplo, de aproximadamente el aminoácido 218 a aproximadamente el aminoácido 229 de SEQ ID NO: 65. En otros aspectos más, la estructura de bucle flexible expuesto en la superficie que comprende A2-1 corresponde a una región en el FVIII humano maduro natural de aproximadamente el aminoácido 395 a aproximadamente el aminoácido 421 de SEQ ID NO: 65, por ejemplo, de aproximadamente el aminoácido 397 a aproximadamente el aminoácido 418 de SEQ ID NO: 65. En otras realizaciones más, la estructura de bucle flexible expuesto en la superficie que comprende A2-2 corresponde a una 30 región en el FVIII humano maduro natural de aproximadamente el aminoácido 577 a aproximadamente el aminoácido 635 de SEQ ID NO: 65, por ejemplo, de aproximadamente el aminoácido 595 a aproximadamente el aminoácido 607 de SEQ ID NO: 65. En determinados aspectos, la estructura de bucle flexible expuesto en la superficie que comprende A3-1 corresponde a una región en el FVIII humano maduro natural de aproximadamente el aminoácido 1705 a aproximadamente el aminoácido 1732 de SEQ ID NO: 65, por ejemplo, de aproximadamente el aminoácido 1711 a aproximadamente el aminoácido 1725 de SEQ ID NO: 65. En otros aspectos más, la estructura de bucle flexible expuesto en la superficie que comprende A3-2 corresponde a una región en el FVIII humano maduro natural de 35

aproximadamente el aminoácido 1884 a aproximadamente el aminoácido 1917 de SEQ ID NO: 65, por ejemplo, de aproximadamente el aminoácido 1899 a aproximadamente el aminoácido 1911 de SEQ ID NO: 65.

5 En otra realización, el uno o más aminoácidos en que se inserta al menos una secuencia de XTEN adicional están ubicados dentro del dominio a3, por ejemplo, los aminoácidos 1649 a 1689, correspondientes al polipéptido de FVIII maduro de longitud completa. En una realización particular, se inserta una secuencia de XTEN adicional entre los aminoácidos 1656 y 1657 de SEQ ID NO: 65 (FVIII maduro de longitud completa).

10 En algunas realizaciones, el uno o más sitios de inserción adicionales para una o más inserciones de XTEN adicionales están inmediatamente posteriores a uno o más aminoácidos correspondientes a FVIII de longitud completa maduro, seleccionados del grupo que consiste en:

- | | | |
|---|-------------------------|-----------------------|
| (1) aminoácido 3, | (2) aminoácido 18, | (3) aminoácido 22, |
| (4) aminoácido 26, | (5) aminoácido 32, | (6) aminoácido 40, |
| (7) aminoácido 60, | (8) aminoácido 65, | (9) aminoácido 81, |
| (10) aminoácido 116, | (11) aminoácido 119, | (12) aminoácido 130, |
| (13) aminoácido 188, | (14) aminoácido 211, | (15) aminoácido 216, |
| (16) aminoácido 220, | (17) aminoácido 224, | (18) aminoácido 230, |
| (19) aminoácido 333, | (20) aminoácido 336, | (21) aminoácido 339, |
| (22) aminoácido 375, | (23) aminoácido 399, | (24) aminoácido 403, |
| (25) aminoácido 409, | (26) aminoácido 416, | (26) aminoácido 442, |
| (28) aminoácido 487, | (29) aminoácido 490, | (30) aminoácido 494, |
| (31) aminoácido 500, | (32) aminoácido 518, | (33) aminoácido 599, |
| (34) aminoácido 603, | (35) aminoácido 713, | (36) aminoácido 745, |
| (37) aminoácido 1656, | (38) aminoácido 1711, | (39) aminoácido 1720, |
| (40) aminoácido 1725, | (41) aminoácido 1749, | (42) aminoácido 1796, |
| (43) aminoácido 1802, | (44) aminoácido 1827, | (45) aminoácido 1861, |
| (46) aminoácido 1896, | (47) aminoácido 1900, | (48) aminoácido 1904, |
| (49) aminoácido 1905, | (50) aminoácido 1910, | (51) aminoácido 1937, |
| (52) aminoácido 2019, | (53) aminoácido 2068, | (54) aminoácido 2111, |
| (55) aminoácido 2120, | (56) aminoácido 2171, | (57) aminoácido 2188, |
| (58) aminoácido 2227, | (59) aminoácido 2277, y | |
| (60) dos o más combinaciones de los mismos. | | |

15 En una realización, una proteína FVIII útil para la invención comprende dos secuencias de XTEN, una primera secuencia de XTEN insertada en un primer sitio de inserción de XTEN (inmediatamente posterior del aminoácido 745 de SEQ ID NO: 65) y un segundo XTEN insertado en un segundo sitio de inserción de XTEN. Un ejemplo del primer sitio de inserción de XTEN y el segundo sitio de inserción de XTEN se enumeran en la tabla 11.

Tabla 11. Sitios de inserción ejemplares para dos XTEN

20

Inserción 1		Inserción 2	
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio
745	B	2332	CT

25 Los dos XTEN insertados o ligados a la proteína FVIII pueden ser idénticos o diferentes. En algunas realizaciones, una proteína FVIII útil para la invención comprende dos secuencias de XTEN insertadas en la proteína FVIII, una primera secuencia de XTEN insertada inmediatamente posterior del aminoácido 745 correspondiente a SEQ ID NO: 65, y una segunda secuencia de XTEN insertada inmediatamente posterior del aminoácido 2332 correspondiente a SEQ ID NO: 65 (el extremo C).

30 En determinadas realizaciones, una proteína FVIII comprende tres secuencias de XTEN, una primera secuencia de XTEN insertada en un primer sitio de inserción de XTEN, una segunda secuencia de XTEN insertada en una segunda secuencia de XTEN, y una tercera secuencia de XTEN insertada en un tercer sitio de inserción de XTEN. La primera, segunda o tercera secuencia de XTEN pueden ser idénticas o diferentes. En algunas realizaciones, la proteína FVIII que comprende tres secuencias de XTEN puede comprender además una mutación o sustitución, por ejemplo, en el aminoácido 1648 correspondiente a SEQ ID NO: 65, por ejemplo, R1648A. Por ejemplo, ejemplos no limitantes del primer, segundo y tercer sitio de inserción de XTEN se enumeran en la tabla 12.

35

Tabla 12. Sitios de inserción ejemplares para tres XTEN

Inserción 1		Inserción 2		Inserción 3	
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio
745	B	1900		2332	
18	A1	745	B	2332	CT

Inserción 1		Inserción 2		Inserción 3	
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio
26	A1	745	B	2332	CT
40	A1	745	B	2332	CT
18	A1	745	B	2332	CT
40	A1	745	B	2332	CT
403	A2	745	B	2332	CT
399	A2	745	B	2332	CT
1725	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	745	B	2332	CT
1711	A3	745	B	2332	CT
1900	A3	745	B	2332	CT
1905	A3	745	B	2332	CT
1910	A3	745	B	2332	CT

En otras realizaciones, una proteína FVIII en la invención comprende cuatro secuencias de XTEN, una primera secuencia de XTEN insertada en un primer sitio de inserción, una segunda secuencia de XTEN insertada en un segundo sitio de inserción, una tercera secuencia de XTEN insertada en un tercer sitio de inserción y una cuarta secuencia de XTEN insertada en un cuarto sitio de inserción. La primera, segunda, tercera y cuarta secuencia de XTEN pueden ser idénticas, diferentes o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la proteína FVIII que comprende cuatro secuencias de XTEN puede comprender además una mutación o sustitución, por *ejemplo*, en el aminoácido 1648 correspondiente a SEQ ID NO: 65, por ejemplo, R1648A. Ejemplos no limitantes del primer, segundo, tercer y cuarto sitio de inserción de XTEN se enumeran en la tabla 13.

Tabla 13. Sitios de inserción ejemplares para cuatro 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
0040	A1	0403	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0403	A2	745	B	2332	CT
0018	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0018	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1720	A3	745	B	2332	CT

Inserción 1		Inserción 2		Inserción 3		Inserción 4	
Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio	Sitio de inserción	Dominio
0403	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1900	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1905	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1910	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1910	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	0403	A2	0745	B	2332	CT
0018	A1	0745	B	1720	A3	2332	CT
0018	A1	0745	B	1900	A3	2332	CT
0403	A2	0745	B	1720	A3	2332	CT
0403	A2	0745	B	1900	A3	2332	CT
0745	B	1720	A3	1900	A3	2332	CT
0188	A1	1900	A3	0745	B	2332	CT
0599		1900	A3	0745	B	2332	CT
2068		1900	A3	0745	B	2332	CT
2171		1900	A3	0745	B	2332	CT
2227		1900	A3	0745	B	2332	CT
2277		1900	A3	0745	B	2332	CT

En algunas realizaciones, una proteína FVIII comprende cinco secuencias de XTEN, una primera secuencia de XTEN insertada en un primer sitio de inserción, una segunda secuencia de XTEN insertada en un segundo sitio de inserción, una tercera secuencia de XTEN insertada en un tercer sitio de inserción de XTEN, una cuarta secuencia de XTEN insertada en un cuarto sitio de inserción de XTEN y una quinta secuencia de XTEN insertada en un quinto sitio de inserción de XTEN. La primera, segunda, tercera, cuarta o quinta secuencia de XTEN pueden ser idénticas, diferentes o combinaciones de las mismas. Ejemplos no limitantes del primer, segundo, tercer, cuarto y quinto sitio de inserción se enumeran en la tabla 14.

5

10

Tabla 14. Sitios de inserción ejemplares para cinco XTEN

Inserción de XTEN 1	Inserción de XTEN 2	Inserción de XTEN 3	Inserción de XTEN 4	Inserción de XTEN 5
0018	0403	0745	1720	2332
0018	0403	0745	1900	2332
0018	0745	1720	1900	2332
0403	0745	1720	1900	2332

En determinadas realizaciones, una proteína FVIII comprende seis secuencias de XTEN, una primera secuencia de XTEN insertada en un primer sitio de inserción de XTEN, una segunda secuencia de XTEN insertada en un segundo sitio de inserción de XTEN, una tercera secuencia de XTEN insertada en un tercer sitio de inserción de XTEN, una cuarta secuencia de XTEN insertada en un cuarto sitio de inserción de XTEN, una quinta secuencia de XTEN insertada en un quinto sitio de inserción de XTEN y una sexta secuencia de XTEN insertada en un sexto sitio de inserción de XTEN. La primera, segunda, tercera, cuarta, quinta o sexta secuencia de XTEN pueden ser idénticas, diferentes o combinaciones de las mismas. Ejemplos de los seis sitios de inserción de XTEN incluyen, aunque sin limitación, los sitios de inserción enumerados en la tabla 15.

15

20

Tabla 15. Sitios de inserción de XTEN ejemplares para seis XTEN

Inserción de XTEN 1	Inserción de XTEN 2	Inserción de XTEN 3	Inserción de XTEN 4	Inserción de XTEN 5	Inserción de XTEN 6
0018	0403	0745	1720	1900	2332

5 De acuerdo con la presente invención se inserta una secuencia de XTEN entre los aminoácidos 745 y 746 de un factor VIII de longitud completa de SEQ ID NO: 65.

En algunas realizaciones, una proteína quimérica de la presente invención comprende dos secuencias polipeptídicas, comprendiendo una primera secuencia polipeptídica una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 80 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a una secuencia seleccionada de FVIII-161 (SEQ ID NO: 69), FVIII-169 (SEQ ID NO: 70), FVIII-170 (SEQ ID NO: 71), FVIII-173 (SEQ ID NO: 72); FVIII-195 (SEQ ID NO: 73); FVIII-196 (SEQ ID NO: 74), FVIII-199 (SEQ ID NO: 75), FVIII-201 (SEQ ID NO: 76); FVIII-203 (SEQ ID NO: 77), FVIII-204 (SEQ ID NO: 78), FVIII-205 (SEQ ID NO: 79), FVIII-266 (SEQ ID NO: 80), FVIII-267 (SEQ ID NO: 81), FVIII-268 (SEQ ID NO: 82), FVIII-269 (SEQ ID NO: 83), FVIII-271 (SEQ ID NO: 84) o FVIII-272 (SEQ ID NO: 85) y una segunda secuencia polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 80 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a una secuencia seleccionada de VWF031 (SEQ ID NO: 86), VWF034 (SEQ ID NO: 87) o VWF-036.

II.D. Región constante de Ig o una parte de la misma

20 La proteína quimérica de la invención también incluye dos regiones Fc, una primera región Fc fusionada a una proteína FVIII mediante un conector opcional y una segunda región Fc fusionada a una proteína VWF a través de la secuencia de XTEN que tiene menos de 288 aminoácidos. La región Fc puede mejorar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas de la proteína quimérica en combinación con la secuencia de XTEN y la proteína VWF. En determinadas realizaciones, la región Fc prolonga la semivida de una molécula fusionada a la región Fc.

25 Una región constante de Ig está compuesta de dominios indicados dominios CH (constantes de cadena pesada - *constant heavy*) (CH1, CH2, etc.). Dependiendo del isotipo, (es decir, IgG, IgM, IgA, IgD o IgE), la región constante puede estar compuesta de tres o cuatro dominios CH. Algunos isotipos (por ejemplo, IgG) de regiones constantes también contienen una región de bisagra. Véase, Janeway *et al.* 2001, Immunobiology, Garland Publishing, N.Y., N.Y.

30 Una región constante de Ig o una parte de la misma puede obtenerse de varias fuentes diferentes. En algunas realizaciones, una región constante de Ig o una parte de la misma se obtiene de una Ig humana. Se entiende, sin embargo, que la región constante de Ig o una parte de la misma puede obtenerse de una Ig de otra especie de mamífero, incluyendo, por ejemplo, una especie de roedor (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, cobaya) o de primate no humano (por ejemplo, chimpancé, macaco). Además, la región constante de Ig o una parte de la misma puede obtenerse de cualquier clase de Ig, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo de Ig, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización, se usa el isotipo humano IgG1.

40 Está disponible una diversidad de las secuencias génicas de la región constante de Ig (por ejemplo, secuencias génicas de la región constante humana) en forma de depósitos accesibles al público. Puede seleccionarse la secuencia de los dominios de la región constante que tenga una función efectora particular (o que carezca de una función efectora particular) o con una modificación particular para reducir la inmunogenia. Muchas secuencias de anticuerpos y genes que codifican anticuerpos se han publicado y las secuencias de la región constante de Ig adecuadas (por ejemplo, secuencias de bisagra, CH2 y/o CH3, o partes de las mismas) pueden obtenerse de estas secuencias usando técnicas reconocidas en la técnica. El material genético obtenido usando cualquiera de los métodos anteriores después puede alterarse o sintetizarse para obtener polipéptidos de la presente invención. Se apreciará además que el alcance de esta invención abarca alelos, variantes y mutaciones de secuencias de ADN de la región constante.

50 Las secuencias de la región constante de Ig o una parte de la misma pueden clonarse, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa y cebadores que se seleccionan para amplificar el dominio de interés. Para clonar una secuencia de la región constante de Ig o una parte de la misma a partir de un anticuerpo, puede aislarse el ARNm de hibridoma, bazo o linfocitos, retrotranscribirse en ADN, y amplificarse los genes de anticuerpo por PCR. Se describen en detalle métodos de amplificación por PCR en las patentes de Estados Unidos n.º 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; 4.965.188; y en, por ejemplo, "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Innis *et al.* eds., Academic Press, San Diego, CA (1990); Ho *et al.* 1989. Gene 77:51; Horton *et al.* 1993. Methods Enzymol. 217:270). La PCR puede iniciarse mediante cebadores de la región constante consenso o mediante cebadores más específicos basados en las secuencias publicadas de ADN y aminoácidos de la cadena pesada y ligera. Como se analiza anteriormente, también puede usarse PCR para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpo. En este caso, las colecciones pueden cribarse mediante cebadores consenso o sondas homólogas más grandes, tales como sondas de la región constante de ratón. Se conocen en la técnica numerosos conjuntos de cebadores adecuados para amplificación de genes de anticuerpo (por ejemplo, cebadores 5' basados en la secuencia N terminal de anticuerpos purificados (Benhar y Pastan. 1994. Protein Engineering 7:1509); amplificación rápida de extremos de ADNc (Ruberti,

F. *et al.* 1994. *J. Immunol. Methods* 173:33); secuencias líder de anticuerpo (Larrick *et al.* 1989 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:1250). La clonación de secuencias de anticuerpo se describe además en Newman *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.658.570, presentada el 25 de enero de 1995.

5 Una región constante de Ig puede incluir todos los dominios y la región de bisagra o parte de la misma. En una realización, la región constante de Ig o una parte de la misma comprende el dominio CH2, el dominio CH3 y una región de bisagra, es decir, una región Fc o un compañero de unión a FcRn.

10 Como se usa en este documento, la expresión "región Fc" se define como la parte de un polipéptido que corresponde a la región Fc de Ig natural, es decir, formada por la asociación dimérica de los dominios Fc respectivos de sus dos cadenas pesadas. Una región Fc natural forma un homodímero con otra región Fc. En contraste, la expresión "región Fc fusionada genéticamente" o "región Fc monocatenaria" (región scFc), como se usa en este documento, se refiere a una región Fc dimérica sintética compuesta de dominios Fc ligados genéticamente dentro de una sola cadena polipeptídica (es decir, codificados en una sola secuencia genética contigua).

15 En una realización, la "región Fc" se refiere a la parte de una sola cadena pesada de Ig que empieza en la región de bisagra exactamente anterior del sitio de escisión con papaína (es decir, el residuo 216 en IgG, aceptando el primer residuo de la región constante de la cadena pesada como 114) y finalizando en el extremo C del anticuerpo. Por consiguiente, un dominio Fc completo comprende al menos un dominio de bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

20 La región Fc de una región constante de Ig, dependiendo del isotipo de la Ig, puede incluir los dominios CH2, CH3 y CH4, así como la región de bisagra. Las proteínas quiméricas que comprenden una región Fc de una Ig confieren varias propiedades deseables a una proteína quimérica, incluyendo estabilidad aumentada, semivida sérica aumentada (véase Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337: 525), así como unión a receptores de Fc tal como el receptor de Fc neonatal (FcRn) (patentes de Estados Unidos n.º 6.086.875, 6.485.726, 6.030.613; documento WO 03/077834; documento US2003-0235536A1).

25 La región Fc opcionalmente comprende un compañero de unión a FcRn. FcRn es activo en tejidos epiteliales adultos y se expresa en la luz de los intestinos, vías respiratorias pulmonares, superficies nasales, superficies vaginales, superficies del colon y rectales (patente de Estados Unidos n.º 6.485.726). Un compañero de unión a FcRn es una parte de una Ig que se une a FcRn.

30 El receptor FcRn se ha aislado de varias especies de mamífero incluyendo seres humanos. Las secuencias del FcRn humano, FcRn de mono, FcRn de rata y FcRn de ratón son conocidas (Story *et al.* 1994, *J. Exp. Med.* 180:2377). El receptor FcRn se une a IgG (pero no a otras clases de Ig tales como IgA, IgM, IgD e IgE) a pH relativamente bajo, transporta activamente la IgG de forma transcelular en una dirección luminal a serosa, y después libera la IgG al pH relativamente más alto encontrado en los líquidos intersticiales. Se expresa en tejido epitelial adulto (patentes de Estados Unidos n.º 6.485.726, 6.030.613, 6.086.875; documento WO 03/077834; documento US2003-0235536A1), incluyendo epitelio pulmonar e intestinal (Israel *et al.* 1997, *Immunology* 92:69), epitelio tubular proximal renal (Kobayashi *et al.* 2002, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282:F358), así como epitelio nasal, superficies vaginales y superficies del sistema biliar.

35 La región de la parte Fc de IgG que se une al receptor FcRn se ha descrito basándose en cristalografía de rayos X (Burmeister *et al.* 1994, *Nature* 372:379). El área de contacto principal del Fc con el FcRn está cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los contactos de Fc-FcRn se producen todos dentro de una sola cadena pesada de Ig. Los compañeros de unión a FcRn incluyen IgG completa, el fragmento Fc de IgG y otros fragmentos de IgG que incluyen la región de unión completa de FcRn. Los sitios de contacto principales incluyen los residuos aminoacídicos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 y 314 del dominio CH2 y los residuos aminoacídicos 385-387, 428 y 433-436 del dominio CH3. Las referencias a numeración de aminoácidos de Ig o fragmentos de Ig, o regiones, se basan todas en Kabat *et al.* 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.

40 Las regiones Fc o compañeros de unión a FcRn unidos a FcRn pueden trasladarse de forma eficaz a través de las barreras epiteliales mediante FcRn, proporcionando, por tanto, un medio no invasivo para administrar de forma sistémica una molécula terapéutica deseada. Además, las proteínas de fusión que comprenden una región Fc o un compañero de unión a FcRn se endocitan por células que expresan el FcRn. Pero, en lugar de marcarse para degradación, estas proteínas de fusión se reciclan a la circulación de nuevo, aumentando, por tanto, la semivida *in vivo* de estas proteínas. En determinadas realizaciones, las partes de las regiones constantes de Ig son una región Fc o un compañero de unión a FcRn que típicamente se asocia, mediante enlaces disulfuro y otras interacciones no específicas, con otra región Fc u otro compañero de unión a FcRn para formar dímeros y multímeros de orden superior.

45 Dos receptores FcRn pueden unirse a una sola molécula de Fc. Los datos cristalográficos sugieren que cada molécula de FcRn se une a un solo polipéptido del homodímero de Fc. En una realización, la unión del compañero de unión a FcRn, por ejemplo, un fragmento Fc de una IgG, a una molécula biológicamente activa proporciona un medio para suministrar la molécula biológicamente activa por vía oral, bucal, sublingual, rectal, vaginal, como un aerosol administrado por vía nasal o mediante una vía pulmonar, o mediante una vía ocular. En otra realización, la proteína

química puede administrarse de forma invasiva, por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intravenosa.

Una región de compañero de unión a FcRn es una molécula o una parte de la misma que puede unirse específicamente por el receptor FcRn con el consecuente transporte activo mediante el receptor FcRn de la región Fc. Unirse específicamente se refiere a dos moléculas que forman un complejo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y una capacidad de baja a moderada que se distingue de la unión no específica que habitualmente tiene una baja afinidad con una capacidad de moderada a alta. Típicamente, la unión se considera específica cuando la constante de afinidad K_A es mayor de 10^6 M^{-1} , o mayor de 10^8 M^{-1} . Si es necesario, la unión no específica puede reducirse sin afectar sustancialmente a la unión específica variando las condiciones de unión. Las condiciones de unión apropiadas, tales como la concentración de las moléculas, la fuerza iónica de la solución, la temperatura, el tiempo que se deja para la unión, la concentración de un agente bloqueante (por ejemplo, seroalbúmina, caseína de la leche), etc., pueden optimizarlas los expertos en la materia usando técnicas rutinarias.

En determinadas realizaciones, una proteína química de la invención comprende una o más regiones Fc truncadas que son, no obstante, suficientes para conferir propiedades de unión al receptor de Fc (FcR) a la región Fc. Por ejemplo, la parte de una región Fc que se une a FcRn (es decir, la parte de unión a FcRn) comprende de aproximadamente los aminoácidos 282-438 de IgG1, numeración EU (siendo los sitios de contacto principales los aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 y 314 del dominio CH2 y los residuos aminoácídicos 385-387, 428 y 433-436 del dominio CH3). Por tanto, una región Fc de la invención puede comprender o consistir en una parte de unión a FcRn. Las partes de unión a FcRn pueden derivar de cadenas pesadas de cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización, se usa una parte de unión a FcRn de un anticuerpo del isotipo humano IgG1. En otra realización, se usa una parte de unión a FcRn de un anticuerpo del isotipo humano IgG4.

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

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

En determinadas realizaciones, la variante de Fc confiere un cambio en al menos una función efectora conferida por una región Fc que comprende dicho dominio Fc de tipo silvestre (por ejemplo, una mejora o reducción en la capacidad de la región Fc de unirse a receptores de Fc (por ejemplo, FcγRI, FcγRII o FcγRIII) o proteínas del complemento (por ejemplo, C1q), o de desencadenar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis o citotoxicidad dependiente del complemento (CDCC)). En otras realizaciones, la variante de Fc proporciona un residuo de cisteína manipulado.

Las regiones Fc usadas en el contexto de la invención pueden emplear variantes de Fc reconocidas en la técnica que se sabe que confieren un cambio (por ejemplo, una potenciación o reducción) en la función efectora y/o unión a FcR o FcRn. Específicamente, una molécula de unión de la invención puede incluir, por ejemplo, un cambio (por ejemplo, una sustitución) en una o más de las posiciones aminoácídicas divulgadas en las publicaciones PCT internacionales WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO04/044859, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2 y WO06/085967A2; las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º US2007/0231329, US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US20070248603, US20070286859, US20080057056; o las patentes de Estados Unidos 5.648.260; 5.739.277;

5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; 7.083.784; 7.404.956 y 7.317.091. En una realización, el cambio específico (por ejemplo, la sustitución específica de uno o más aminoácidos divulgados en la técnica) puede hacerse en una o más de las posiciones aminoacídicas divulgadas. En otra realización, puede hacerse un cambio diferente en una o más de las posiciones aminoacídicas divulgadas (por ejemplo, la sustitución diferente de una o más posiciones aminoacídicas divulgadas en la técnica).

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

Determinadas mutaciones anteriores pueden conferir nueva funcionalidad en la región Fc o compañero de unión a FcRn. Por ejemplo, una realización incorpora N297A, eliminando un sitio de N-glucosilación altamente conservado. El efecto de esta mutación es reducir la inmunogenia, potenciando de ese modo la semivida en circulación de la región Fc, y hacer que la región Fc sea incapaz de unirse a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIIA, sin comprometer la afinidad por FcRn (Routledge *et al.* 1995, *Transplantation* 60:847; Friend *et al.* 1999, *Transplantation* 68:1632; Shields *et al.* 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591). Como ejemplo adicional de la nueva funcionalidad que surge de las mutaciones descritas anteriormente puede aumentarse la afinidad por FcRn más allá de la de tipo silvestre en algunos casos. Esta afinidad aumentada puede reflejar una tasa "de asociación" aumentada, una tasa de "disociación" disminuida o tanto una tasa "de asociación" aumentada como una tasa de "disociación" disminuida. Ejemplos de mutaciones que se cree que confieren una afinidad aumentada por FcRn incluyen, aunque sin limitación, T256A, T307A, E380A y N434A (Shields *et al.* 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591).

Además, al menos tres receptores de Fc gamma humanos parecen reconocer un sitio de unión en IgG dentro de la región de bisagra inferior, en general los aminoácidos 234-237. Por lo tanto, otro ejemplo de la nueva funcionalidad y la posible inmunogenia disminuida puede surgir de mutaciones en esta región, como, por ejemplo, reemplazando los aminoácidos 233-236 de IgG1 humana "ELLG" en la secuencia correspondiente de IgG2 "PVA" (con eliminación de un aminoácido). Se ha demostrado que FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que median diversas funciones efectoras, se unirán a IgG1 cuando se hayan introducido dichas mutaciones. Ward y Ghetie 1995, *Therapeutic Immunology* 2:77 y Armour *et al.* 1999, *Eur. J. Immunol.* 29:2613.

En una realización, la región Fc es un polipéptido que incluye la secuencia PKNSSMSINTP (SEQ ID NO: 89 o SEQ ID NO: 3 de la patente de Estados Unidos n.º 5.739.277) y que opcionalmente incluye además una secuencia seleccionada de HQSLGTQ (SEQ ID NO: 90), HQNLSDGK (SEQ ID NO: 91), HQNISDGK (SEQ ID NO: 92), o VISSHLGQ (SEQ ID NO: 93) (o SEQ ID NOs: 11, 1, 2 y 31, respectivamente de la patente de Estados Unidos n.º 5.739.277).

En otra realización, la región Fc comprende una secuencia de aminoácidos en la región de bisagra o una parte de la misma que forma uno o más enlaces disulfuro con otra región Fc o una parte de la misma. El enlace disulfuro por parte de la región Fc o una parte de la misma sitúa juntos el primer polipéptido que comprende FVIII y el segundo polipéptido que comprende el fragmento de VWF, de modo que el VWF endógeno no reemplaza el fragmento de VWF y no se une al FVIII. Por lo tanto, el enlace disulfuro entre la primera región Fc y la segunda región Fc evita la interacción entre VWF endógeno y la proteína FVIII. Esta inhibición de la interacción entre el VWF y la proteína de FVIII permite que la semivida de la proteína quimérica vaya más allá del límite de dos veces. La región de bisagra o una parte de la misma puede unirse además a uno o más dominios de CH1, CH2, CH3, un fragmento de los mismos y cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, la región constante de inmunoglobulina o una parte de la misma es una región de bisagra y CH2.

En determinadas realizaciones, la región Fc o una parte de la misma está hemiglucosilada. Por ejemplo, la proteína quimérica que comprende dos regiones Fc puede contener una primera región Fc glucosilada (por ejemplo, una región CH2 glucosilada) y una segunda región Fc aglucosilada (por ejemplo, una región CH2 aglucosilada). En una realización, puede interponerse un conector entre las regiones Fc glucosiladas y aglucosiladas. En otra realización, la región Fc está completamente glucosilada, es decir, todas las regiones Fc están glucosiladas. En otras realizaciones, la región Fc puede estar aglucosilada, es decir, ninguno de los restos de Fc está glucosilado.

En determinadas realizaciones, una proteína quimérica de la invención comprende una sustitución aminoacídica en una región Fc (por ejemplo, variantes de Fc), que altera las funciones efectoras independientes de antígeno de la región Fc, en particular la semivida en circulación de la proteína.

Dichas proteínas presentan unión aumentada o disminuida a FcRn en comparación con proteínas que carecen de estas sustituciones y, por lo tanto, tienen una semivida aumentada o disminuida en suero, respectivamente. Se prevé que las variantes de Fc con afinidad mejorada por FcRn tendrán semividas en suero más largas, y dichas moléculas tienen aplicaciones útiles en métodos de tratamiento de mamíferos donde se desea una semivida larga del polipéptido administrado, por ejemplo, para tratar una enfermedad o trastorno crónico (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 7.348.004, 7.404.956 y 7.862.820). En contraste, se espera que las variantes de Fc con afinidad de unión a FcRn disminuida tengan semividas más cortas, y dichas moléculas también son útiles, por ejemplo, para administración a un mamífero donde puede ser ventajoso un tiempo en circulación acortado, por ejemplo, para imágenes de diagnóstico *in vivo* o en situaciones donde el polipéptido de partida tiene efectos secundarios tóxicos cuando está presente en la circulación durante periodos prolongados. Las variantes de Fc con afinidad de unión a FcRn disminuida también tienen menor probabilidad de cruzar la placenta y, por tanto, también son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas. Además, otras aplicaciones en que puede desearse afinidad de unión a FcRn reducida incluyen aquellas aplicaciones en que se desea localización en el cerebro, el riñón y/o el hígado. En una realización ejemplar, la proteína quimérica de la invención presenta transporte reducido a través del epitelio de los glomérulos renales de la vasculatura. En otra realización, la proteína quimérica de la invención presenta transporte reducido a través de la barrera hematoencefálica (BBB) del cerebro, al espacio vascular. En una realización, una proteína con unión alterada a FcRn comprende al menos una región Fc (por ejemplo, una o dos regiones Fc) que tiene una o más sustituciones aminoacídicas dentro del "bucle de unión a FcRn" de una región constante de Ig. El bucle de unión a FcRn está compuesto de los residuos aminoacídicos 280-299 (de acuerdo con la numeración EU) de una región Fc de longitud completa de tipo silvestre. En otras realizaciones, una región Fc en una proteína quimérica de la invención que tiene afinidad de unión a FcRn alterada comprende al menos una región Fc o compañero de unión a FcRn que tiene una o más sustituciones aminoacídicas dentro de la "zona de contacto" con FcRn de 15 Å. Como se usa en este documento, la expresión "zona de contacto" con FcRn de 15 Å incluye residuos en las siguientes posiciones de un resto Fc de longitud completa de tipo silvestre: 243-261, 275-280, 282-293, 302-319, 336-348, 367, 369, 372-389, 391, 393, 408, 424, 425-440 (numeración EU). En otras realizaciones, una región Fc como se usa en el contexto de la invención que tiene afinidad de unión a FcRn alterada comprende al menos una región Fc que tiene una o más sustituciones aminoacídicas en una posición aminoacídica correspondientes a una cualquiera de las siguientes posiciones EU: 256, 277-281, 283-288, 303-309, 313, 338, 342, 376, 381, 384, 385, 387, 434 (*p. ej.*, N434A o N434K), y 438. Sustituciones aminoacídicas ejemplares que alteraban la actividad de unión a FcRn se divulgan en la publicación PCT internacional n.º WO05/047327.

Una región Fc usada en la invención también puede comprender una sustitución aminoacídica reconocida en la técnica que altera la glucosilación de la proteína quimérica. Por ejemplo, la región Fc de la proteína quimérica ligada a un fragmento de VWF o una proteína FVIII puede comprender una región Fc que tiene una mutación que da lugar a glucosilación reducida (por ejemplo, glucosilación ligada a N u O) o puede comprender una glucoforma alterada del resto Fc de tipo silvestre (por ejemplo, un glucano bajo en fucosa o libre de fucosa).

En una realización, una proteína quimérica sin procesar de la invención puede comprender una región Fc fusionada genéricamente (es decir, región scFc) que tiene dos o más de sus regiones constantes de Ig constituyentes o una parte de las mismas independientemente seleccionadas de la región constante de Ig o una parte de la misma descrita en este documento. En una realización, las regiones Fc de una región Fc dimérica son iguales. En otra realización, al menos dos de las regiones Fc son diferentes. Por ejemplo, las regiones Fc de las proteínas de la invención comprenden el mismo número de residuos aminoacídicos o pueden diferir en la longitud en uno o más residuos aminoacídicos (por ejemplo, en aproximadamente 5 residuos aminoacídicos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 residuos aminoacídicos), aproximadamente 10 residuos, aproximadamente 15 residuos, aproximadamente 20 residuos, aproximadamente 30 residuos, aproximadamente 40 residuos o aproximadamente 50 residuos). En otras realizaciones más, las regiones Fc de la proteína de la invención pueden diferir en la secuencia en una o más posiciones aminoacídicas. Por ejemplo, al menos dos de las regiones Fc pueden diferir en aproximadamente 5 posiciones aminoacídicas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones aminoacídicas), aproximadamente 10 posiciones, aproximadamente 15 posiciones, aproximadamente 20 posiciones, aproximadamente 30 posiciones, aproximadamente 40 posiciones o aproximadamente 50 posiciones).

II.E. Conectores

La proteína quimérica de la presente invención comprende además un conector escindible que comprende una región

a2 de FVIII que comprende la secuencia de aminoácidos de Glu720 a Arg740 correspondiente a SEQ ID NO: 65, en la que la región a2 puede escindirse por trombina, en la que dicho conector escindible conecta la segunda secuencia de XTEN y la segunda región Fc en la segunda cadena polipeptídica de la proteína quimérica de la presente invención. Además, la proteína quimérica de la presente invención opcionalmente comprende además uno o más conectores adicionales. Un tipo de conectores es un conector escindible, que puede escindirse por diversas proteasas cuando se administra a un sujeto *in vivo*, por ejemplo, en un sitio de coagulación. En una realización, el conector escindible permite la escisión del resto, por ejemplo, una proteína VWF, de la secuencia de XTEN, por tanto, de la proteína quimérica en el sitio de la reacción en cadena de coagulación, permitiendo de ese modo que FVIII activado (FVIIIa) obtenga su actividad de FVIIIa. Otro tipo de conectores es un conector procesable, que contiene un sitio de escisión intracelular y, por tanto, puede escindirse mediante una enzima de procesamiento intracelular en una célula hospedadora, permitiendo la expresión conveniente de un polipéptido y formación de una proteína quimérica.

Puede estar presente uno o más conectores adicionales entre dos proteínas cualesquiera en la proteína quimérica. En algunas realizaciones, el primer polipéptido comprende además un conector, por ejemplo, un conector escindible entre la proteína FVIII y la primera región Fc.

El conector útil en la presente invención puede comprender cualquier molécula orgánica. En una realización, el conector comprende un polímero, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o hidroxietil almidón (HES). En otra realización, el conector comprende una secuencia de aminoácidos. El conector puede comprender al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, o 2000 aminoácidos. El conector puede comprender 1-5 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 10-50 aminoácidos, 50-100 aminoácidos, 100-200 aminoácidos, 200-300 aminoácidos, 300-400 aminoácidos, 400-500 aminoácidos, 500-600 aminoácidos, 600-700 aminoácidos, 700-800 aminoácidos, 800-900 aminoácidos o 900-1000 aminoácidos. En una realización, el conector comprende una secuencia de XTEN. Pueden usarse ejemplos adicionales de XTEN de acuerdo con la presente invención y se divulgan en las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2010/023954 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 o 2011/0172146 A1, o las publicaciones de patente internacional n.º WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1 o WO 2011028344 A2. En otra realización, el conector es una secuencia de PAS.

En una realización, el conector es un polímero, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o hidroxietil almidón (HES). En otra realización, el conector es una secuencia de aminoácidos. El conector puede comprender al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, o 2000 aminoácidos. El conector puede comprender 1-5 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 10-50 aminoácidos, 50-100 aminoácidos, 100-200 aminoácidos, 200-300 aminoácidos, 300-400 aminoácidos, 400-500 aminoácidos, 500-600 aminoácidos, 600-700 aminoácidos, 700-800 aminoácidos, 800-900 aminoácidos o 900-1000 aminoácidos.

Ejemplos de conector son bien conocidos en la técnica. En una realización, el conector comprende la secuencia G_n . El conector puede comprender la secuencia $(GA)_n$. El conector puede comprender la secuencia $(GGS)_n$. En otras realizaciones, el conector comprende $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 101). En otras realizaciones más, el conector comprende la secuencia $(GGS)_n(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 95). En estos casos, n puede ser un número entero de 1-100. En otros casos, n puede ser un número entero de 1-20, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20. Ejemplos de conectores incluyen, aunque sin limitación, GGG, SGGSGGS (SEQ ID NO: 96), GGSGSGGSGGSGGG (SEQ ID NO: 97), GGSGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 98), GGSGSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 99) o GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 100). El conector no elimina o disminuye la actividad de la proteína VWF o la actividad coagulante del factor VIII. Opcionalmente, el conector potencia la actividad de la proteína VWF o la actividad coagulante de la proteína de factor VIII, por ejemplo, disminuyendo adicionalmente los efectos de impedimento estérico y haciendo que la proteína VWF o la parte de factor VIII sea más accesible a su sitio de unión diana.

En una realización, el conector útil para la proteína quimérica es de 15-25 aminoácidos de longitud. En otra realización, el conector útil para la proteína quimérica es de 15-20 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector para la proteína quimérica es de 10-25 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones, el conector para la proteína quimérica es de 15 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones más, el conector para la proteína quimérica es $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 94) donde G representa glicina, S representa serina y n es un número entero de 1-20.

II. F. Sitios de escisión

Un conector escindible puede incorporar un resto que pueda escindirse químicamente (por ejemplo, hidrólisis de un enlace éster), enzimáticamente (es decir, incorporación de una secuencia de escisión por proteasa) o fotolíticamente (por ejemplo, un cromóforo tal como ácido 3-amino-3-(2-nitrofenil)propiónico (ANP)) para liberar una molécula de otra.

En una realización, un conector escindible adicional comprende uno o más sitios de escisión en el extremo N o el extremo C o ambos. En otra realización, el conector escindible adicional consiste esencialmente en o consiste en uno o más sitios escindibles. En otras realizaciones, el conector escindible adicional comprende secuencias conectoras de

aminoácidos heterólogas descritas en este documento o polímeros y uno o más sitios escindibles.

En determinadas realizaciones, un conector escindible adicional comprende uno o más sitios escindibles que pueden escindirse en una célula hospedadora (es decir, sitios de procesamiento intracelular). Ejemplos no limitantes del sitio de escisión incluyen RRRR (SEQ ID NO: 102), RKRRKR (SEQ ID NO: 103) y RRRRS (SEQ ID NO: 104).

En algunas realizaciones, un conector escindible adicional comprende una región a1 de FVIII, una región a2 de FVIII, una región a3 de FVIII, un sitio de escisión por trombina que comprende X-V-P-R (SEQ ID NO: 105) y un motivo de interacción con exosito PAR1, en el que X es un aminoácido alifático, o cualquier combinación de los mismos. La proteína quimérica de la presente invención comprende un conector escindible que comprende la región a2 que comprende una secuencia de aminoácidos un 100 % idéntica a Glu720 hasta Arg740 correspondiente a FVIII de longitud completa, en el que la región a2 puede escindirse por trombina. En una realización particular, un conector escindible útil para la invención comprende una región a2 que comprende ISDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 106). En otras realizaciones, un conector escindible adicional para la invención comprende la región a1 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o un 100 % idéntica a Met337 hasta Arg372 correspondiente a FVIII de longitud completa, en el que la región a1 puede escindirse por trombina. En una realización particular, la región a1 comprende ISMKNNEEAEDYDDDLTSEMVDVRFDDDNPSFIQIRSV (SEQ ID NO: 107). En algunas realizaciones, un conector escindible adicional para la invención comprende la región a3 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o un 100 % idéntica a Glu1649 hasta Arg1689 correspondiente a FVIII de longitud completa, en el que la región a3 puede escindirse por trombina. En una realización específica, un conector escindible adicional para la invención comprende una región a3 que comprende ISEITRRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQ (SEQ ID NO: 108).

En otras realizaciones, un conector escindible adicional comprende el sitio de escisión por trombina que comprende X-V-P-R (SEQ ID NO: 105) y el motivo de escisión con exosito PAR1 y en el que el motivo de interacción con exosito PAR1 comprende S-F-L-L-R-N (SEQ ID NO: 109). El motivo de interacción con exosito PAR1 puede comprender además una secuencia de aminoácidos seleccionada de P, P-N, P-N-D, P-N-D-K (SEQ ID NO: 110), P-N-D-K-Y (SEQ ID NO: 111), P-N-D-K-Y-E (SEQ ID NO: 112), P-N-D-K-Y-E-P (SEQ ID NO: 113), P-N-D-K-Y-E-P-F (SEQ ID NO: 114), P-N-D-K-Y-E-P-F-W (SEQ ID NO: 115), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E (SEQ ID NO: 116), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D (SEQ ID NO: 117), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E (SEQ ID NO: 118), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E-E (SEQ ID NO: 119), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E-E-S (SEQ ID NO: 120) o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el aminoácido alifático se selecciona de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina.

En otras realizaciones, un conector escindible adicional comprende uno o más sitios de escisión que se escinden por una proteasa después de administrar una proteína quimérica que comprende el conector escindible a un sujeto. En una realización, el sitio de escisión se escinde por una proteasa seleccionada del grupo que consiste en factor XIa, factor XIIa, calicreína, factor VIIa, factor IXa, factor Xa, factor IIa (trombina), elastasa-2, MMP-12, MMP-13, MMP-17 y MMP-20. En otra realización, el sitio de escisión se selecciona del grupo que consiste en un sitio de escisión por FXIa (por ejemplo, KLTR↓AET (SEQ ID NO: 121)), un sitio de escisión por FXIa (por ejemplo, DFTR↓VVG (SEQ ID NO: 122)), un sitio de escisión por FXIIa (por ejemplo, TMTR↓IVGG (SEQ ID NO: 123)), un sitio de escisión por calicreína (por ejemplo, SPFR↓STGG (SEQ ID NO: 124)), un sitio de escisión por FVIIa (por ejemplo, LQVR↓IVGG (SEQ ID NO: 125)), un sitio de escisión por FIXa (por ejemplo, PLGR↓IVGG (SEQ ID NO: 126)), un sitio de escisión por Fxa (por ejemplo, IEGR↓TVGG (SEQ ID NO: 127)), un sitio de escisión por FIIa (trombina) (por ejemplo, LTPR↓SLLV (SEQ ID NO: 128)), un sitio de escisión por elastasa-2 (por ejemplo, LGPV↓SGVP (SEQ ID NO: 129)), un sitio de escisión por granzima-B (por ejemplo, VAGD↓SLEE (SEQ ID NO: 130)), un sitio de escisión por MMP-12 (por ejemplo, GPAG↓LGGA (SEQ ID NO: 131)), un sitio de escisión por MMP-13 (por ejemplo, GPAG↓LRGA (SEQ ID NO: 132)), un sitio de escisión por MMP-17 (por ejemplo, APLG↓LRLR (SEQ ID NO: 133)), un sitio de escisión por MMP-20 (por ejemplo, PALP↓LVAQ (SEQ ID NO: 134)), un sitio de escisión por TEV (por ejemplo, ENLYFQ↓G (SEQ ID NO: 135)), un sitio de escisión por enterocinasa (por ejemplo, DDDK↓IVGG (SEQ ID NO: 136)), un sitio de escisión por proteasa 3C (PRESCISION™) (por ejemplo, LEVLFQ↓GP (SEQ ID NO: 137)) y un sitio de escisión por sortasa A (por ejemplo, LPKT↓GSES) (SEQ ID NO: 138). En determinadas realizaciones, los sitios de escisión por FXIa incluyen, aunque sin limitación, por ejemplo, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 1) y SVSQTSKLTR (SEQ ID NO: 3). Sitios de escisión por trombina ejemplares no limitantes incluyen, por ejemplo, DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 4), TTKIKPR (SEQ ID NO: 5), LVPRG (SEQ ID NO: 6), DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 88) o IEPRSFS (SEQ ID NO: 194), y una secuencia que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en ALRPR (SEQ ID NO: 7) (por ejemplo, ALRPRVVGGA (SEQ ID NO: 145)).

En una realización específica, el sitio de escisión es TLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEK (SEQ ID NO: 146). En otra realización, el sitio de escisión comprende DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 88) o un fragmento del mismo. En una realización particular, el sitio de escisión comprende IEPRSFS (SEQ ID NO: 194). En otra realización, el sitio de escisión comprende EPRSFS (SEQ ID NO: 195), en el que el sitio de escisión no es la región a2 de longitud completa de FVIII. En otra realización más, el sitio de escisión comprende IEPR (SEQ ID NO: 200). En otra realización, el sitio de escisión comprende IEPR (SEQ ID NO: 200), en el que el sitio de escisión no es la región a2 de longitud completa de FVIII o no comprende la región a2 de longitud completa de FVIII. En otras

realizaciones, el sitio de escisión comprende DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 88), KNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 139), NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 140), TGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 141), GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 142), DYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 143), YYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 144), YEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 176), EDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 177), DSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 178), SYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 179), YEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 180), EDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 181), DISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 182), ISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 183), SAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 184), AYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 185), YLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 186), LLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 187), LSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 188), SKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 189), KNNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 190), NNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 191), NAIIEPRSFS (SEQ ID NO: 192), AIEPRSFS (SEQ ID NO: 193), o IEPRSFS (SEQ ID NO: 194). En otras realizaciones, el sitio de escisión comprende DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 88), KNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 139), NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 140), TGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 141), GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 142), DYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 143), YYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 144), YEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 176), EDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 177), DSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 178), SYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 179), YEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 180), EDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 181), DISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 182), ISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 183), SAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 184), AYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 185), YLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 186), LLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 187), LSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 188), SKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 189), KNNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 190), NNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 191), NAIIEPRSFS (SEQ ID NO: 192), AIEPRSFS (SEQ ID NO: 193), o IEPRSFS (SEQ ID NO: 194), en el que el sitio de escisión no es la región a2 de longitud completa de FVIII. En determinadas realizaciones, el conector escindible es escindible en un ensayo de escisión con trombina como se proporciona en este documento o como se sabe en la técnica.

III. Polinucleótidos, vectores y células hospedadoras

La invención también proporciona un polinucleótido que codifica una proteína quimérica de la invención. En una realización, la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica pueden estar codificadas por una sola cadena polinucleotídica. En otra realización, la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están codificadas por dos polinucleótidos diferentes, es decir, una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos. En otra realización, la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos están en dos polinucleótidos diferentes (por ejemplo, vectores diferentes).

La invención también incluye dos polinucleótidos, una primera secuencia polinucleotídica que codifica el primer polipéptido que comprende la proteína FVIII fusionada a la primera región Fc, y una segunda secuencia polinucleotídica que codifica el segundo polipéptido que comprende el fragmento de VWF, la segunda secuencia de XTEN que tiene menos de 288 aminoácidos de longitud y la segunda región Fc. En algunas realizaciones, la proteína quimérica que comprende dos cadenas polipeptídicas o tres cadenas polipeptídicas puede estar codificada por una sola cadena polinucleotídica, y después procesarse en dos o tres (o más) cadenas polipeptídicas. En otras realizaciones más, una proteína quimérica que comprende estas cadenas polipeptídicas puede estar codificada por dos o tres cadenas polinucleotídicas.

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

Como se usa en este documento, un vector de expresión se refiere a cualquier construcción de ácido nucleico que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de una secuencia codificante insertada, o en el caso de un vector vírico de ARN, los elementos necesarios para la replicación y traducción, cuando se introduce en una célula hospedadora apropiada. Los vectores de expresión pueden incluir plásmidos, fagómidos, virus y derivados de los mismos.

Los vectores de expresión para su uso en el contexto de la invención incluirán polinucleótidos que codifican la proteína quimérica descrita en este documento. En una realización, una o más de las secuencias codificantes del primer polipéptido que comprende la proteína FVIII y la primera región Fc, el segundo polipéptido que comprende el fragmento de VWF, la secuencia de XTEN que tiene menos de 288 aminoácidos y la segunda región Fc, o ambos están unidos de forma funcional a una secuencia de control de la expresión. Como se usa en este documento, dos secuencias de

ácido nucleico se unen de forma funcional cuando se unen covalentemente de tal manera que permita que cada secuencia de ácido nucleico componente retenga su funcionalidad. Una secuencia codificante y una secuencia de control de la expresión génica se dice que están unidas de forma funcional cuando se unen covalentemente de tal manera que sitúen la expresión o transcripción y/o traducción de la secuencia codificante bajo la influencia o control de la secuencia de control de la expresión génica. Dos secuencias de ADN se dice que están unidas de forma funcional si la inducción de un promotor en la secuencia de expresión génica 5' provoca la transcripción de la secuencia codificante y si la naturaleza de la unión entre las dos secuencias de ADN (1) no provoca la introducción de una mutación de desplazamiento del marco de lectura, (2) no interfiere con la capacidad de la región promotora de dirigir la transcripción de la secuencia codificante o (3) no interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente de traducirse en una proteína. Por tanto, una secuencia de expresión génica estaría unida de forma funcional a una secuencia de ácido nucleico codificante si la secuencia de expresión génica pudiera lograr la transcripción de esta secuencia de ácido nucleico codificante de modo que el transcrito resultante se traduzca en la proteína o polipéptido deseado.

Una secuencia de control de la expresión génica, como se usa en este documento, es cualquier secuencia de nucleótidos reguladora, tal como una secuencia promotora o combinación de promotor-potenciador, que facilita la transcripción y traducción eficaces del ácido nucleico codificante al que está unida de forma funcional. La secuencia de control de la expresión génica puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero o vírico, tal como un promotor constitutivo o inducible. Los promotores de mamífero constitutivos incluyen, aunque sin limitación, los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), adenosina desaminasa, piruvato cinasa, promotor de beta-actina, y otros promotores constitutivos. Promotores víricos ejemplares que funcionan constitutivamente en células eucarióticas incluyen, por ejemplo, promotores del citomegalovirus (CMV), virus de simio (por ejemplo, SV40), papilomavirus, adenovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del sarcoma de Rous, citomegalovirus, las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney y otros retrovirus, y el promotor de la timidina cinasa del virus del herpes simple. Otros promotores constitutivos son conocidos por los expertos en la materia. Los promotores útiles como secuencias de expresión génica de la invención también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles se expresan en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, el promotor de la metalotioneína se induce para promover la transcripción y traducción en presencia de determinados iones metálicos. Otros promotores inducibles son conocidos por los expertos en la materia.

En general, la secuencia de control de la expresión génica incluirá, según lo necesario, secuencias que no se transcriben 5' y no se traducen 5' implicadas con el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente, tal como una secuencia TATA, secuencia de caperuza, secuencia CAAT y similares. Espacialmente, dichas secuencias que no se transcriben 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico codificante unido de forma funcional. Las secuencias de expresión génica opcionalmente incluyen secuencias potenciadoras o secuencias activadores anteriores según se desee.

Los vectores víricos incluyen, aunque sin limitación, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus, tal como el virus de la leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del tumor mamario murino y virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociado; virus del tipo SV40; poliomavirus; virus de Epstein-Barr; papilomavirus; herpesvirus; virus de la variolovacuna; poliovirus; y virus ARN tal como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores bien conocidos en la técnica. Determinados vectores víricos se basan en virus eucarióticos no citopáticos en que se han remplazado genes no esenciales con el gen de interés. Virus no citopáticos incluyen retrovirus, cuyo ciclo vital implica retrotranscripción del ARN vírico genómico en ADN con posterior integración provírica en ADN de la célula hospedadora. Los retrovirus se han aprobado para ensayos de genoterapia en seres humanos. Los más útiles son aquellos retrovirus que son deficientes en la replicación (es decir, puede dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero no pueden fabricar una partícula infecciosa). Dichos vectores de expresión retrovíricos genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes *in vivo*. Se proporcionan protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes en la replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una línea celular de empaquetado con plásmido, producción de retrovirus recombinantes mediante la línea celular de empaquetado, colección de partículas víricas de medio de histocultivo, e infección de las células diana con partículas víricas) en Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman Co., Nueva York (1990) y Murry, E. J., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991).

El virus puede ser un virus adenoasociado, un virus de ADN bicatenario. El virus adenoasociado puede manipularse para que sea deficiente en la replicación y pueda infectar una amplia serie de tipos celulares y especies. Además, tiene ventajas tales como estabilidad en calor y disolvente lipídico; altas frecuencias de transducción en células de diversas estirpes, incluyendo células hematopoyéticas; y ausencia de inhibición de superinfección permitiendo, por tanto, múltiples series de transducciones. Según se informa, el virus adenoasociado puede integrarse en ADN celular humano de una manera específica de sitio, minimizando de ese modo la posibilidad de mutagénesis por inserción y variabilidad de la expresión del gen insertado característica de infección retrovírica. Además, se han seguido infecciones por virus adenoasociado de tipo silvestre en histocultivo durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un acontecimiento relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de una manera extracromosómica.

- Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito ampliamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. En los últimos años, los vectores plasmídicos se han encontrado particularmente ventajosos para suministrar genes a células *in vivo* a causa de su incapacidad de replicarse dentro e integrarse en un genoma hospedador. Estos plásmidos, sin embargo, que tienen un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido a partir de un gen codificado de forma funcional dentro del plásmido. Algunos plásmidos usados normalmente disponibles de proveedores comerciales incluyen pBR322, pUC18, pUC19, diversos plásmidos pcDNA, pRC/CMV, diversos plásmidos pCMV, pSV40 y pBlueScript. Ejemplos adicionales de plásmidos específicos incluyen pcDNA3.1, número de catálogo V79020; pcDNA3.1/hygro, número de catálogo V87020; pcDNA4/myc-His, número de catálogo V86320; y pBudCE4.1, número de catálogo V53220, todos de Invitrogen (Carlsbad, CA.). Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos en la materia. Además, pueden diseñarse plásmidos de forma personalizada usando técnicas convencionales de biología molecular para retirar y/o añadir fragmentos específicos de ADN.
- En un sistema de expresión de insecto que puede usarse para producir las proteínas de la invención, se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar los genes exógenos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. Una secuencia codificante puede clonarse en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de poliedro) del virus y situarse bajo el control de un promotor de ACNPV (por ejemplo, el promotor de poliedro). La inserción satisfactoria de una secuencia codificante provocará la inactivación del gen de poliedro y la producción de virus recombinante no ocluido (es decir, virus que carece de la cubierta proteínica codificada por el gen de poliedro). Estos virus recombinantes se usan entonces para infectar células *Spodoptera frugiperda* en que se expresa el gen insertado. (Véase, por ejemplo, Smith *et al.* (1983) J Virol 46:584; patente de Estados Unidos n.º 4.215.051). Ejemplos adicionales de este sistema de expresión pueden encontrarse en Ausubel *et al.*, eds. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.
- Otro sistema que puede usarse para expresar las proteínas de la invención es el sistema de expresión del gen de la glutamina sintetasa, también denominado "sistema de expresión de GS" (Lonza Biologies PLC, Berkshire Reino Unido). Este sistema de expresión se describe con detalle en la patente de Estados Unidos n.º 5.981.216.
- En células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos donde se usa un adenovirus como vector de expresión, puede ligarse una secuencia codificante a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico después puede insertarse en el genoma de adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción de una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, región E1 o E3) producirá un virus recombinante que es viable y con capacidad de expresar el péptido en hospedadores infectados. (Véase, por ejemplo, Logan y Shenk (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:3655). Como alternativa, puede usarse el promotor de 7,5 K de la variolovacuna. Véase, por ejemplo, Mackett *et al.* (1982) Proc Natl Acad Set USA 79:7415; Mackett *et al.* (1984) J Virol 49:857; Panicali *et al.* (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79:4927.
- Para aumentar la eficacia de producción, los polinucleótidos pueden diseñarse para que codifiquen múltiples unidades de la proteína de la invención separadas por sitios de escisión enzimática. El polipéptido resultante puede escindirse (por ejemplo, por tratamiento con la enzima apropiada) para recuperar las unidades polipeptídicas. Esto puede aumentar la producción de polipéptidos dirigidos por un solo promotor. Cuando se usan en sistemas de expresión víricos apropiados, la traducción de cada polipéptido codificado por el ARNm se dirige internamente en el transcrito; por ejemplo, por un sitio interno de entrada del ribosoma, IRES. Por tanto, la construcción policistrónica dirige la transcripción de un solo ARNm policistrónico grande que, a su vez, dirige la traducción de múltiples polipéptidos individuales. Esta estrategia elimina la producción y procesamiento enzimático de poliproteínas y puede aumentar significativamente la producción de polipéptidos dirigidos por un solo promotor.
- Los vectores usados en transformación habitualmente contendrán un marcador de selección usado para identificar transformantes. En sistemas bacterianos, esto puede incluir un gen de resistencia a antibiótico tal como ampicilina o kanamicina. Marcadores de selección para su uso en células de mamífero cultivadas incluyen genes que confieren resistencia a fármacos, tal como neomicina, higromicina y metotrexato. El marcador de selección puede ser un marcador de selección amplificable. Un marcador de selección amplificable es el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR). Simonsen C *et al.* (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:2495-9. Los marcadores de selección se revisan por Thilly (1986) Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass., y la elección de marcadores de selección pertenece al nivel de habilidades habituales en la técnica.
- Pueden introducirse marcadores de selección en la célula en un plásmido separado 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 diferentes promotores o el mismo promotor, produciendo la última disposición un mensaje dicistrónico. Las construcciones de este tipo son conocidas en la técnica (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 4.713.339).
- Los vectores de expresión pueden codificar marcas que permitan fácil purificación de la proteína producida de forma recombinante. Ejemplos incluyen, aunque sin limitación, el vector pUR278 (Ruther *et al.* (1983) EMBO J 2:1791), en

que las secuencias codificantes de la proteína a expresar pueden ligarse en el vector en el mismo marco de lectura con la región codificante de lac z de modo que se produzca una proteína de fusión marcada; pueden usarse vectores pGEX para expresar proteínas de la invención con una marca de glutatión S-transferasa (GST). Estas proteínas habitualmente son solubles y pueden purificarse fácilmente de células por adsorción a microesferas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores incluyen sitios de escisión (trombina o proteasa factor Xa o PRESSION PROTEASE™ (Pharmacia, Peapack, N.J.)) para una fácil eliminación de la marca después de la purificación.

El vector o vectores de expresión entonces se transfectan o cotransfectan en una célula diana adecuada, que expresará los polipéptidos. Las técnicas de transfección conocidas en la técnica incluyen, aunque sin limitación, precipitación con fosfato de calcio (Wigler *et al.* (1978) Cell 14:725), electroporación (Neumann *et al.* (1982) EMBO J 1:841) y reactivos basados en liposomas. Puede utilizarse una diversidad de sistemas de hospedador-vector de expresión para expresar las proteínas descritas en este documento incluyendo células tanto procarióticas como eucarióticas. Estos incluyen, aunque sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante o ADN plasmídico que contienen una secuencia codificante apropiada; levaduras u hongos filamentosos transformados con vectores de expresión recombinantes de levadura u hongos que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor o virus del mosaico del tabaco) o transformados con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen una secuencia codificante apropiada; o sistemas de células animales, incluyendo células de mamífero (por ejemplo, células HEK 293, CHO, Cos, HeLa, HKB11 y BHK).

En una realización, la célula hospedadora es una célula eucariótica. Como se usa en este documento, una célula eucariótica se refiere a cualquier célula animal o vegetal que tenga un núcleo definido. Células eucarióticas de animales incluyen células de vertebrados, por ejemplo, mamíferos, y células de invertebrados, por ejemplo, insectos. Células eucarióticas de plantas específicamente pueden incluir, sin limitación, células de levadura. Una célula eucariótica es distinta de una célula procariótica, por ejemplo, bacterias.

En determinadas realizaciones, la célula eucariótica es una célula de mamífero. Una célula de mamífero es cualquier célula derivada de un mamífero. Las células de mamífero específicamente incluyen, aunque sin limitación, líneas celulares de mamífero. En una realización, la célula de mamífero es una célula humana. En otra realización, la célula de mamífero es una célula HEK 293, que es una línea celular de riñón embrionario humano. Las células HEK 293 están disponibles como CRL-1533 de la American Type Culture Collection, Manassas, VA, y como células 293-H, n.º de catálogo 11631-017 o células 293-F, n.º de catálogo 11625-019 de Invitrogen (Carlsbad, Calif.). En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una célula PER.C6®, que es una línea celular humana derivada de retina. Las células PER.C6® están disponibles de Crucell (Leiden, Países Bajos). En otras realizaciones, la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO). Las células CHO están disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, VA. (por ejemplo, CHO-K1; CCL-61). En otras realizaciones más, la célula de mamífero es una célula de riñón de cría de hámster (BHK). Las células BHK están disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, Va. (por ejemplo, CRL-1632). En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una célula HKB11, que es una línea celular híbrida de una célula HEK293 y una línea de linfocitos B humanos. Mei *et al.*, Mol. Biotechnol. 34(2): 165-78 (2006).

En otras realizaciones más, las células transfectadas se transfectan de forma estable. Estas células pueden seleccionarse y mantenerse como una línea celular estable, usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

Las células hospedadoras que contienen construcciones de ADN de la proteína se cultivan en un medio de cultivo apropiado. Como se usa en este documento, la expresión "medio de cultivo apropiado" significa un medio que contiene nutrientes requeridos para el crecimiento de las células. Los nutrientes requeridos para el crecimiento de las células pueden incluir una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y factores de crecimiento. Opcionalmente, el medio puede contener uno o más factores de selección. Opcionalmente, el medio puede contener suero bovino de ternero o suero fetal de ternero (FCS). En una realización, el medio no contiene sustancialmente IgG. El medio de cultivo en general seleccionará células que contienen la construcción de ADN por, por ejemplo, selección con fármaco o deficiencia en un nutriente esencial que se complementa mediante el marcador de selección en la construcción de ADN o se cotransfecta con la construcción de ADN. Las células de mamífero cultivadas en general se cultivan en medios que contienen suero o sin suero disponibles en el mercado (por ejemplo, MEM, DMEM, DMEM/F12). En una realización, el medio es CD293 (Invitrogen, Carlsbad, CA.). En otra realización, el medio es CD17 (Invitrogen, Carlsbad, CA.). La selección de un medio apropiado para la línea celular particular usada pertenece al nivel de las habilidades habituales en la técnica.

Para coexpresar las dos cadenas polipeptídicas de la proteína quimérica, las células hospedadoras se cultivan en condiciones que permiten la expresión de ambas cadenas. Como se usa en este documento, cultivar se refiere a mantener células vivas *in vitro* durante al menos un tiempo definido. El mantenimiento puede incluir, pero no

necesariamente, un aumento en la población de células vivas. Por ejemplo, las células mantenidas en cultivo pueden ser de población estática, pero aún viables y con capacidad de producir un producto deseado, por ejemplo, una proteína recombinante o proteína de fusión recombinante. Las condiciones adecuadas para cultivar células eucarióticas son bien conocidas en la técnica e incluyen selección apropiada de medio de cultivo, complementos del medio, temperatura, pH, saturación de oxígeno y similares. Para propósitos comerciales, el cultivo puede incluir el uso de cualquiera de diversos tipos de sistemas que se pueden aumentar de escala incluyendo matraces de agitación, frascos rodantes, biorreactores de fibra hueca, biorreactores de depósito agitado, biorreactores suspendidos, biorreactores de ondas y otros.

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

También se divulga un método de expresión, preparación o producción de la proteína quimérica de la invención, que comprende a) transfectar una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica la proteína quimérica y b) cultivar la célula hospedadora en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para expresar la proteína quimérica, en la que se expresa la proteína quimérica.

El producto proteínico opcionalmente se secreta en el medio. El medio puede separarse de las células, concentrarse, filtrarse y después pasarse sobre dos o tres columnas de afinidad, por ejemplo, una columna de proteína A y una o dos columnas de intercambio aniónico.

En determinados aspectos, la presente invención se refiere a la proteína quimérica producida por los métodos descritos en este documento.

La producción *in vitro* permite el aumento de escala para dar grandes cantidades de los polipéptidos alterados deseados de la invención. Las técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de histocultivo son conocidas en la técnica e incluyen cultivo en suspensión homogéneo, por ejemplo, en un reactor suspendido o en un reactor de agitación continua, o cultivo de células inmovilizadas o atrapadas, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, en microesferas de agarosa o cartuchos cerámicos. Si es necesario y/o si se desea, las soluciones de polipéptidos pueden purificarse por los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía sobre DEAE-celulosa o cromatografía de afinidad.

IV. Composición farmacéutica

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

La composición farmacéutica puede formularse para administración parenteral (es decir, intravenosa, subcutánea o intramuscular) por inyección rápida. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma monodosis, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral también incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble, por ejemplo, sales hidrosolubles. Además, pueden administrarse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas de inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo o ésteres de ácido graso sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones acuosas de inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes. También pueden usarse liposomas para encapsular las moléculas de la invención para suministro en células o espacios intersticiales. Vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares son disolventes fisiológicamente compatibles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares. En algunas realizaciones, la composición comprende agentes isotónicos, por ejemplo, glúcidos, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. En otras realizaciones, las composiciones comprenden sustancias farmacéuticamente aceptables tales como agentes humectantes o cantidades mínimas de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o eficacia de los ingredientes activos.

Las composiciones de la invención pueden estar en una diversidad de formas, incluyendo, por ejemplo, líquido (por

ejemplo, soluciones inyectables y infundibles), dispersiones, suspensiones, formas farmacéuticas semisólidas y sólidas. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica.

5 La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración de fármaco elevada. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el ingrediente activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el ingrediente activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada a esterilidad. La fluidez apropiada de la solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

20 El ingrediente activo puede formularse con una formulación o dispositivo de liberación controlada. Ejemplos de dichas formulaciones y dispositivos incluyen implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, por ejemplo, acetato de etilvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Los métodos para la preparación de dichas formulaciones y dispositivos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

25 Las formulaciones inyectables de liberación lenta pueden prepararse formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la relación entre fármaco y polímero y de la naturaleza del polímero empleado, puede controlarse la tasa de liberación del fármaco. Otros polímeros biodegradables ejemplares son poliortoésteres y polianhídridos. Las formulaciones inyectables de liberación lenta también pueden prepararse atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones.

30 Pueden incorporarse compuestos activos complementarios a las composiciones. En una realización, la proteína quimérica de la invención se formula con otro factor de coagulación, o una variante, fragmento, análogo o derivado del mismo. Por ejemplo, el factor de coagulación incluye, aunque sin limitación, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, protrombina, fibrinógeno, factor de Von Willebrand o tromboplastina tisular soluble recombinante (rsTF) o formas activadas de cualquiera de los precedentes. El factor de coagulación del agente hemostático también puede incluir fármacos antifibrinolíticos, por ejemplo, ácido épsilon-aminocaproico, ácido tranexámico.

40 Las pautas posológicas pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima. Por ejemplo, puede administrarse una única inyección rápida, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o puede reducirse o incrementarse de forma proporcional la dosis según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta favorable formular composiciones parenterales en una forma monodosis para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, Pa. 1980).

45 Además del compuesto activo, la forma farmacéutica líquida puede contener ingredientes inertes tales como agua, alcohol etílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán.

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

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

65 Para administración bucal, la composición puede adoptar la forma de comprimidos o grageas de acuerdo con

protocolos convencionales.

Para administración por inhalación, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de un aerosol nebulizado con o sin excipientes o en forma de un pulverizador de aerosol desde un envase presurizado o nebulizador, opcionalmente con un propulsor, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador, que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

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

En una realización, la composición farmacéutica comprende la proteína quimérica, el polinucleótido que codifica la proteína quimérica, el vector que comprende el polinucleótido o la célula hospedadora que comprende el vector, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La proteína FVIII en una proteína quimérica tiene semivida prolongada en comparación con proteína FVIII de tipo silvestre o la proteína FVIII correspondiente sin el fragmento de VWF. En una realización, la semivida de la proteína quimérica se prolonga al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces o al menos aproximadamente 12 veces más que FVIII de tipo silvestre. En otra realización, la semivida del factor VIII es al menos aproximadamente 17 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 19 horas, al menos aproximadamente 20 horas, al menos aproximadamente 21 horas, al menos aproximadamente 22 horas, al menos aproximadamente 23 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 25 horas, al menos aproximadamente 26 horas, al menos aproximadamente 27 horas, al menos aproximadamente 28 horas, al menos aproximadamente 29 horas, al menos aproximadamente 30 horas, al menos aproximadamente 31 horas, al menos aproximadamente 32 horas, al menos aproximadamente 33 horas, al menos aproximadamente 34 horas, al menos aproximadamente 35 horas, al menos aproximadamente 36 horas, al menos aproximadamente 48 horas, al menos aproximadamente 60 horas, al menos aproximadamente 72 horas, al menos aproximadamente 84 horas, al menos aproximadamente 96 horas o al menos aproximadamente 108 horas.

En algunas realizaciones, la composición se administra mediante una vía seleccionada del grupo que consiste en administración tópica, administración intraocular, administración parenteral, administración intratecal, administración subdural y administración oral. La administración parenteral puede ser administración intravenosa o subcutánea.

En otras realizaciones, la composición es para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección hemorrágica en un sujeto que lo necesita. La enfermedad o afección hemorrágica se selecciona del grupo que consiste en un trastorno hemorrágico de coagulación, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia en músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo en la cabeza, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de hueso, sangrado en el sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, sangrado en la vaina del iliopsoas y cualquier combinación de los mismos. En otras realizaciones más, el sujeto se somete a cirugía programada. En otras realizaciones más, el tratamiento es profiláctico o a demanda.

V. Genoterapia

Una proteína quimérica de la misma de la invención puede producirse *in vivo* en un mamífero, por ejemplo, un paciente humano, usando una estrategia de genoterapia para el tratamiento de una enfermedad o trastorno hemorrágico seleccionado del grupo que consiste en un trastorno hemorrágico de coagulación, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia en músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo en la cabeza, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de hueso, sangrado en el sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal y sangrado en la vaina del iliopsoas, que sería terapéuticamente beneficioso. En este contexto, se excluye la alteración genética de las células de la línea germinal humana. Opcionalmente, la enfermedad o trastorno hemorrágico es hemofilia, tal como hemofilia A. Esto implica la administración de un ácido nucleico codificante de una proteína quimérica adecuada unido de forma funcional a secuencias adecuadas de control de la expresión. Estas secuencias pueden incorporarse en un vector vírico. Los vectores víricos adecuados para dicha genoterapia incluyen vectores adenovíricos, vectores lentivíricos, vectores baculovíricos, vectores de virus de Epstein Barr, vectores papovavíricos, vectores víricos variolovacunales, vectores de virus del herpes simple y vectores víricos adenoasociados (AAV). El vector vírico puede ser un vector vírico de replicación defectuosa. Opcionalmente, un vector adenovírico tiene una eliminación en su gen E1 o gen E3. Cuando se usa un vector adenovírico, el mamífero puede no estar expuesto a un ácido nucleico que codifica un gen marcador de selección. Opcionalmente, las secuencias se incorporan en un vector no vírico conocido por los expertos en la materia.

V. Métodos de uso de proteína quimérica

La presente invención proporciona la proteína quimérica descrita en este documento para su uso en la prevención o inhibición de la unión de VWF endógeno a una proteína FVIII.

La proteína quimérica de la invención puede usarse para prevenir o inhibir la interacción de FVIII con VWF endógeno bloqueando o protegiendo el sitio de unión a VWF en el FVIII de VWF endógeno y al mismo tiempo prolongando la semivida de la proteína quimérica usando la secuencia de XTEN en combinación con la región Fc, que también puede ser un prolongador de la semivida. También se divulga un método de construcción de una proteína FVIII que tiene semivida más larga que FVIII de tipo silvestre.

También se divulga el uso de una secuencia de XTEN y una región constante de Ig o una parte de la misma para mejorar la semivida de una proteína quimérica que comprende proteína FVIII y una proteína VWF, que evita o inhibe la interacción de VWF endógeno con una proteína FVIII. Una proteína FVIII ligada a una secuencia de XTEN (por ejemplo, FVIII(X)) y después unida a o asociada con una proteína VWF fusionada a un XTEN y una región constante de Ig o una parte de la misma se blindo o protege de la ruta de eliminación de VWF y, por tanto, tiene eliminación reducida en comparación con la proteína FVIII no unida a la proteína VWF. La proteína FVIII protegida, por tanto, tiene prolongación máxima de la semivida en comparación con una proteína FVIII no unida a o asociada con la secuencia de XTEN y la proteína VWF. La proteína FVIII asociada con o protegida por una proteína VWF y ligada a una secuencia de XTEN puede no eliminarse mediante un receptor de eliminación de VWF. Como alternativa, la proteína FVIII asociada con o protegida por una proteína VWF y ligada a una secuencia de XTEN puede eliminarse del sistema más lentamente que la proteína FVIII que no está asociada con o protegida por la proteína VWF y ligada a la secuencia de XTEN.

La proteína quimérica puede tener eliminación reducida de la circulación ya que el fragmento de VWF no contiene un sitio de unión al receptor de eliminación de VWF. El fragmento de VWF evita o inhibe la eliminación de FVIII unido a o asociado con el fragmento de VWF del sistema a través de la ruta de eliminación de VWF. Los fragmentos de VWF útiles para la presente invención también pueden proporcionar al menos una o más propiedades de protección de FVIII similares a VWF que se proporcionan mediante VWF endógeno. En determinadas realizaciones, la proteína VWF o la secuencia de XTEN también pueden enmascarar uno o más sitios de unión al receptor de eliminación de FVIII, evitando de ese modo la eliminación de FVIII mediante su propia ruta de eliminación.

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

También se divulga el aumento de la semivida de una proteína quimérica, que comprende administrar la proteína quimérica descrita en este documento a un sujeto que lo necesita. La semivida de FVIII no activado unido a o asociado con VWF de longitud completa es de aproximadamente 12 a 14 horas en plasma. En VWF de tipo 3, en el que no hay nada de VWF en circulación, la semivida de FVIII es solamente de aproximadamente seis horas, lo que da lugar a síntomas de hemofilia A de leve a moderada en dichos pacientes debido a concentraciones disminuidas de FVIII. La semivida de la proteína quimérica ligada a o asociada con el fragmento de VWF o la secuencia de XTEN de la presente invención puede aumentar al menos aproximadamente 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2,0 veces, 2,1 veces, 2,2 veces, 2,3 veces, 2,4 veces, 2,6 veces, 2,7 veces, 2,8 veces, 2,9 veces, 3,0 veces, 3,1 veces, 3,2 veces, 3,3 veces, 3,4 veces, 3,5 veces, 3,6 veces, 3,7 veces, 3,8 veces, 3,9 veces o 4,0 veces mayor que la semivida del FVIII no activado unido a o asociado con VWF de longitud completa.

En una realización, la proteína quimérica de la invención presenta una semivida al menos aproximadamente 2 veces, 2,5 veces, 3,0 veces, 3,5 veces, 4,0 veces, 4,5 veces, 5,0 veces, 5,5 veces, 6,0 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces mayor que una proteína quimérica correspondiente que comprende el mismo primer polipéptido y el segundo polipéptido sin la secuencia de XTEN o FVIII de tipo silvestre. En otra realización, la proteína quimérica presenta una semivida de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 veces, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 veces, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 veces, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 veces, de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 veces, de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 veces, de aproximadamente 35 a aproximadamente 45 veces mayor que una proteína quimérica correspondiente que comprende el mismo primer polipéptido y el segundo polipéptido sin la secuencia de XTEN o FVIII de tipo silvestre. En una realización específica, la semivida de la proteína quimérica de la invención aumenta al menos aproximadamente 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 veces mayor que la semivida del FVIII de tipo silvestre en un ratón con doble inactivación de FVIII y VWF.

En determinadas realizaciones, la proteína quimérica presenta una semivida de aproximadamente 40 horas en ratones.

En algunas realizaciones, la semivida de la proteína quimérica es más larga que la semivida de un FVIII asociado con VWF endógeno. En otras realizaciones, la semivida de la proteína quimérica es al menos aproximadamente 1,5 veces,

2 veces, 2,5 veces, 3,5 veces, 3,6 veces, 3,7 veces, 3,8 veces, 3,9 veces, 4,0 veces, 4,5 veces o 5,0 veces la semivida de FVIII de tipo silvestre o una proteína FVIII asociada con VWF endógeno.

5 En algunas realizaciones, como resultado de la invención, la semivida de la proteína quimérica está prolongada en comparación con una proteína FVIII sin la proteína VWF o FVIII de tipo silvestre. La semivida de la proteína quimérica de la invención es al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces o al menos aproximadamente 12 veces más larga que la semivida de una proteína quimérica sin la proteína o FVIII de tipo silvestre. En una realización, la semivida de FVIII es de aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 20 veces, de aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 15 veces, o de aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 10 veces más larga que la semivida de FVIII de tipo silvestre. En otra realización, la semivida del FVIII se prolonga de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 9 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 8 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 7 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 6 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 3 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 9 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 8 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 7 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 6 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 4 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 3 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 9 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 8 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 7 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 6 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 4 veces, de aproximadamente 4 veces a aproximadamente 6 veces, de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 7 veces o de aproximadamente 6 veces a aproximadamente 8 veces en comparación con FVIII de tipo silvestre o una proteína FVIII sin la proteína VWF. En otras realizaciones, la semivida de la proteína quimérica de la invención es al menos aproximadamente 17 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 19 horas, al menos aproximadamente 20 horas, al menos aproximadamente 21 horas, al menos aproximadamente 22 horas, al menos aproximadamente 23 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 25 horas, al menos aproximadamente 26 horas, al menos aproximadamente 27 horas, al menos aproximadamente 28 horas, al menos aproximadamente 29 horas, al menos aproximadamente 30 horas, al menos aproximadamente 31 horas, al menos aproximadamente 32 horas, al menos aproximadamente 33 horas, al menos aproximadamente 34 horas, al menos aproximadamente 35 horas, al menos aproximadamente 36 horas, al menos aproximadamente 40 horas, al menos aproximadamente 48 horas, al menos aproximadamente 60 horas, al menos aproximadamente 72 horas, al menos aproximadamente 84 horas, al menos aproximadamente 96 horas o al menos aproximadamente 108 horas. En otras realizaciones más, la semivida de la proteína quimérica de la invención es de aproximadamente 15 horas a aproximadamente dos semanas, de aproximadamente 16 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 17 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 18 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 19 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 20 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 21 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 22 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 23 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 23 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 36 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 48 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 60 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente seis días, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente cinco días, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente cuatro días, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente tres días o de aproximadamente 24 horas a aproximadamente dos días.

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

65 Además, la invención proporciona la proteína quimérica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno hemorrágico, que comprende administrar una cantidad eficaz de una proteína quimérica. La enfermedad o trastorno hemorrágico se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en un trastorno hemorrágico de

5 coagulación, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia en músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo en la cabeza, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de hueso, sangrado en el sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal y sangrado en la vaina del iliopsoas. La enfermedad o trastorno hemorrágico puede ser hemofilia A.

10 La proteína quimérica descrita en este documento, que evita o inhibe la interacción de la proteína FVIII con VWF endógeno preparada por la invención, tiene muchos usos, como reconocerán los expertos en la materia incluyendo, aunque sin limitación, tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno hemostático y tratamiento de un sujeto que necesita un agente hemostático general.

15 La parte de la proteína FVIII en la proteína quimérica trata o previene un trastorno hemostático sirviendo como cofactor al factor IX en una superficie fosfolipídica cargada negativamente, formando de ese modo un complejo de Xasa. La unión de factores de coagulación activados a una superficie fosfolipídica localiza este proceso en sitios de daño vascular. En una superficie fosfolipídica, el factor VIIIa aumenta la velocidad máxima de activación del factor X por el factor IXa, en aproximadamente 200 000 veces, dando lugar a la segunda gran explosión de generación de trombina.

20 La proteína quimérica de la invención puede usarse para tratar cualquier trastorno hemostático. Los trastornos hemostáticos que pueden tratarse por la administración de la proteína quimérica de la invención incluyen, aunque sin limitación, hemofilia A, así como deficiencias o anomalías estructurales relacionadas con el factor VIII. El trastorno hemostático es opcionalmente hemofilia A.

25 La proteína quimérica de la invención puede usarse profilácticamente para tratar a un sujeto con un trastorno hemostático. La proteína quimérica de la invención puede usarse para tratar un episodio hemorrágico agudo en un sujeto con un trastorno hemostático. El trastorno hemostático puede ser el resultado de un factor de coagulación defectuoso, por ejemplo, factor de Von Willebrand. El trastorno hemostático es opcionalmente un trastorno hereditario. Como alternativa, el trastorno hemostático es un trastorno adquirido. El trastorno adquirido puede ser el resultado de una enfermedad o afección secundaria subyacente. La afección no relacionada puede ser, como ejemplo, aunque sin limitación, cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, o embarazo. El trastorno adquirido puede ser el resultado de edad avanzada o de medicación para tratar un trastorno secundario subyacente (por ejemplo, quimioterapia para el cáncer).

30 La proteína quimérica de la invención también puede usarse para el tratamiento de un sujeto que no tiene un trastorno hemostático congénito, sino que tiene una enfermedad o afección secundaria que provoca adquirir un trastorno hemostático, por ejemplo, debido al desarrollo de un anticuerpo anti-FVIII o cirugía.

35 La proteína quimérica de la presente invención también puede usarse para la reducción de la inmunogenia de FVIII o inducción de menos inmunogenia contra FVIII, que comprende administrar una cantidad eficaz de las proteínas quiméricas descritas en este documento o los polinucleótidos que codifican las mismas.

40 El sujeto que necesita un agente hemostático general opcionalmente se está sometiendo, o se va a someter, a cirugía. La proteína quimérica de la invención puede administrarse antes, durante o después de cirugía como pauta profiláctica. La proteína quimérica de la invención puede administrarse antes, durante o después de cirugía para controlar un episodio hemorrágico agudo.

45 La proteína quimérica de la invención puede usarse para tratar a un sujeto que tiene un episodio hemorrágico agudo que no tiene un trastorno hemostático. El episodio hemorrágico agudo puede ser el resultado de traumatismo grave, por ejemplo, cirugía, un accidente de automóvil, herida, laceración, disparo de pistola o cualquier otro acontecimiento traumático que provoque hemorragia incontrolada. Ejemplos no limitantes de episodios hemorrágicos incluyen un trastorno hemorrágico de coagulación, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia en músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo en la cabeza, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de hueso, sangrado en el sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, sangrado en la vaina del iliopsoas y cualquier combinación de los mismos.

55 En aplicaciones profilácticas, se administra una o más composiciones que contienen la proteína quimérica de la invención o un cóctel de las mismas a un paciente que aún no tiene estado patológico para potenciar la resistencia del paciente o reducir los síntomas asociados con una enfermedad o trastorno. Dicha cantidad se define como "dosis eficaz profiláctica". En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta (por ejemplo, de aproximadamente 1 a 400 mg/kg de polipéptido por dosis, siendo dosificaciones de 5 a 25 mg más habitualmente usadas para radioinmunoconjugados y dosis mayores para polipéptidos modificados con citotoxina-fármaco) a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de ello, se puede administrar al paciente una pauta profiláctica.

65 La proteína quimérica o una composición de la invención puede usarse para tratamiento a demanda, que incluye tratamiento para un episodio hemorrágico, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia

5 en músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo en la cabeza (traumatismo craneal), sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de hueso, sangrado en el sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal o sangrado en la vaina del iliopsoas. El sujeto puede necesitar profilaxis quirúrgica, control perioperatorio o tratamiento para cirugía. Dichas cirugías incluyen, por ejemplo, cirugía menor, cirugía mayor, extracción de piezas dentales, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, sustitución total de la rodilla, craneotomía, osteosíntesis, cirugía traumatológica, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica o cirugía de sustitución de articulación.

10 La proteína quimérica de la presente invención puede administrarse por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular o mediante superficie mucosa, por ejemplo, por vía oral, sublingual, bucal, nasal, rectal, vaginal o mediante vía pulmonar. La proteína quimérica de la presente invención puede implantarse dentro de o ligarse a un soporte sólido biopolimérico que permite la liberación lenta de la proteína quimérica al sitio de hemorragia o implantarse en apósito/vendaje. La dosis de la proteína quimérica variará dependiendo del sujeto y de la vía particular de administración usada. Las dosificaciones pueden variar de 0,1 a 100 000 µg/kg de peso corporal o de 0,1-1000 µg/kg o de 0,1-500 µg/kg. La proteína puede administrarse de forma continua o a intervalos de tiempo específicos. Pueden emplearse ensayos *in vitro* para determinar intervalos y/o pautas óptimas de dosis para administración. Los ensayos *in vitro* que miden la actividad del factor de coagulación son conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayo de coagulación de VIIa-rTF STA-CLOT o ensayo de coagulación ROTEM. Además, las dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas de dosis-respuesta obtenidas de modelos animales, por ejemplo, un perro hemofílico (Mount *et al.* 2002, Blood 99(8):2670).

Habiendo descrito ahora la presente invención en detalle, la misma se comprenderá más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluye con la misma con propósitos de ilustración solamente y no pretenden ser limitantes de la invención.

25

Ejemplos

Durante todos los ejemplos, se usaron los siguientes materiales y métodos salvo que se indique de otro modo.

30 Materiales y métodos

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

40 Ejemplo 1: Heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc

La presente invención se refiere a generar una molécula de FVIII quimérica que se acopla al dominio D'D3 de la proteína de factor de Von Willebrand (VWF) mediante dominio Fc de IgG. El dominio D'D3 unido evita la interacción de FVIII con multímeros de VWF endógenos. Esta molécula sirve como plataforma para incorporar otras tecnologías de prolongación de la semivida para mejorar la farmacocinética de la proteína quimérica. Se incorporaron secuencias de XTEN en el dominio B de FVIII y entre D'D3 y la región Fc para aumentar la semivida del heterodímero de FVIII/VWF.

50 El sitio de escisión por trombina entre D'D3 y Fc permite la liberación del dominio D'D3 tras la activación de la molécula de FVIII por trombina.

Ejemplo 2: Construcción plasmídica de heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-Fc

Clonación de VWF050 - triple mutación IHH en VWF031

55 La triple mutación IHH en Fc evita la interacción con FcRn, por tanto, no hay reciclado de la molécula que contiene Fc mediante la ruta de FcRn. Las 3 mutaciones en Fc son I253A, H310A, H435A.

60 VWF050 se generó intercambiando la región Fc del plásmido VWF031 con el fragmento Fc que contiene la triple mutación IHH entre los sitios de restricción RsRII y Not 1. Clonación de VWF057 - clonación de VWF-Fc con XTEN AE144 + conector escindible por trombina de 35 aa.

Oligos

65 ESC 155 - Oligo para XTEN AE144 en VWF034-rev

ES 2 982 051 T3

CCCCGCCACCGGATCCCCGCCACCGGATCCCCGCCACCGGATCCCCGCCACCGGAACCTC
CACCGCCGCTCGAGGCACCTTCTTCAGTGTGGTGGGCGAGCCCCGCTGGTGACCCCTTCCTC

ESC 156 - Oligo para XTEN AE144-conector GS en VWF034-rev

5 GGGGAAGAGGAAGACTGACGGTCCGCCAGGAGTTCTGGAGCTGGGCACGGTGGGCATGTGT
GAGTTTTGTCGCCTCCGCTGCCCGGGGGACCAGGGATCCCCGCCACCGGATCCCCGCCAC
CGGATCCCCGCCACCGGATCCCCGCC

ESC 157 - Oligo para XTEN AE144 en VWF031-fwd

10 GTGAAGCCTGCCAGGAGCCGATATCGGGCGCGCCAACATCAGAGAGCGCCACCCCTGAAAGT
GGTCCCCGGGAGCGAGCCAGC

Se hizo PCR dos veces para obtener el XTEN AE144 + conector GS de 35 aa con sitio de escisión por trombina.

15 La primera reacción de PCR se hizo usando el ADN codificante de XTEN AE144 como molde y el par de cebadores
ESC 157/ESC 155. El producto de PCR de aproximadamente 550 pb de longitud obtenido de esta reacción se usó
como molde para la segunda reacción de PCR y se amplificó usando el par de cebadores ESC 157/156. Esta reacción
dio un producto de ~700 pb de longitud. Este producto de PCR de 700 pb y el plásmido VWF034 entonces se digirieron
con EcoRV-HF y RsRII. Se digirió la estructura del plásmido.

20 VWF034 entonces se usó para ligar el producto de PCR de 700 pb.

Clonación de VWF058 - triple mutación IHH en VWF034

25 La triple mutación IHH en Fc evita la interacción con FcRn, por tanto, no hay reciclado de la molécula que contiene Fc
mediante la ruta de FcRn. Las 3 mutaciones en Fc son I253A, H310A, H435A.

VWF058 se generó intercambiando la región Fc del plásmido VWF034 con el fragmento Fc que contiene la triple
mutación IHH entre los sitios de restricción RsRII y Not 1.

30 Clonación de FVIII-263 - FVIII 205 con triple mutación IHH

La triple mutación IHH en Fc evita la interacción con FcRn, por tanto, no hay reciclado de la molécula que contiene Fc
mediante la ruta de FcRn. Las 3 mutaciones en Fc son I253A, H310A, H435A.

35 FVIII-263 se generó intercambiando la región Fc del plásmido FVIII 205 con el fragmento Fc que contiene la triple
mutación IHH entre los sitios de restricción RsRII y Not 1.

Clonación de FVIII-282 - FVIII-Fc con XTEN AE144 en dominio B

40 ESC 158 - Oligo para XTEN AE144 en dominio B-fwd

AAGAAGCTTCTCTCAAAACGGCGCGCCAACATCAGAGAGCGCCACCCCTGAAAGTGGTCCCG
GGAGCGAGCCAGCCACATCTGGGTCCGAAACGCCAGGC

ESC 159 - Oligo para XTEN AR144 en dominio B-rev

45 GGTATCATCATAATCGATTTCCTCTTGATCTGACTGAAGAGTAGTACGAGTTATTTTCAGCTTGA
TGGCGTTTCAAGACTGGTGGGCTCGAGGCACCTTCTTCAGTGTGGTGGGCGAGCCCCGCTGGT
GACCTTCCTCAGTGGACGTAGG

50 La primera reacción de PCR se hizo usando el ADN codificante de XTEN AE144 como molde y el par de cebadores
ESC 158/ESC159. El producto de PCR de aproximadamente 550 pb de longitud obtenido de esta reacción y el
plásmido FVIII 169 entonces se digirieron con Ascl y Cla1. La estructura del plásmido de FVIII 169 digerido entonces
se usó para ligar el producto de PCR de 550 pb para obtener FVIII 282.

Clonación de FVIII-283 - FVIII 169 con triple mutación IHH

55 La triple mutación IHH en Fc evita la interacción con FcRn, por tanto, no hay reciclado de la molécula que contiene Fc
mediante la ruta de FcRn. Las 3 mutaciones en Fc son I253A, H310A, H435A.

FVIII-283 se generó intercambiando la región Fc del plásmido FVIII 169 con el fragmento Fc que contiene la triple
mutación IHH entre los sitios de restricción RsRII y Not 1.

Ejemplo 3: Producción de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc en células HEK293

Figura 2. Diagrama esquemático que muestra la expresión de la construcción FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc. Se realizó cotransfección de tres plásmidos en células HEK293 usando polietilenimina (PEI). El primer plásmido obtiene la expresión de FVIII-XTEN-Fc, el segundo plásmido expresa D1D2D'D3-XTEN-Fc y el tercer plásmido expresa PACE/furina, que es necesaria para eliminar enzimáticamente el propéptido, es decir, el dominio D1D2 de D1D2D'D3-XTEN-Fc. Los productos de este sistema de expresión de tres plásmidos incluyen el heterodímero de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc, el homodímero de D'D3-XTEN-Fc y restos de especies que parecen hemicióticas de FVIII-XTEN-Fc.

Ejemplo 4: Purificación de heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc

Para purificar los heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc, se usó una etapa de filtración en flujo tangencial (TFF) para concentrar en primer lugar el medio acondicionado en 10 veces. Los productos del filtrado entonces se purificaron más usando cromatografía de afinidad seguida de una columna de desalación. La pureza de la molécula fue aceptable por HPLC-SEC y se confirmó adicionalmente por inmunoelectrotransferencia. La actividad específica de la molécula fue comparable a FVIII con el dominio B eliminado, medida por ensayo de actividad de FVIII (ejemplo 5) y medición de DO280.

Ejemplo 5: Actividad específica de heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc

La actividad de heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc se midió por ensayo cromogénico de FVIII y ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). La actividad cromogénica específica y la actividad aPTT específica de FVIII BDD SQ, rFVIII169/VWF034 y rFVIII169/VWF057 se enumeró en la tabla 16. En comparación con FVIII BDD SQ, se han observado actividades cromogénicas específicas comparables y una reducción del 60 % en la actividad aPTT específica para rFVIII169/VWF034 y rFVIII169/VWF057.

Tabla 16: Actividad específica de variantes heterodiméricas

FVIII	FVIII BDD SQ	rFVIII169/VWF034	rFVIII160/VWF057
Actividad cromogénica específica (UI/pmol)	0,9-2,0	1,1-1,2	0,8-1,6
Actividad aPTT específica (UI/pmol)	0,75-1,7	0,4	0,3-0,6

Ensayos cromogénico de FVIII

La actividad de FVIII se midió usando el kit de FVIII COATEST SP de DiaPharma (producto n.º: K824086) y todas las incubaciones se realizaron en un calentador de placa de 37 °C con agitación.

El 8.º Modelo Internacional de la OMS para el Factor de Coagulación Sanguínea VIII:C, Concentrado, con código 07/350 se usó como patrón de ensayo, el intervalo del modelo fue de 100 mUI/ml a 0,78 mUI/ml. Se añadió un control de ensayo de plasma humano normal combinado y muestras de ensayo (diluidas con tampón 1X Coatest) en placas de 96 pocillos Immulon 2HB por duplicado (25 µl/pocillo). Se añadió mezcla de IXa/FX/fosfolípido recién preparada (50 µl), 25 µl de CaCl₂ 25 mM y 50 µl de sustrato de FXa secuencialmente en cada pocillo con 5 minutos de incubación 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 de DO405 con un instrumento SpectraMAX plus (Molecular Devices). Los datos se analizaron con el programa informático SoftMax Pro (versión 5.2). El nivel más bajo de cuantificación (LLOQ) es 7,8 mUI/ml.

Ensayo de aPTT de FVIII

El ensayo de aPTT de FVIII se realizó en el analizador de coagulación Sysmex CA-1500 como sigue: en primer lugar, se añadieron 50 ul de muestras diluidas manualmente, patrones y controles en tampón de aPTT (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, HSA al 1 %, pH 7,4) por el instrumento en la cubeta de reacción, seguido de la adición de 50 ul de plasma deficiente de FVIII (George King Bio-Medical, producto n.º: 0800). Después de incubación a 37 °C durante 1 minuto, se añadieron 50 ul de reactivo de aPTT (reactivo de cefaloplastina activada Actin® FSL - Dade Behring, referencia n.º B4219-2) a la mezcla de reacción, y se incubó a 37 °C durante 4 minutos. Posteriormente, se añadieron 50 ul de CaCl₂ 20 mM (Dade Behring, referencia n.º ORFO37), y la cubeta de reacción se transfirió inmediatamente a una de cuatro posiciones de canal del espectrofotómetro para medir la cantidad de luz refractada en la mezcla, que se convirtió al inicio de coagulación por el algoritmo del programa informático del instrumento. El tiempo de coagulación informado fue la cantidad de tiempo desde la adición de CaCl₂ hasta el inicio de la formación de coágulo. El patrón de ensayo se generó diluyendo el 8.º Modelo de FVIII Internacional de la OMS en un tampón de aPTT en un intervalo de 100 mUI/ml a 0,78 mUI/ml. La curva patrón se representó como el tiempo de coagulación (en segundos) como el eje de ordenadas frente al log (base 10) de la actividad de FVIII (mUI/ml) como el eje de abscisas en MS Excel, y la actividad de las muestras individuales se calculó usando la fórmula para la línea de regresión lineal de esta curva patrón. Basándose en el rendimiento del ensayo, el límite inferior de cuantificación (LLOQ) fue 7,8 mUI/ml.

Ejemplo 6: Efecto aditivo de inserciones de XTEN sobre la prolongación de la semivida del heterodímero

Se incorporaron inserciones de XTEN en los heterodímeros para la prolongación de la semivida. La inserción de un solo XTEN AE de 288 aminoácidos (aa) en el dominio B de FVIII provocó una semivida de 16,7 horas del heterodímero en ratones HemA, como se demuestra por rFVIII169/VWF031 en la figura 3. Para mejorar más la semivida del heterodímero, se incorporó una segunda inserción de XTEN de 144 aa o 288 aa de longitud en FVIII169/VWF031 en el dominio A1 de FVIII o inmediatamente posterior del fragmento D'D3 respectivamente, las variantes heterodiméricas se denominaron FVIII205/VWF031 y FVIII169/VWF034.

La semivida de rFVIII169/VWF031, rFVIII205/VWF031 y rFVIII169/VWF034 se evaluó en ratones deficientes de FVIII (HemA) mediante una sola administración intravenosa de moléculas de ensayo a dosis de 200 UI/kg. Se recogieron muestras de plasma en los momentos puntuales designados como se indica en la figura 3, se determinó la actividad de FVIII de las muestras por ensayo cromogénico de FVIII, se calcularon los parámetros PK usando el programa WinNonlin-Phoenix y se enumeraron en la tabla 17.

Como se muestra en la figura 3 y la tabla 17, la adición de la segunda inserción de XTEN en el dominio A1 de FVIII o posterior de D'D3 mejora más la semivida del heterodímero hasta 29,45 o 31,10 respectivamente. Además, también se observaron mejoras de más de 2 veces en la eliminación y ABC a partir de ambas inserciones de XTEN.

Tabla 17: Parámetro PK de heterodímeros en ratones HemA

FVIII	Inserciones de XTEN		T _{1/2} (h)	MRT (h)	Cl (ml/h/kg)	Vss (ml/kg)	ABC_D (kg*h/ml)
	Inserción 1	Inserción 2					
rFVIII169/VWF031	B*-AE288		16,65	18,44	3,57	85,72	0,28
rFVIII205/VWF031	B*-AE288	A1-AE144	29,45	36,02	1,76	63,56	0,57
rFVIII169/VWF034	B*-AE288	D'D3-AE288	31,10	34,57	1,73	59,77	0,58

Ejemplo 7: XTEN AE 144 aa confiere mejor beneficio de semivida que XTEN AE 288 aa cuando se inserta entre los dominios D'D3 y Fc.

Se construyó otro heterodímero, FVIII169/VWF057, en un esfuerzo por identificar la longitud óptima de la inserción de XTEN dentro de la cadena de D'D3-XTEN-Fc, en que la longitud de la inserción de XTEN se redujo hasta 144 aa desde 288 aa. Como se muestra en la figura 4, en comparación con rFVIII169/VWF034, la semivida de rFVIII169/VWF057 se aumentó de 31 h a 42 h. También se observó eliminación y ABC mejoradas para rFVIII169/VWF057, los datos se enumeran en la tabla 18. Por tanto, la inserción de XTEN AE 144 aa es más óptima que XTEN AE 288 aa cuando se inserta entre el dominio D'D3 y Fc de los heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc.

Tabla 18: Parámetros PK de rFVIII169/VWF034 y rFVIII169/VWF057 en ratones HemA

FVIII	T _{1/2} (h)	MRT (h)	Cl (ml/h/kg)	Vss (ml/kg)	ABC_D (kg*h/ml)
rFVIII169/VWF034	31,10	34,57	1,73	59,77	0,58
rFVIII169/VWF057	42,23	53,24	0,97	51,44	1,03

Ejemplo 8: El dominio Fc prolonga la semivida del heterodímero

Los dominios Fc prolongan la semivida de su proteína de fusión a través de la ruta de reciclado mediada por FcRn. Para confirmar la necesidad del dominio Fc en la prolongación de la semivida del heterodímero, los dominios Fc de tipo silvestre se remplazaron por un triple mutante (I253A/H310A/H435A; IHH) en rFVIII205/VWF031 para formar rFVIII263/VWF050, y se confirmó la eliminación completa de la unión a FcRn por ensayo de resonancia de plasmones superficiales (Biacore) para rFVIII263/VWF050. La semivida de FVIII263/VWF050 se evaluó en ratones HemA en comparación con rFVIII205/VWF031. Se observó tasa de eliminación aumentada, así como semivida y ABC reducidas para rFVIII263/VWF050 como se muestra en la figura 5 y la tabla 19. Este resultado demostró que, además de garantizar la unión covalente de FVIII y D'D3, los dominios Fc también son necesarios para la mejora de la semivida del heterodímero.

Tabla 19: Parámetros PK de rFVIII205/VWF031 y rFVIII263/VWF040 en ratones HemA

FVIII	Mutación en el dominio Fc	T _{1/2} (h)	MRT (h)	Cl (ml/h/kg)	V _{ss} (ml/kg)	ABC_D (kg ⁻¹ h/ml)
rFVIII205/VWF031	Ninguna	29,45	36,02	1,76	63,56	0,57
rFVIII263/VWF050	IHH	22,96	26,15	2,36	61,69	0,42

Ejemplo 9: Eficacia aguda de heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc en modelo de hemorragia por perforación de la cola de ratón HemA

La eficacia aguda de candidatos principales de heterodímero se evaluó usando modelo de hemorragia por perforación de la cola de ratón HemA.

Se asignaron aleatoriamente ratones macho HemA de 8-12 semanas de edad en 4 grupos de tratamiento, y se trataron con una sola administración intravenosa de FVIII BDD SQ, rFVIII169/VWF034, rFVIII169/VWF057 o solución de vehículo, respectivamente. Para imitar el tratamiento episódico de FVIII (para reconstituir un 50-100 % del nivel plasmático de FVIII normal), la dosis de tratamiento de FVIII seleccionada es 75 UI/kg medida por la actividad aPTT de FVIII. A este nivel de dosis, todas las variantes de FVIII de ensayo reconstituirán -70 % de la actividad de FVIII plasmático murino normal 5 min después de la dosificación.

Se representó el volumen de pérdida de sangre de cada animal individual en el estudio en la figura 6. Se observó reducción significativa en el volumen de pérdida de sangre para todos los grupos de tratamiento de FVIII en comparación con animales tratados con vehículo. Dentro de los tres grupos de tratamiento de FVIII, no se encontró diferencia estadística significativa en la reducción de pérdida de sangre, lo que sugiere que las moléculas heterodiméricas podría ser posiblemente tan eficaces como FVIII BDD SQ para tratamiento a demanda.

Se representó el volumen de pérdida de sangre de cada animal individual en el estudio en la figura 6. Se observó reducción significativa en el volumen de pérdida de sangre para todos los grupos de tratamiento de FVIII en comparación con animales tratados con vehículo. Dentro de los tres grupos de tratamiento de FVIII, no se encontró diferencia estadística significativa en la reducción de pérdida de sangre, lo que sugiere que las moléculas heterodiméricas podría ser posiblemente tan eficaces como FVIII BDD SQ para tratamiento a demanda.

Además, los ratones HemA se trataron con una dosis inferior (37,5 UI/kg) de rBDD-FVIII o rFVIII169/VWF034, y los resultados se muestran en la figura 6B. Igual que la dosis de 75 UI/kg, rFVIII169/VWF034 proporcionó protección similar a FVIII BDD a los ratones HemA tras la lesión por perforación de la cola, lo que indica que la molécula aún era eficaz para tratar episodios hemorrágicos graves a -35 % del nivel murino de FVIII en circulación normal en ratones HemA.

El procedimiento de perforación de la cola se realizó como sigue. En resumen, los ratones se anestesiaron con a 50 mg/kg de ketamina/0,5 mg/kg de cóctel de dexmedetomidina antes de la lesión en la cola y se situaron en una almohadilla de calentamiento a 37 °C para ayudar a mantener la temperatura corporal. Las colas de los ratones entonces se sumergieron en solución salina a 37 °C durante 10 minutos para dilatar la vena lateral. Después de la dilatación de la vena, se inyectaron variantes de FVIII o solución de vehículo mediante la vena de la cola y entonces se amputaron 5 mm distales de la cola usando un bisturí con borde recto n.º 11 a los 5 min después de la dosificación. Se recogió la sangre derramada en 13 ml de solución salina a 37 °C durante 30 minutos y se determinó el volumen de pérdida de sangre mediante el cambio de peso del tubo de recogida de sangre: volumen de pérdida de sangre = (peso final de tubo de recogida - peso inicial + 0,10) ml. Se realizó análisis estadístico usando ensayo de la *t* (ensayo de Mann Whitney) y ANOVA unidireccional (ensayo de KRUSKAL-Wallis, ensayo posterior: ensayo de comparación múltiples de Dunns).

Ejemplo 10: Eficacia profiláctica de heterodímero de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc en modelo de hemorragia por corte transversal de la vena de la cola de ratón HemA

La eficacia profiláctica de FVIII169/VWF057 se ensayó en modelo de corte transversal de la vena de la cola (TVT) de ratón HemA. El modelo de TVT induce hemorragia introduciendo lesión a la vena lateral de la cola del ratón, que imita los episodios hemorrágicos espontáneos en pacientes con trastorno hemorrágico de hemofilia.

Se asignaron aleatoriamente ratones macho HemA de 8-10 semanas de edad en cuatro grupos de tratamiento, y se trataron con FVIII169/VWF057 a las 72 h antes de la lesión en la vena de la cola, o FVIII BDD SQ a las 24 h o 48 h antes de la lesión. Se usó animal tratado con vehículo como control negativo. Los acontecimientos de hemorragia recurrente o eutanasia debida a la pérdida excesiva de sangre en 24 h después de la lesión se representaron en la figura 7.

Como se muestra en la figura 7, a diferencia de los ratones tratados con FVIII BDD SQ a las 48 h antes de TVT, de los que se observó solamente protección limitada después de la lesión, los ratones que recibieron rFVIII169/VWF057 a las 72 h antes de la lesión en la cola tuvieron protección similar sobre hemorragia recurrente y supervivencia en

comparación con los ratones que recibieron tratamiento con FVIII BDD SQ 24 h antes de TVT, lo que indica que rFVIII169/VWF057 puede proporcionar protección al menos 3 veces o más (por ejemplo, 4 veces) más larga a ratones HemA en modelo TVT. Por lo tanto, rFVIII169/VWF057 podría reducir significativamente la frecuencia de tratamiento de la profilaxis de FVIII actual.

Asimismo, los ratones HemA se trataron con heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc: rFVIII169/VWF034 y rFVIII169/VWF057, a las 24 o 96 horas antes de la lesión en la vena de la cola. Los datos de hemorragia recurrente y supervivencia de los tratamientos se compararon con los datos de rBDD-FVIII a las 24 o 48 horas antes de la lesión y vehículo. Aunque la hemorragia recurrente en ratones tratados con rBDD-FVIII a las 24 horas antes de la lesión en la vena de la cola fue similar a los ratones tratados con vehículo, los datos de hemorragia recurrente de ratones tratados con los heterodímeros a las 24 h antes de la lesión son significativamente mejores que el grupo de tratamiento con vehículo. Además, los datos de hemorragia recurrente de ratones tratados con los heterodímeros a las 96 h antes de la lesión fueron comparables a ratones que recibieron rBDD-FVIII a las 24 h antes de la lesión. En cuanto a la tasa de supervivencia a las 24 h después de la lesión TVT, en contraste con la tasa de supervivencia de menos de un 50 % de ratones tratados con rBDD-FVIII, más de un 90 % de los ratones sobrevivieron a la lesión TVT con tratamiento con heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc cuando las moléculas de FVIII se administraban a las 24 h antes de la lesión. Además, la supervivencia en ratones tratados con los heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc a las 96 horas antes de la lesión en la vena de la cola fue mejor (en el caso de rFVIII169/VWF034) o comparable (en el caso de rFVIII169/VWF057) en comparación con los ratones que recibieron tratamiento con rBDD-FVIII a las 24 horas antes de la lesión. Tanto los datos de hemorragia recurrente como los de supervivencia habían indicado una prolongación de la eficacia de 4 veces del tratamiento con heterodímero de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc frente a tratamiento con rBDD-FVIII.

Modelo de corte transversal de la vena de la cola de ratón HemA

El procedimiento de corte transversal de la vena de la cola se realizó como sigue. Los ratones se anestesiaron con un cóctel que contenía 50 mg/kg de ketamina, 0,125 mg/kg de dexmedetomidina y 0,1 mg/kg de Buprenex. A una profundidad anestésica adecuada, la vena de la cola lateral de los ratones se cortó transversalmente con hoja de bisturí de borde recto número 11 en una zona donde el diámetro de la cola es aproximadamente 2,7 mm. La sangre derramada se eliminó por lavado con solución salina caliente para garantizar la observación clara de la herida. Los ratones tratados entonces se alojaron individualmente en una jaula limpia con lecho de papel blando durante las siguientes 24 horas. Se observó la hemorragia recurrente de la cola y la actividad física del ratón y se registró cada hora hasta 12 horas después de la lesión en la cola. Los ratones moribundos se sacrificaron inmediatamente, y se realizó una observación final a las 24 horas después de la lesión en la cola. Para imitar la situación hemorrágica en pacientes con hemofilia y para garantizar la recuperación completa del animal de la anestesia, se administró 1 mg/kg de solución de atipamezol para invertir el efecto de dexmedetomidina al inicio del corte transversal de la vena de la cola. Se administró una dosis adicional de 0,1 mg/kg de Buprenex al final del periodo de observación de 12 horas durante control del dolor por la noche. La curva de supervivencia del tiempo hasta hemorragia recurrente y tiempo hasta eutanasia se generó para el análisis de los datos, y se usó ensayo del orden logarítmico (Mantel-COX) para evaluación estadística.

Ejemplo 11: Preparación de FVIII169/VWF059 y otras construcciones

Clonación de pSYN FVIII 310:

Se preparó comercialmente un fragmento de ADN sintético flanqueado con sitio BamH1 en el extremo N y sitio Cla 1 en el extremo C. Este ADN sintético se usó para reemplazar la región de BamH1 a Cla1 en la construcción pSYN FVIII 169 (SEQ ID NO: 155). Tanto el ADN sintético como el ADN de pSYN FVIII 169 se digirieron doblemente con BamH1 y Cla1, el ADN sintético digerido se insertó en pSYN FVIII 169 digerido para crear pSYN FVIII 310 (SEQ ID NO:168; tabla 20).

Clonación de pSYN FVIII 312:

Se preparó comercialmente un fragmento de ADN sintético flanqueado con sitio BamH1 en el extremo N y sitio Afe 1 en el extremo C. Este ADN sintético se usó para reemplazar la región de BamH1 a Afe1 en la construcción pSYN FVIII 169 (SEQ ID NO: 155). Tanto el ADN sintético como el ADN de pSYN FVIII 169 se digirieron doblemente con BamH1 y Afe1, el ADN sintético digerido se insertó en pSYN FVIII 169 digerido para crear pSYN FVIII 312 (SEQ ID NO: 169; tabla 20). pSYN FVIII 312A (SEQ ID NO: 2; tabla 20) se creó a partir de pSYN FVIII312 para retirar el sitio Ascl que codifica los residuos aminoácidos GAP en la unión de FVIII y XTEN.

Tabla 20: Construcciones de FVIII sintéticas.

Construcción	Secuencia proteínica
pSYN FVIII 169	<u>PRSFQNGAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS</u> <u>ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP</u> <u>ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS</u> <u>PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT</u> <u>SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG</u> <u>TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSPPVLKRHQAEITR</u> (SEQ ID NO: 167) (Subrayado = residuos de XTEN; no subrayado = residuos de FVIII)
pSYN FVIII 310	<u>PRSGAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP</u> <u>GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG</u> <u>GSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT</u> <u>SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS</u> <u>ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSE</u> <u>SATPESGPGTSTEPSEGSAPASSEITR</u> (SEQ ID NO: 168) (Subrayado = residuos de XTEN; no subrayado = residuos de FVIII)
pSYN FVIII 312	<u>PRSFQNGAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS</u> <u>ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP</u> <u>ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS</u> <u>PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT</u> <u>SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG</u> <u>TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSEITR</u> (SEQ ID NO: 169) (Subrayado = residuos de XTEN; no subrayado = residuos de FVIII)
pSYN FVIII 312A	<u>PRSFQNGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP</u> <u>GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG</u> <u>GSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT</u> <u>SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS</u> <u>ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSE</u> <u>SATPESGPGTSTEPSEGSAPASSEITR</u> (SEQ ID NO: 2) (Secuencia similar a pSYN FVIII312 salvo los residuos correspondientes al sitio Ascl, es decir, GAP, se retiran) (Subrayado = residuos de XTEN; no subrayado = residuos de FVIII)

Clonación de pSYN VWF059 y VWF073:

5 Se prepararon diversos fragmentos de ADN sintéticos que codifican diferentes regiones conectoras entre D'D3-XTEN y Fc. Estos fragmentos de ADN sintéticos se flanquearon con sitio Asc1 en el extremo N y sitio Not 1 en el extremo C. Estos ADN sintéticos se usaron para remplazar la región de Asc1 a Not1 en la construcción pSYN VWF057 (SEQ ID NO: 152). La construcción pSYN VWF059 (tabla 21) comprende una región conectora (SEQ ID NO: 13), que incluye
10 la región ácida 2 (a2) de FVIII completa. Se informa de que este sitio se escinde por trombina, y tras la activación de FVIII se libera D'D3XTEN. La construcción pSYN VWF073 (tabla 21) contiene solamente el sitio de escisión por trombina de la región ácida 2 (a2) de FVIII (es decir, IEPRFS) (SEQ ID NO: 23). Tanto el ADN sintético como el ADN de pSYN VWF057 se digirieron doblemente con Asc1 y Not1. El ADN sintético digerido se insertó en pSYN VWF057 digerido para crear pSYN VWF059 y pSYN VWF073. La construcción pSYN VWF59A (tabla 21) se generó a partir de
15 pSYN VWF059 eliminando el sitio de restricción EcoRV. Se generaron proteínas heterodiméricas de FVIII169/VWF057 y FVIII169/VWF059 por coexpresión de FVIII169 y VWF057 o VWF059 en células HEK293.

Tabla 21: Construcciones de VWF sintéticas - regiones conectoras escindibles.

Construcción	Secuencia proteínica
pSYN VWF057	<p>TSTEEGASSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLVPRGSGGD KTH (SEQ ID NO: 12)</p> <p>La secuencia en cursiva y subrayada muestra el conector GS y el sitio de escisión por trombina LVPR (también está sombreado).</p>
pSYN VWF059	<p>TSTEEGASISDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSDKTH (SEQ ID NO: 13)</p> <p>La secuencia en cursiva y subrayada muestra 32 aa de la región ácida 2 (a2) de FVIII. La secuencia sombreada muestra el sitio de escisión por trombina usado en pSYN VWF059A.</p>
pSYN VWF059A	<p>TSTEEGASSDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSDKTH (SEQ ID NO: 22)</p> <p>La secuencia en cursiva y subrayada muestra 32 aa de la región ácida 2 (a2) de FVIII. Esta secuencia es similar a la secuencia para VWF059, excepto que los residuos correspondientes al sitio EcoRV (es decir, IS) se retiran.</p>
pSYN VWF073	<p>TSTEEGASSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIIEPRSFSGGGDKTH (SEQ ID NO: 23)</p> <p>La secuencia en cursiva y subrayada muestra el conector GS con el sitio de escisión por trombina truncado de la región ácida 2 de FVIII (7 aminoácidos sombreados-IEPRSF).</p>

Ejemplo 12: Digestión con trombina de heterodímero de FVIII para analizar la liberación de D'D3 de Fc

5 Se ensayaron dos proteínas heterodiméricas de FVIII en experimentos de digestión con trombina y se examinó su tasa de escisión por trombina. Las dos construcciones heterodiméricas usadas en este experimento fueron el heterodímero de FVIII169/VWF057 y el heterodímero de FVIII169/VWF059 junto con FVIIIc. Los heterodímeros de FVIII169/VWF057 y FVIII169/VWF059 se describen anteriormente. Se realizaron tres reacciones de digestión: i) FVIIIc, ii) FVIII169/VWF057 (figura 11) y iii) FVIII 169/VWF059 (figura 12). Las muestras de ensayo se trataron con α -trombina humana a una relación molar de FVIII:trombina de aproximadamente 22:1. Cada reacción se incubó en un baño de agua a 37 °C. A cada punto temporal indicado (t = 5, 15, 30, 45, 60 minutos), se extrajo una muestra de 22,5 μ l, se detuvo con 22,5 μ l de tinte de carga de SDS 2x no reductor, y se calentó durante 3 minutos. La proteína digerida entonces se procesó en un gel de SDS-PAGE. Se realizó inmunoelectrotransferencia usando anticuerpos anticadena pesada de FVIII (GMA012) y anti-VWF-D3 (Ab96340) usando un sistema LICOR.

Como se muestra en la figura 11, la exposición de FVIII169/VWF057 a trombina provocó una disminución gradual en el nivel detectado de D'D3-XTEN-Fc, que se correlaciona con un aumento en el nivel de D'D3-144 XTEN, el producto escindido. FVIII169/VWF057 sin escindir permaneció después de 15 minutos. A la inversa, la figura 12 muestra que FVIII 169/VWF059 se escinde más rápidamente por trombina, como se evidencia por el poco a ningún FVIII 169/VWF059 sin escindir detectable después de 5 minutos. Por consiguiente, FVIII 169/VWF059 mostró mejor liberación de D'D3 de Fc tras la activación con trombina en comparación con FVIII169/VWF057.

Se hicieron experimentos paralelos para investigar la escisión con trombina usando espectroscopia de masas (EM). Por EM, FVIII 169/VWF059 de nuevo mostró mejor liberación de D'D3 de Fc en comparación con VWF057.

Ejemplo 13: Evaluación *in vivo* de FVIII169/VWF059 en ratones HemaA

Para evaluar adicionalmente el perfil farmacocinético y la potencia *in vivo* de FVIII169/VWF059, los ratones HemaA se trataron con FVIII169/VWF059 a través de administración intravenosa a dosis de 150 UI/kg. Se recogieron muestras de plasma mediante recogida de sangre de la vena cava a los 5 minutos, 24, 48, 72, 96 y 120 horas tras la inyección. La actividad de FVIII en muestras de plasma se midió por ensayos cromogénico de FVIII y los parámetros PK se calcularon usando el programa Phoenix. Se observó un perfil PK similar de FVIII169/VWF059 en comparación con FVIII169/VWF057, como se muestra en la tabla 22, lo que indica que el conector de escisión por trombina a2 no tiene efecto negativo sobre el perfil PK del heterodímero.

Tabla 22: Perfil PK de FVIII169/VWF057 y FVIII169/VWF059 en ratones HemaA

Heterodímero	T _{1/2} (h)	ABC/D (h*kg*mUI/ml/mUI)	Cl (ml/h/kg)	MRT (h)	Vss (ml/kg)
FVIII169/VWF057	38,53	0,80	1,26	44,92	56,38
FVIII169/VWF059	40,51	0,74	1,35	49,22	66,26

La eficacia aguda de FVIII169/VWF059 se evaluó en un modelo de perforación de la cola de ratón HemaA (descrito en el ejemplo 9) en comparación con FVIII BDD de tipo silvestre. Los ratones HemaA se trataron con 75 UI/kg de FVIII169/VWF059 o FVIII BDD, y se representó el volumen de pérdida de sangre de cada ratón experimental en la figura 13. En comparación con FVIII BDD, FVIII169/VWF059 proporcionó el mismo grado de protección a ratones HemaA ($p = 0,9883$), lo que indica que FVIII169/VWF059 es completamente funcional *in vivo*.

Construcción plasmídica de heterodímeros de FVIII-XTEN-Fc/D'D3-Fc

Secuencia de nucleótidos de VWF031 (SEQ ID NO: 147)

5

```

1   ATGAT TCCTG CCAGA TTTGC CGGGG TGCTG CTTGC TCTGG CCCTC ATTTT
51  GCCAG GGACC CTTTG TGCAG AAGGA ACTCG CGGCA GGTC A TCCAC GGCCC

101  GATGC AGCCT TTTCG GAAGT GACTT CGTCA ACACC TTTGA TGGGA GCATG
151  TACAG CTTTTG CGGGA TACTG CAGTT ACCTC CTGGC AGGGG GCTGC CAGAA
201  ACGCT CCTTC TCGAT TATTG GGGAC TTCCA GAATG GCAAG AGAGT GAGCC
251  TCTCC GTGTA TCTTG GGGAA TTTT T GACA TCCAT TTGTT TGTC A ATGGT
301  ACCGT GACAC AGGGG GACCA AAGAG TCTCC ATGCC CTATG CCTCC AAAGG
351  GCTGT ATCTA GAAAC TGAGG CTGGG TACTA CAAGC TGTCC GGTTGA GGCCT
401  ATGGC TTTGT GGCCA GGATC GATGG CAGCG GCAAC TTTCA AGTCC TGCTG
451  TCAGA CAGAT ACTTC AACAA GACCT GCGGG CTGTG TGGCA ACTTT AACAT
501  CTTTG CTGAA GATGA CTTTA TGACC CAAGA AGGGA CCTTG ACCTC GGACC
551  CTTAT GACTT TGCCA ACTCA TGGGC TCTGA GCAGT GGAGA ACAGT GGTGT
601  GAACG GGCAT CTCCT CCCAG CAGCT CATGC AACAT CTCCT CTGGG GAAAT
651  GCAGA AGGGC CTGTG GGAGC AGTGC CAGCT TCTGA AGAGC ACCTC GGTGT
701  TTGCC CGCTG CCACC CTCTG GTGGA CCCCC AGCCT TTTGT GGCCC TGTGT
751  GAGAA GACTT TGTGT GAGTG TGCTG GGGGG CTGGA GTGCG CCTGC CCTGC
801  CCTCC TGGAG TACGC CCGGA CCTGT GCCCA GGAGG GAATG GTGCT GTACG
851  GCTGG ACCGA CCACA GCGCG TGCAG CCCAG TGTGC CCTGC TGGTA TGGAG
901  TATAG GCAGT GTGTG TCCCC TTGCG CCAGG ACCTG CCAGA GCCTG CACAT
951  CAATG AATG TGTCA GGAGC GATGC GTGGA TGGCT GCAGC TGCCC TGAGG
1001 GACAG CTCCT GGATG AAGGC CTCTG CGTGG AGAGC ACCGA GTGTC CCTGC
1051 GTGCA TTCCG GAAAG CGCTA CCCTC CCGGC ACCTC CCTCT CTCGA GACTG
1101 CAACA CCTGC ATTTG CCGAA ACAGC CAGTG GATCT GCAGC AATGA AGAAT
1151 GTCCA GGGGA GTGCC TTGTC ACTGG TCAAT CCCAC TTCAA GAGCT TTGAC
1201 AACAG ATACT TCACC TTCAG TGGGA TCTGC CAGTA CCTGC TGGCC CGGGA
1251 TTGCC AGGAC CACTC CTCTT CCATT GTCAT TGAGA CTGTC CAGTG TGCTG
1301 ATGAC CGCGA CGCTG TGTGC ACCCG CTCCG TCACC GTCCG GCTGC CTGGC
1351 CTGCA CAACA GCCTT GTGAA ACTGA AGCAT GGGGC AGGAG TTGCC ATGGA
1401 TGGCC AGGAC ATCCA GCTCC CCCTC CTGAA AGGTG ACCTC CGCAT CCAGC
1451 ATACA GTGAC GGCC T CCGTG CGCCT CAGCT ACGGG GAGGA CCTGC AGATG
1501 GACTG GGATG GCCGC GGGAG GCTGC TGGTG AAGCT GTCCC CCGTC TATGC
1551 CGGGA AGACC TGCCG CCTGT GTGGG AATTA CAATG GCAAC CAGGG CGACC
1601 ACTTC CTTAC CCCCT CTGGG CTGGC GGAGC CCGGG GTGGA GGA CT TCGGG
1651 AACGC CTGGA AGCTG CACGG GGACT GCCAG GACCT GCAGA AGCAG CACAG
1701 CGATC CCTGC GCCCT CAACC CGCGC ATGAC CAGGT TCTCC GAGGA GGCCT
1751 GCGCG CTCCT GACGT CCCCC ACATT CGAGG CCTGC CATCG TGCCG TCAGC
1801 CCGCT GCCCT ACCTG CCGAA CTGCC GCTAC GACGT GTGCT CCTGC TCGGA
1851 CGGCC GCGAG TGCCT GTGCG GCGCC CTGGC CAGCT ATGCC GCGGC CTGCC
1901 CGGGG AGAGG CGTGC GCGTC GCGTG GCGCG AGCCA GGCCG CTGTG AGCTG
1951 AACTG CCCGA AAGGC CAGGT GTACC TGCAG TGCGG GACCC CCTGC AACCT
2001 GACCT CCGCG TCTCT CTCTT ACCCG GATGA GGAAT GCAAT GAGGC CTGCC
2051 TGGAG GGCTG TTTCT GCCCC CCAGG GCTCT ACATG GATGA GAGGG GGGAC
2101 TGCGT GCCCA AGGCC CAGTG CCCCT GTTAC TATGA CGGTG AGATC TTCCA
2151 GCCAG AAGAC ATCTT CTCAG ACCAT CACAC CATGT GCTAC TGTGA GGATG
2201 GCTTC ATGCA CTGTA CCATG AGTGG AGTCC CCGGA AGCTT GCTGC CTGAC
2251 GCTGT CCTCA GCAGT CCCCT GTCTC ATCGC AGCAA AAGGA GCCTA TCCTG
2301 TCGGC CCCCC ATGGT CAAGC TGGTG TGTCC CGCTG ACAAC CTGCG GGCTG
2351 AAGGG CTCGA GTGTA CCAAA ACGTG CCAGA ACTAT GACCT GGAGT GCATG
2401 AGCAT GGGCT GTGTC TCTGG CTGCC TCTGC CCCCC GGGCA TGGTC CGGCA
2451 TGAGA ACAGA TGTGT GGCCC TGGAA AGGTG TCCCT GCTTC CATCA GGGCA
2501 AGGAG TATGC CCCTG GAGAA ACAGT GAAGA TTGGC TGCAA CACTT GTGTC
2551 TGTCC GGACC GGAAG TGGAA CTGCA CAGAC CATGT GTGTG ATGCC ACGTG
2601 CTCCA CGATC GGCAT GGCCC ACTAC CTCAC CTTCG ACGGG CTCAA ATACC
2651 TGTTT CCGGG GGAGT GCCAG TACGT TCTGG TGCAG GATTA CTGCG GCAGT
2701 AACCC TGGGA CCTTT CGGAT CCTAG TGGGG AATAA GGGAT GCAGC CACCC
2751 CTCAG TGAAA TGCAA GAAAC GGGTC ACCAT CCTGG TGGAG GGAGG AGAGA
2801 TTGAG CTGTT TGACG GGGAG GTGAA TGTGA AGAGG CCCAT GAAGG ATGAG
2851 ACTCA CTTTTG AGGTG GTGGA GTCTG GCCGG TACAT CATT C TGCTG CTGGG
2901 CAAAG CCCTC FCCGT GGTCT GGGAC CGCCA CCTGA GCATC TCCGT GGTCC
2951 TGAAG CAGAC ATACC AGGAG AAAGT GTGTG GCCTG TGTGG GAATT TTGAT
3001 GGCAT CCAGA ACAAT GACCT CACCA GCAGC AACCT CCAAG TGGAG GAAGA
    
```

ES 2 982 051 T3

3051 CCCTG TGGAC TTTGG GAACT CCTGG AAAGT GAGCT CGCAG TGTGC TGACA
 3101 CCAGA AAAGT GCCTC TGGAC TCATC CCCTG CCACC TGCCA TAACA ACATC
 3151 ATGAA GCAGA CGATG GTGGA TTCCT CCTGT AGAAT CCTTA CCAGT GACGT
 3201 CTTCC AGGAC TGCAA CAAGC TGGTG GACCC CGAGC CATAT CTGGA TGTCT
 3251 GCATT TACGA CACCT GCTCC TGTGA GTCCA TPGGG GACTG CGCCG CATTC
 3301 TGCGA CACCA TTGCT GCCTA TGCCC ACGTG TGTGC CCAGC ATGGC AAGGT
 3351 GGTGA CCTGG AGGAC GGCCA CATTG TGCCC CCAGA GCTGC GAGGA GAGGA
 3401 ATCTC CGGGA GAACG GGTAT GAGGC TGAGT GGCGC TATAA CAGCT GTGCA
 3451 CCTGC CTGTC AAGTC ACGTG TCAGC ACCCT GAGCC ACTGG CCTGC CCTGT
 3501 GCAGT GTGTG GAGGC CTGCC ATGCC CACTG CCCTC CAGGG AAAAT CCTGG
 3551 ATGAG CTTTT GCAGA CCTGC GTTGA CCCTG AAGAC TGTCC AGTGT GTGAG
 3601 GTGGC TGGCC GGCCT TTTGC CTCAG GAAAG AAAGT CACCT TGAAT CCCAG
 3651 TGACC CTGAG CACTG CCAGA TTTGC CACTG TGATG TTGTC AACCT CACCT
 3701 GTGAA GCCTG CCAGG AGCCG ATATC TGGCG GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG
 3751 GGATC CGGCG GTGGA GGTTC CCGCG GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG GGATC
 3801 CGGTG GCGGG GGATC CCTGG TCCCC CCGGG CAGCG GCGGT GGAGG TTCCG
 3851 GTGGC GGGGG ATCCG ACAA ACTCA CACAT GCCCA CCGTG CCCAG CTCCA
 3901 GAACT CCTGG GCGGA CCGTC AGTCT TCCTC TTCCC CCCAA AACCC AAGGA
 3951 CACCC TCATG ATCTC CCGGA CCCCT GAGGT CACAT GCGTG GTGGT GGACG
 4001 TGAGC CACGA AGACC CTGAG GTCAA GTTCA ACTGG TACGT GGACG GCGTG
 4051 GAGGT GCATA ATGCC AAGC AAAGC CGCGG GAGGA GCAGT ACAAC AGCAC
 4101 GTACC GTGTG GTCAG CGTCC TCACC GTCCCT GCACC AGGAC TGGCT GAATG
 4151 GCAAG GAGTA CAAGT GCAAG GTCTC CAACA AAGCC CTCCC AGCCC CCATC
 4201 GAGAA AACCA TCTCC AAAGC CAAAG GGCAG CCCCC AGAAC CACAG GTGTA
 4251 CACCC TGCCC CCATC CCGCG ATGAG CTGAC CAAGA ACCAG GTCAG CCTGA
 4301 CCTGC CTGGT CAAAG GCTTC TATCC CAGCG ACATC GCCGT GGAGT GGGAG
 4351 AGCAA TGGGG AGCCG GAGAA CAACT ACAAG ACCAC GCCTC CCGTG TTGGA
 4401 CTCCG ACGGC TCCTT CTTC TCTAC AGCAA GCTCA CCGTG GACAA GAGCA
 4451 GGTGG CAGCA GGGGA ACGTC TTCTC ATGCT CCGTG ATGCA TGAGG CTCTG
 4501 CACAA CCACT ACACG CAGAA GAGCC TCTCC CTGTC TCCGG GTAAA TGA

Secuencia proteínica de VWF031 (SEQ ID NO: 86)

MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
 51 YSFAGYCSYL LAGGQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQRVV MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DSGSNFQVLL
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
 201 ERASPPSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
 251 EKTLCCEAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME
 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTPCPC
 351 VHSKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TQOSHFKSFD
 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFISIVIEV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
 451 LHNSLVKLVK GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
 501 DWDGRGRLLV KLSVPYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
 551 NAWKLHGDCQ DLQKQSDPC ALNPRMTRES EEACAVLTSP TFEACHRAVS
 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGRV AVREPRGCEL
 651 NCPKGVYVYQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
 751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
 851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGEQ YVLVQDYCGS
 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTLIVE GGEIELFDGE VNVKRPKDE
 951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
 1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPD SSPATCHNNI
 1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTC CSIGDCAAF
 1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVTV RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNCSA
 1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
 5 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGGGSGGG
 1251 GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSLVPRGSGG GSGGGGSDK THTCPPCPAP
 1301 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
 1351 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKKEYKCK VSNKALPAPI
 1401 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
 1451 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
 1501 HNHYTQKSLV LSPGK*

Secuencia de nucleótidos de VWF034 (SEQ ID NO: 148)

10

ES 2 982 051 T3

```

1   ATGAT TCCTG CCAGA TTTGC CGGGG TGCTG CTTGC TCTGG CCCTC ATTTT
51  GCCAG GGACC CTTTG TGCAG AAGGA ACTCG CGGCA GGTCA TCCAC GGCCC
101 GATGC AGCCT FTTTC GAAGT GACTT CGTCA ACACC TTTGA TGGGA GCATG
151 TACAG CTTTG CGGGA TACTG CAGTT ACCTC CTGGC AGGGG GCTGC CAGAA
201 ACGCT CCTTC TCGAT TATFG GGGAC TTCCA GAATG GCAAG AGAGT GAGCC
251 TCTCC GTGTA TCTTG GGGAA TTTT  TGACA TCCAT TTGTT TGTCA ATGGT
301 ACCGT GACAC AGGGG GACCA AAGAG TCTCC ATGCC CTATG CCTCC AAAGG
351 GCTGT ATCTA GAAAC TGAGG CTGGG TACTA CAAGC TGTCC GGTGA GGCCT
401 ATGGC TTTGT GGCCA GGATC GATGG CAGCG GCAAC TTTCA AGTCC TGCTG
451 TCAGA CAGAT ACTTC AACAA GACCT GCGGG CTGTG TGGCA ACTTT AACAT
501 CTTTG CTGAA GATGA CTTTA TGACC CAAGA AGGGA CCTTG ACCTC GGACC
551 CTTAT GACTT TGCCA ACTCA TGGGC TCTGA GCAGT GGAGA ACAGT GGTGT
601 GAACG GGCAT CTCCT CCCAG CAGCT CATGC AACAT CTCCT CTGGG GAAAT
651 GCAGA AGGGC CTGTG GGAGC AGTGC CAGCT TCTGA AGAGC ACCTC GGTGT
701 TTGCC CGCTG CCACC CTCTG GTGGA CCCCC AGCCT TTTGT GGCCC TGTGT
751 GAGAA GACTT TGTGT GAGTG TGCTG GGGGG CTGGA GTGCG CCTGC CCTGC
801 CCTCC TGGAG TACGC CCGGA CCTGT GCCCA GGAGG GAATG GTGCT GTACG
851 GCTGG ACCGA CCACA GCGCG TGCAG CCCAG TGTGC CCTGC TGGTA TGGAG
901 TATAG GCAGT GTGTG TCCCC TTGCG CCAGG ACCTG CCAGA GCCTG CACAT
951 CAATG AAATG TGTCA GGAGC GATGC GTGGA TGGCT GCAGC TGCCC TGAGG
1001 GACAG CTCCT GGATG AAGGC CTCTG CGTGG AGAGC ACCGA GTGTC CCTGC
1051 GTGCA TTCCG GAAAG CGCTA CCCTC CCGGC ACCTC CCTCT CTGCA GACTG
1101 CAACA CCTGC ATTTG CCGAA ACAGC CAGTG GATCT GCAGC AATGA AGAAT
1151 GTCCA GGGGA GTGCC TTGTC ACTGG TCAAT CCCAC TTCAA GAGCT TTGAC
1201 AACAG ATACT TCACC TTCAG TGGGA TCTGC CAGTA CCTGC TGGCC CGGGA
1251 TTGCC AGGAC CACTC CTTCT CCATT GTCAT TGAGA CTGTC CAGTG TGCTG
1301 ATGAC CGCGA CGCTG TGTGC ACCCG CTCCG TCACC GTCCG GCTGC CTGGC
1351 CTGCA CAACA GCCTT GTGAA ACTGA AGCAT GGGGC AGGAG TTGCC ATGGA
1401 TGGCC AGGAC ATCCA GCTCC CCCTC CTGAA AGGTG ACCTC CGCAT CCAGC
1451 ATACA GTGAC GGCC  CCGTG CGCCT CAGCT ACGGG GAGGA CCTGC AGATG
1501 GACTG GGATG GCCGC GGGAG GCTGC TGGTG AAGCT GTCCC CCGTC TATGC
1551 CGGGA AGACC TGCGG CCTGT GTGGG AATTA CAATG GCAAC CAGGG CGACG
1601 ACTTC CTTAC CCCCT CTGGG CTGGC GGAGC CCGGG GTGGA GGACT TCGGG
1651 AACGC CTGGA ACCTG CACGG GGA  GGCAG CACCT GCAGA AGCAG CACAG
1701 CGATC CCTGC GCCCT CAACC CGCGC ATGAC CAGGT TCTCC GAGGA GGCGT
1751 GCGCG GTCCT GACGT CCCCC ACATT CGAGG CCTGC CATCG TGCCG TCAGC
1801 CCGCT GCCCT ACCTG CGGAA CTGCC GCTAC CAGCT GTGCT CCTGC TCGGA
1851 CGGCC GCGAG TGCCT GTGCG GCGCC CTGGC CAGCT ATGCC GCGCC CTGCG
1901 CGGGG AGAGG CGTGC GCGTC GCGTG GCGCG AGCCA GGCCG CTGTG AGCTG
1951 AACTG CCCGA AAGGC CAGGT GTACC TGCAG TGCGG GACCC CCTGC AACCT
2001 GACCT GCCGC TCTCT CTCTT ACCCG GATGA GGAAT GCAAT GAGGC CTGCC
2051 TGGAG GGCTG CTTCT GCCCC CCAGG GCTCT ACATG GATGA GAGGG GGGAC
2101 TGCGT GCCCA AGGCC CAGTG CCCCT GTTAC TATGA CGGTG AGATC TTCCA
2151 GCCAG AAGAC ATCTT CTCAG ACCAT CACAC CATGT GCTAC TGTGA GGATG
2201 GCTTC ATGCA CTGTA CCATG AGTGG AGTCC CCGGA AGCTT GCTGC CTGAC
2251 GCTGT CCTCA CGAGT CCCCT GTCTC ATCGC AGCAA AAGGA GCCTA TCCTG
2301 TCGGC CCCCC ATGGT CAAGC TGGTG TGTCC CGCTG ACAAC CTGCG GGCTG
2351 AAGGG CTCGA GTGTA CAAA ACGTG CCAGA ACTAT GACCT GGAGT GCATG
2401 AGCAT GGGCT GTGTC TCTGG CTGCC TCTGC CCCCC GGGCA TGGTC CGGCA

```

ES 2 982 051 T3

```

2451  TGAGA ACAGA TGTGT GGCCC TGGAA AGGTG TCCCT GCTTC CATCA GGGCA
2501  AGGAG TATGC CCCTG GAGAA ACAGT GAAGA TTGGC TGCAA CACTT GTGTC
2551  TGTCG GGACC GGAAG TGGAA CTGCA CAGAC CATGT GTGTG ATGCC ACGTG
2601  CTCCA CGATC GGCAT GGCCC ACTAC CTCAC CTTTCG ACGGG CTCAA ATACC
2651  TGTTT CCCGG GGAGT GCCAG TACGT TCTGG TGCAG GATTA CTGCG GCAGT
2701  AACCC TGGGA CCTTT CGGAT CCTAG TGGGG AATAA GGGAT GCAGC CACCC
2751  CTCAG TGAAG TGCAA GAAAC GGGTC ACCAT CCTGG TGGAG GGAGG AGAGA
2801  TTGAG CTGTT TGACG GGGAG GTGAA TGTGA AGAGG CCCAT GAAGG ATGAG
2851  ACTCA CTTTG AGGTG GTGGA GTCTG GCCGG TACAT CATTG TGCTG CTGGG
2901  CAAAG CCCTC TCCGT GGTCT GGGAC CGCCA CCTGA GCATC TCCGT GGTCC
2951  TGAAG CAGAC ATACC AGGAG AAAGT GTGTG GCCTG TGTGG GAATT TTGAT
3001  GGCAT CCAGA ACAAT GACCT CACCA GCAGC AACCT CCAAG TGGAG GAAGA
3051  CCCTG TGGAC TTTGG GAACT CCTGG AAAGT GAGCT CGCAG TGTGC TGACA
3101  CCAGA AAAGT GCCTC TGGAC TCATC CCCTG CCACC TGCCA TAACA ACATC
3151  ATGAA GCAGA CGATG GTGGA TTCCT CCTGT AGAAT CCTTA CCAAGT GACGT
3201  CTTCC AGGAC TGCAA CAAGC TGGTG GACCC CGAGC CATAT CTGGA TGTCT
3251  GCATT TACGA CACCT GCTCC TGTGA GTCCA TTGGG GACTG CGCCG CATTG
3301  TGCGA CACCA TTGCT GCCTA TGCCC ACGTG TGTGC CCAGC ATGGC AAGGT
3351  GGTGA CCTGG AGGAC GGCCA CATTG TGCCC CCAGA GCTGC GAGGA GAGGA
3401  ATCTC CGGGA GAACG GGTAT GAGGC TGAGT GGCGC TATAA CAGCT GTGCA
3451  CCTGC CTGTC AAGTC ACGTG TCAGC ACCCT GAGCC ACTGG CCTGC CCTGT
3501  GCAGT GTGTG GAGGG CTGCC ATGCC CACTG CCCTC CAGGG AAAAT CCTGG
3551  ATGAG CTTTT GCAGA CCTGC GTTGA CCCTG AAGAC TGTCC AGTGT GTGAG
3601  GTGGC TGGCC GCGCT TTTGC CTCAG GAAAG AAAGT CACCT TGAAT CCCAG
3651  TGACC CTGAG CACTG CCAGA TTTGC CACTG TGATG TTGTC AACCT CACCT
3701  GTGAA GCCTG CCAGG AGCCG ATATC GGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC
3751  GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA GCCAG CCACC TCCGG GTCTG AGACA CCCGG
3801  GACTT CCGAG AGTGC CACCC CTGAG TCCGG ACCCG GGTCC GAGCC CGCCA
3851  CTTCC GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC AAGCG AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA
3901  GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC
3951  AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC
4001  CCGAA TCAGG GCCAG GGTCT GAGCC TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA
4051  GGCAC CTCTG AGTCC GCCAC ACCAG AGTCC GGACC CGGAT CTCCC GCTGG
4101  GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA
4151  CTGAG CAGGG TACCT CAACC GAGCC ATCCG AGGGA TCAGC TCCCG GCACC
4201  TCAGA GTCGG CAACC CCGGA GTCTG GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC
4251  ACCAG AGTCC GGTCC CCGGA CTTC A GAATC AGCAA CACCC GAGTC CGGCC
4301  CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT
4351  GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC
4401  CACTG ATTAG GGCAC CAGCA CAAAG CGAGG GCTCC GCACC CGGAA
4451  CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GGTTC AGCAC CCGGC TCTGA GCCGG CCACA
4501  AGTGG CAGTG AGACA CCCGG CACTT CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG
4551  CCCAG GCACT AGTAC CGAGC CCTCT GAAGG CAGTG CGCCA GATTC TGGCG
4601  GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG
4651  GGATC CGGTG GCGGG GGATC CCTGG TCCCC CCGGG CAGCG GAGGC GACAA
4701  AACTC ACACA TGCCC ACCGT GCCCA GCTCC AGAAC TCCTG GGCGG ACCGT
4751  CAGTC TTCCT CTTCC CCCCC AAACC CAAGG ACACC CTCAT GATCT CCCGG
4801  ACCCC TGAGG TCACA TGCGT GGTGG TGGAC GTGAG CCACG AAGAC CCTGA
4851  GGTC AAGTT AACTG GTACG TGGAC GGCGT GGAGG TGCAT AATGC CAAGA
4901  CAAAG CCGCG GGAGG AGCAG TACAA CAGCA CGTAC CGTGT GGTCA CGGTC
4951  CTCAC CGTCC TGCAC CAGGA CTGGC TGAAT GGCAA GGAGT ACAAG TGCAA
5001  GGTCT CCAAC AAAGC CCTCC CAGCC CCCAT CGAGA AAACC ATCTC CAAAG
5051  CCAA GGGCA GCCCC GAGAA CCACA GGTGT ACACC CTGCC CCCAT CCCGG
5101  GATGA GCTGA CCAAG AACCA GGTCA GCCTG ACCTG CCTGG TCAAA GGCTT
5151  CTATC CCAGC GACAT CGCCG TGGAG TGGGA GAGCA ATGGG CAGCC GGAGA
5201  ACAAC TACAA GACCA CGCCT CCGGT GTTGG ACTCC GACGG CTCTT TCTTC
5251  CTCTA CAGCA AGCTC ACCGT GGACA AGAGC AGGTG GCAGC AGGGG AACGT
5301  CTTCT CATGC TCCGT GATGC ATGAG GCTCT GCACA ACCAC TACAC GCAGA
5351  AGAGC CTCTC CCTGT CTCCG GGTAA ATGA

```

Secuencia proteínica de VWF034 (SEQ ID NO: 87)

ES 2 982 051 T3

```

1   MIPAREFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
51  YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQQRVS MPYASKGLYL ETEAGYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
201 ERASPPSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTECPC
351 VHSGRKYPFG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEBCPGECLV TGQSHFKSFD
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIVTV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451 LHNSLVKLLK GAGVAMDGQD IQLPLKGD LRIQHTVTVASV RLSYGEDLQM
501 DWDGGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
551 NAWKLGDCQ DLQKQHSDFC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
601 PLFYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCCL
651 NCPKQGVYVY CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCI CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECC YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKRPMDKE
951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWRHLIS SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPDL SSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVPEPEY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVTV RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNCSA
1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGTSESATP
1251 ESGPGSEPAT SGSETPGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP GTSESATPES
1301 GPGTSTEPSE GSAPGSPAGS PTSTEEGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP
1351 GTSESATPES GPGSPAGSPT STEEGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT
1401 SESATPESGP GTSESATPES GPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGSEP
1451 ATSGSETPGS PAGSPTSTEE GTSTEPSEGS APGTSTEPSE GSAPGSEPAT
1501 SGSETPGTSE SATPESGPGT STEPSEGSAP DIGGGGGSGG GGSVLPVRS
1551 GDKTHTCPPC PABELLGGPS VFLFDPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH
1601 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
1651 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPFSRDEL TKNQVSLTCLV
1701 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPEVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
1751 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

```

Secuencia de nucleótidos de VWF050 (triple mutante IHH) (SEQ ID NO: 149)

```

1   ATGAT TCCTG CCAGA TTTGC CGGGG TGCTG CTGTC TCTGG CCCTC ATTTT
51  GCCAG GGACC CTTTG TGCAG AAGGA ACTCG CGGCA GGTCA TCCAC GGCCC
101 GATGC AGCCT TTTGC GAAGT GACTT CGTCA ACACC TTTGA TGGGA GCATG
151 TACAG CTTTG CGGGA TACTG CAGTT ACCTC CTGGC AGGGG GCTGC CAGAA
201 ACGCT CCTTC TCGAT TATTG GGGAC TTCCA GAATG GCAAG AGAGT GAGCC
251 TCTCC GTGTA TCTTG GGGAA TTTTT TGACA TCCAT TTGTT TGTCA ATGGT
301 ACCGT GACAC AGGGG GACCA AAGAG TCTCC ATGCC CTATG CCTCC AAAGG
351 GCTGT ATCTA GAAAC TGAGG CTGGG TACTA CAAGC TGTCC GGTGA GGCC
401 ATGGC TTTGT GGCCA GGATC GATGG CAGCG GCAAC TTTCA AGTCC TGCTG
451 TCAGA CAGAT ACTTC AACAA GACCT GCGGG CTGTG TGGCA ACTTT AACAT
501 CTTTG CTGAA GATGA CTTTA TGACC CAAGA AGGGA CCTTG ACCTC GGACC
551 CTTAT GACTT TGCCA ACTCA TGGGC TCTGA GCAGT GGAGA ACAGT GGTGT
601 GAACG GGCAT CTCTT CCCAG CAGCT CATGC AACAT CTCTT CTGGG GAAAT
5  651 GCAGA AGGGC CTGTG GGAGC AGTGC CAGCT TCTGA AGAGC ACCTC GGTGT

```

ES 2 982 051 T3

701 TTGCC CGCTG CCACC CTCTG GTGGA CCCCC AGCCT TTTGT GGCCC TGTGT
 751 GAGAA GACTT TGTGT GAGTG TGCTG GGGGG CTGGA GTGCG CCTGC CCTGC
 801 CCTCC TGGAG TACGC CCGGA CCTGT GCCCA GGAGG GAATG GTGCT GTACG
 851 GCTGG ACCGA CCACA GCGCG TGCAG CCCAG TGTGC CCTGC TGGTA TGGAG
 901 TATAG GCAGT GTGTG TCCCC TTGCG CCAGG ACCTG CCAGA GCCTG CACAT
 951 CAATG AAATG TGTCA GGAGC GATGC GTGGA TGGCT GCAGC TGCCC TGAGG
 1001 GACAG CTCCT GGATG AAGGC CTCTG CGTGG AGAGC ACCGA GTGTC CCTGC
 1051 GTGCA TTCCG GAAAG CGCTA CCCTC CCGGC ACCTC CCTCT CTCGA GACTG
 1101 CAACA CCTGC ATTTG CCGAA ACAGC CAGTG GATCT GCAGC AATGA AGAAT
 1151 GTCCA GGGGA GTGCC TTGTC ACTGG TCAAT CCCAC TTCAA GAGCT TTGAC
 1201 AACAG ATACT TCACC TTCAG TGGGA TCTGC CAGTA CCTGC TGGCC CGGGA
 1251 TTGCC AGGAC CACTC CTCTT CCATT GTCAT TGAGA CTGTC CAGTG TGCTG
 1301 ATGAC CGCGA CGCTG TGTGC ACCCG CTCCG TCACC GTCCG GCTGC CTGGC
 1351 CTGCA CAACA GCCTT GTGAA ACTGA AGCAT GGGGC AGGAG TTGCC ATGGA
 1401 TGGCC AGGAC ATCCA GCTCC CCCTC CTGAA AGGTG ACCTC CGCAT CCAGC
 1451 ATACA GTGAC GGCCT CCGTG CGCCT CAGCT ACGGG GAGGA CCTGC AGATG
 1501 GACTG GGATG GCCGC GGGAG GCTGC TGGTG AAGCT GTCCC CCGTC TATGC
 1551 CGGGA AGACC TGCGG CCTGT GTGGG AATTA CAATG GCAAC CAGGG CGACG
 1601 ACTTC CTTAC CCCCT CTGGG CTGGC GGAGC CCCGG GTGGA GGAAT TCGGG
 1651 AACGC CTGGA AGCTG CACGG GGACT GCCAG GACCT GCAGA AGCAG CACAG
 1701 CGATC CCTGC GCCCT CAACC CGCGC ATGAC CAGGT TCTCC GAGGA GGCCT
 1751 GCGCG GTCCT GACGT CCCCC ACATT CGAGG CCTGC CATCG TGCCG TCAGC
 1801 CCGCT GCCCT ACCTG CGGAA CTGCC GCTAC GACGT GTGCT CCTGC TCGGA
 1851 CGGCC CGGAG TGCCT GTGCG GCGCC CTGGC CAGCT ATGCC GCGGC CTGCG
 1901 CGGGG AGAGG CGTGC GCGTC GCGCG AGCCA GGCCG CTGTG AGCTG
 1951 AACTG CCCGA AAGGC CAGGT GTACC TGCAG TGCGG GACCC CCTGC AACCT
 2001 GACCT GCCGC TCTCT CTCTT ACCCG GATGA GGAAT GCAAT GAGGC CTGCC
 2051 TGGAG GGCTG CTTCT GCCCC CCAGG GCTCT ACATG GATGA GAGGG GGGAC
 2101 TGCGT GCCCA AGGCC CAGTG CCCCT GTTAC TATGA CGGTG AGATC TTCCA
 2151 GCCAG AAGAC ATCTT CTCAG ACCAT CACAC CATGT GCTAC TGTGA GGATG
 2201 GCTTC ATGCA CTGTA CCATG AGTGG AGTCC CCGGA AGCTT GCTGC CTGAC
 2251 GCTGT CCTCA GCAGT CCCCT GTCTC ATCGC AGCAA AAGGA GCCTA TCCTG
 2301 TCGGC CCCCC ATGGT CAAGC TGGTG TGTCC CGCTG ACAAC CTGCG GGCTG
 2351 AAGGG CTCGA GTGTA CCAAA ACGTG CCAGA ACTAT GACCT GGAGT GCATG
 2401 AGCAT GGGCT GTGTC TCTGG CTGCC TCTGC CCCCC GGCCA TGGTG CGGCA
 2451 TGAGA ACAGA TGTGT GGCCC TGGAA AGGTG TCCCT GCTTC CATCA GGGCA
 2501 AGGAG TATGC CCCTG GAGAA ACAGT GAAGA TTGGC TGCAA CACTT GTGTC
 2551 TGTGCG GGACC GGAAG TGGAA CTGCA CAGAC CATGT GTGTG ATGCC ACGTG
 2601 CTCCA CCGAT GGCAT GGCCC ACTAC CTCAC CTTCG ACGGG CTCAA ATACC
 2651 TGTTC CCGG GGAGT GCCAG TAGGT TCTGG TGCAG GATTA CTGGG GCAGT
 2701 AACCC TGGGA CCTTT CGGAT CCTAG TGGGG AATAA GGGAT GCAGC CACCC
 2751 CTCAG TGAAG TGCAA GAAAC GGGTC ACCAT CCTGG TGGAG GGAGG AGAGA
 2801 TTGAG CTGTT TGACG GGGAG GTGAA TGTGA AGAGG CCCAT GAAGG ATGAG
 2851 ACTCA CTTTG AGGTG GTGGA GTCTG GCCGG TACAT CATTG TGCTG CTGGG
 2901 CAAAG CCCTC TCCGT GGTCT GGGAC CGCCA CCTGA GCATC TCCGT GGTCC
 2951 TGAAG CAGAC ATACC AGGAG AAAGT GTGTG GCCTG TGTGG GAATT TTGAT
 3001 GGCAT CCAGA ACAAT GACCT CACCA GCAGC AACCT CCAAG TGGAG GAAGA
 3051 CCCTG TGGAC PTTGG GAACT CCTGG AAAGT GAGCT CGCAG TGTGC TGACA
 3101 CCAGA AAAGT GCCTC TGGAC TCATC CCCTG CCACC TGCCA TAAAC ACATC
 3151 ATGAA GCAGA CGATG GTGGA TTCCCT CCTGT AGAAT CCTTA CCAGT GACGT
 3201 CTTCC AGGAC TGCAA CAAGC TGGTG GACCC CGAGC CATAT CTGGA TGTCT
 3251 GCATT TACGA CACCT GCTCC TGTGA GTCCA TTGGG GACTG CGCCG CATTG
 3301 TGCGA CACCA TTGCT GCCTA TGCCC ACGTG TGTGC CCAGC ATGGC AAGGT
 3351 GGTGA CCTGG AGGAC GGCCA CATTG TGCCC CCAGA GCTGC GAGGA GAGGA
 3401 ATCTC CGGGA GAACG GGTAT GAGGC TGAGT GCGCG TATAA CAGCT GTGCA
 3451 CCTGC CTGTC AAGTC ACGTG TCAGC ACCCT GAGCC ACTGG CCTGC CCTGT
 3501 GCAGT GTGTG GAGGG CTGCC ATGCC CACTG CCCTC CAGGG AAAAT CCTGG
 3551 ATGAG CTTTT GCAGA CCTGC GTTGA CCCTG AAGAC TGTCC AGTGT GTGAG
 3601 GTGGC TGGCC GGCCT TTTGC CTCAG GAAAG AAAGT CACCT TGAAT CCCAG

ES 2 982 051 T3

```

3651 TGACC CTGAG CACTG CCAGA TTTGC CACTG TGATG TTGTC AACCT CACCT
3701 GTGAA GCCTG CCAGG AGCCG ATATC TGGCG GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG
3751 GGATC CGGCG GTGGA GGTTC CGGCG GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG GGATC
3801 CGGTG GCGGG GGATC CCTGG TCCCC CGGGG CAGCG GCGGT GGAGG TTCCG
3851 GTGGC GGGGG ATCCG ACAA ACTCA CACAT GCCCA CCGTG CCCAG CTCCA
3901 GAACT CCTGG GCGGA CCGTC AGTCT TCCTC TTTCC CCCAA AACCC AAGGA
3951 CACCC TCATG GCCTC CCGGA CCCCT GAGGT CACAT GCGTG GTGGT GGACG
4001 TGAGC CACGA AGACC CTGAG GTCAA GTTCA ACTGG TACGT GGACG GCGTG
4051 GAGGT GCATA ATGCC AAGAC AAAGC CGCGG GAGGA GCAGT ACAAC AGCAC
4101 GTACC GTGTG GTCAG CGTCC TCACC GTCCT GGCCC AGGAC TGGCT GAATG
4151 GCAAG GAGTA CAAGT GCAAG GTCTC CAACA AAGCC CTCCC AGCCC CCATC
4201 GAGAA AACCA TCTCC AAAGC CAAAG GGCAG CCCCAG AGAAC CACAG GTGTA
4251 CACCC TGCCC CCATC CCGCG ATGAG CTGAC CAAGA ACCAG GTCAG CCTGA
4301 CCTGC CTGGT CAAAG GCTTC TATCC CAGCG ACATC GCCGT GGAGT GGGAG
4351 AGCAA TGGGC AGCCG GAGAA CAACT ACAAG ACCAC GCCTC CCGTG TTGGA
4401 CTCCG ACGGC TCCTT CTTCC TCTAC AGCAA GCTCA CCGTG GACAA GAGCA
4451 GGTGG CAGCA GGGGA ACGTC TTCTC ATGCT CCGTG ATGCA TGAGG CTCTG
4501 CACAA CGCCT ACACG CAGAA GAGCC TCTCC CTGTC TCCGG GTAAA TGA

```

Secuencia proteínica de VWF050 (triple mutante IHH) (SEQ ID NO: 150)

```

1 MIPAREFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSE SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQRVV MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTTEPC
351 VHSKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLEV TGQSHFKSFD
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIVTV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451 LHNSLVKLLK GAGVAMDGGD IQLPLKGLDL RIQHTVTASV RLSYGEDLQM
501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
551 NAWKLHGDCQ DLQKQHSDFC ALNPRMTRFS EEACAVLTSF TFEACHRAVS
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVVRV AWREPGRCLE
651 NCPKQVYVYQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701 CVPKQCPQCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
801 SMGCVSGLCL PPGMVRHENR CVALERCPCF HQKEYAPGE TVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKRPKDE
951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVTVW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAERYNSCA
1151 PACQVTCQHP EPLACPQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGGGGSGGG
1251 GSGGGSGGG GSGGGSGGG GSLVPRGSGG GSGGGGSDK THTCPPCFAP
1301 ELLGGPSVFL FFPKPKDTLM ASRTPVETCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
1351 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLAQD WLNKKEYKCK VSNKALPAPI
1401 EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
1451 SNGQPENNYK TTPFVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
5 1501 HNAYTQKSLV LSPGK*

```

Secuencia de nucleótidos de VWF057 (SEQ ID NO: 151)

ES 2 982 051 T3

```

1   ATGAT TCCTG CCAGA TTTGC CGGGG TGCTG CTTGC TCTGG CCCTC ATTTT
51  GCCAG GGACC CTTTG TGCAG AAGGA ACTCG CGGCA GGTCA TCCAC GGCC
101 GATGC AGCCT TTTCC GAAAT GACTT CGTCA ACACC TTTGA TGGGA GCATG
151 TACAG CTTTG CGGGA TACTG CAGTT ACCTC CTGGC AGGGG GCTGC CAGAA
201 ACGCT CCTTC TCGAT TATTG GGGAC TTCCA GAATG GCAAG AGAGT GAGCC
251 TCTCC GTGTA TCTTG GGGAA TTTTT TGACA TCCAT TTGTT TGTC AATGGT
301 ACCGT GACAC AGGGG GACCA AAGAG TCTCC ATGCC CTATG CCTCC AAAGG
351 GCTGT ATCTA GAAAC TGAGG CTGGG TACTA CAAGC TGTCC GGTGA GGCC
401 ATGGC TTTGT GGCCA GGATC GATGG CAGCG GCAAC TTTCA AGTCC TGCTG
451 TCAGA CAGAT ACTTC AACAA GACCT GCGGG CTGTG TGGCA ACTTT AACAT
501 CTTTG CTGAA GATGA CTTTA TGACC CAAGA AGGGA CCTTG ACCTC GGACC
551 CTTAT GACTT TGCCA ACTCA TGGGC TCTGA GCAGT GGAGA ACAGT GGTGT
601 GAACG GGCAT CTCCT CCCAG CAGCT CATGC AACAT CTCCT CTGGG GAAAT
651 GCAGA AGGGC CTGTG GGAGC AGTGC CAGCT TCTGA AGAGC ACCTC GGTGT
701 TTGCC CGCTG CCACC CTCTG GTGGA CCCC AGCCT TTTGT GGCC TGTGT
751 GAGAA GACTT TGTGT GAGTG TGCTG GGGGG CTGGA GTGCG CCTGC CCTGC
801 CCTCC TGGAG TACGC CCGGA CCTGT GCCCA GGAGG GAATG GTGCT GTACG
851 GCTGG ACCGA CCACA GCGCG TGCGG CCCAG TGTGC CCTGC TGGTA TGGAG
901 TATAG GCAGT GTGTG TCCCC TTGCG CCAGG ACCTG CCAGA GCCTG CACAT
951 CAATG AAATG TGTCA GGAGC GATGC GTGGA TGGCT GCAGC TGCC TGAGG
1001 GACAG CTCCT GGATG AAGGC CTCTG CGTGG AGAGC ACCGA GTGTC CCTGC
1051 GTGCA TTCCG GAAAG CGCTA CCCTC CCGGC ACCTC CCTCT CTCGA GACTG
1101 CAACA CCTGC ATTTG CCGAA ACAGC CAGTG GATCT GCAGC AATGA AGAAT
1151 GTCCA GGGGA GTGCC TTGTC ACTGG TCAAT CCCAC TTCAA GAGCT TTGAC
1201 AACAG ATACT FCACC TTCAG TGGGA TCTGC CAGTA CCTGC TGGCC CCGGA
1251 TTGCC ATGAC CACTC CTTCT CCATT GTCAT TGAGA CTGTC CAGTG TGCTG
1301 ATGAC CGCGA CGCTG TGTGC ACCCG CTCCG TCACC GTCCG GCTGC CTGGC
1351 CTGCA CAACA GCCTT GTGAA ACTGA AGCAT GGGGC AGGAG TTGCC ATGGA
1401 TGGCC AGGAC ATCCA GCTCC CCCTC CTGAA AGGTG ACCTC CGCAT CCAGC
1451 ATACA GTGAC GGCCCT CCGCT CAGCT ACGGG GAGGA CCTGC AGATG
1501 GACTG GGATG GCGCG GGGAG GCTGC TGGTG AAGCT GTCCC CCGTC TATGC
1551 CGGGA AGACC TGCCG CCTGT GTGGG AATTA CAATG GCAAC CAGGG CGACG
1601 ACTTC CTTAC CCCCT CTGGG CTGGC GGAGC CCGCG GTGGA GGACT TCGGG
1651 AACGC CTGGA AGCTG CACGG GGACT GCCAG GACCT GCAGA AGCAG CACAG
1701 CGATC CTTGC GCCCT CAACC CCGGC ATGAC CAGGT TCTCC GAGGA GCGCT
1751 GCGCG GTCCT GACGT CCCCC ACATT CGAGG CCTGC CATCG TGCCG TCAGC
1801 CCGCT GCCCT ACCTG CCGAA CTGCC GCTAC GACGT GTGCT CCTGC TCGGA
1851 CGGCC GCGAG TGCCT GTGCG GCGCC CTGGC CAGCT ATGCC GCGGC CTGCG
1901 CGGGG AGAGG CGTGC GCGTC GCGTG GCGCG AGCCA GGCCG CTGTG AGCTG
1951 AACTG CCGCA AAGGC CAGGT GTACC TGCGG TGCCG GACCC CTTGC AACCT
2001 GACCT GCGCG TCTCT CTCTT ACCCG GATGA GGAAT GCAAT GAGGC CTGCC
2051 TGGAG GGCTG CTTCT GCCCC CCAGG GCTCT ACATG GATGA GAGGG GGGAC
2101 TGCGT GCCCA AGGCC CAGTG CCCCT GTTAC TATGA CGGTG AGATC TTCCA
2151 GCCAG AAGAC ATCTT CTCAG ACCAT CACAC CATGT GCTAC TGTGA GGATG
2201 GCTTC ATGCA CTGTA CCATG AGTGG AGTCC CCGGA AGCTT GCTGC CTGAC
2251 GCTGT CCTCA GCAGT CCCCT GTCTC ATCGC AGCAA AAGGA GCCTA TCCTG
2301 TCGGC CCCCC ATGGT CAAGC TGGTG TGTCC CGCTG ACAAC CTGCG GGCTG
2351 AAGGG CTCGA GTGTA CCAAA ACGTG CCAGA ACTAT GACCT GGAGT GCATG
2401 AGCAT GGGCT GTGTC TCTGG CTGCC TCTGC CCCCC GGGCA TGGTC CGGCA
2451 TGAGA ACAGA TGTGT GGCCG TGGAA AGGTG TCCCT GCTTC CATCA GGGCA
2501 AGGAG TATGC CCTG GAGAA ACAGT GAAGA TTGGC TGCAA CACTT GTGTC
2551 TGTCC GGACC GGAAG TGGAA CTGCA CAGAC CATGT GTGTG ATGCC ACGTG
2601 CTCCA CGATC GGCAT GGCC ACTAC CTCAC CTTCG ACGGG CTCAA ATACC
2651 TGTTT CCCGG GGAGT GCCAG TACGT TCTGG TGCGG GATTA CTGCG GCAGT
2701 AACCC TGGGA CCTTT CGGAT CCTAG TGGGG AATAA GGGAT GCAGC CACCC
2751 CTCAG TGAAA TGCAA GAAAC GGGTC ACCAT CCTGG TGGAG GGAGG AGAGA
2801 TTGAG CTGTT TGACG GGGAG GTGAA TGTGA AGAGG CCCAT GAAGG ATGAG
2851 ACTCA CTTTG AGGTG GTGGA GTCTG GCGGG TACAT CATTC TGCTG CTGGG
2901 CAAAG CCCTC TCCGT GGTCT GGGAC CGCCA CCTGA GCATC TCCGT GGTCC

```

ES 2 982 051 T3

2951 TGAAG CAGAC ATACC AGGAG AAAGT GTGTG GCCTG TGTGG GAATT TTGAT
 3001 GGCAT CCAGA ACAAT GACCT CACCA GCAGC AACCT CCAAG TGGAG GAAGA
 3051 CCCTG TGGAC TTTGG GAACT CCTGG AAAGT GAGCT CGCAG TGTGC TGACA
 3101 CCAGA AAAGT GCCTC TGGAC TCATC CCCTG CCACC TGCCA TAACA ACATC
 3151 ATGAA GCAGA CGATG GTGGA TTCCT CCTGT AGAAT CCTTA CCAGT GACGT
 3201 CTTCC AGGAC TGCAA CAAGC TGGTG GACCC CGAGC CATAT CTGGA TGTCT
 3251 GCATT TACGA CACCT GCTCC TGTGA GTCCA TTGGG GACTG CGCCG CATTC
 3301 TGCGA CACCA TTGCT GCCTA TGCCC ACGTG TGTGC CCAGC ATGGC AAGGT
 3351 GGTGA CCTGG AGGAC GGCCA CATTG TGCCC CCAGA GCTGC GAGGA GAGGA
 3401 ATCTC CGGGA GAACG GGTAT GAGGC TGAGT GGCGC TATAA CAGCT GTGCA
 3451 CCTGC CTGTC AAGTC ACGTG TCAGC ACCCT GAGCC ACTGG CCTGC CCTGT
 3501 GCAGT GTGTG GAGGG CTGCC ATGCC CACTG CCCTC CAGGG AAAAT CCTGG
 3551 ATGAG CTTTT GCAGA CCTGC GTTGA CCCTG AAGAC TGTCC AGTGT GTGAG
 3601 GTGGC TGGCC GCGGT TTTGC CTCAG GAAAG AAAGT CACCT TGAAT CCCAG
 3651 TGACC CTGAG CACTG CCAGA TTTGC CACTG TGATG TTGTC AACCT CACCT
 3701 GTGAA GCCTG CCAGG AGCCG ATATC GGGCG CGCCA ACATC AGAGA GCGCC
 3751 ACCCC TGAAG GTGGT CCCGG GAGCG AGCCA GCCAC ATCTG GGTCG GAAAC
 3801 GCCAG GCACA AGTGA GTCTG CAACT CCCGA GTCCG GACCT GGCTC CGAGC
 3851 CTGCC ACTAG CCGCT CCGAG ACTCC GGGAA CTTC CAGAG CGCTA CACCA
 3901 GAAAG CCGA CCGGA ACCAG TACCG AACCT AGCGA GGGCT CTGCT CCGGG
 3951 CAGCC CAGCC GCCTC TCCTA CATCC ACCGA GGAGG GCACT TCCGA ATCCG
 4001 CCACC CCGGA GTCAG GGCCA GGATC TGAAC CCGCT ACCTC AGGCA GTGAG
 4051 ACGCC AGGAA CGAGC GAGTC CGCTA CACCG GAGAG TGGGC CAGGG AGCCC
 4101 TGCTG GATCT CCTAC GTCCA CTGAG GAAGG GTCAC CAGCG GGCTC GCCCA
 4151 CCAGC ACTGA AGAAG GTGCC TCGAG CCGCG GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG
 4201 GGATC CGGTG GCGGG GGATC CCGTG GCGGG GGATC CCGTG GCGGG GGATC
 4251 CCTGG TCCCC CCGGG CAGCG GAGGC GACAA AACTC ACACA TGCCC ACCGT
 4301 GCCCA GCTCC AGAAC TCCTG GCGGG ACCGT CAGTC TTCCT CTTC CCCCC
 4351 AAACC CAAGG ACACC CTCAAT GATCT CCCGG ACCCC TGAGG TCACA TGCGT
 4401 GGTGG TGGAC GTGAG CCACG AAGAC CCTGA GGTCA AGTTC AACTG GTACG
 4451 TGGAC GCGGT GGAGG TGCAT AATGC CAAGA CAAAG CCGCG GGAGG AGCAG
 4501 TACAA CAGCA CGTAC CGTGT GGTCA GCGTC CTCAC CGTCC TGCAC CAGGA
 4551 CTGGC TGAAT GGCAA GGAGT ACAAG TGCAA GGTCT CCAAC AAAGC CCTCC
 4601 CAGCC CCCAT CGAGA AAACC ATCTC CAAAG CAAA GGGA GCCCC GAGAA
 4651 CCACA GGTGT ACACC CTGCC CCCAT CCCGG GATGA GCTGA CCAAG AACCA
 4701 TGTCA GCCTG ACCTG CCTGG TCAA GGCTT CTATC CCAGC GACAT CGCCG
 4751 TGGAG TGGGA GAGCA ATGGG CAGCC GGAGA ACAAC TACAA GACCA CGCCT
 4801 CCCGT GTTGG ACTCC GACGG CTCCT TCTTC CTCTA CAGCA AGCTC ACCGT
 4851 GGACA AGAGC AGGTG GCAGC AGGGG AACGT CTTCT CATGC TCCGT GATGC
 4901 ATGAG GCTCT GCACA ACCAC TACAC GCAGA AGAGC CTCTC CCTGT CTCCG
 4951 GGTAAT ATGA

Secuencia proteínica de VWF057 (SEQ ID NO: 152)

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFNVTFDGSM
 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DSGSNFQVLL
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
 201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
 251 EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME
 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTTEPC
 351 VHS GKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSF SIV IETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
 451 LHNSLVKLVK GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTVASV RLSYGEDLQM
 501 DWDGRGRLLV KLSVPYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
 551 NAWKLGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGRV AVREPRGCEL
 651 NCPKGGVYLQ CGTFPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
 5 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD

ES 2 982 051 T3

751 AVLSSEPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
 851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGEQ YVLVQDYCGS
 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKRPKDE
 951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
 1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPD SSPATCHNNT
 1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
 1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVITW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNCSA
 1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGAPTESA
 1251 TPESGPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP
 1301 ESGPGTSTEP SEGSAPGSPA GSPTSTEEGT SESATPESGP GSEPATSGSE
 1351 TPGTSESATP ESGPGSPAGS PTSTEEGSPA GSPTSTEEGA SSGGGGSGGG
 1401 GSGGGGSGGG GSGGGGSLVP RSGGDKTHT CFPCEPELL GGPVFLFPP
 1451 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
 1501 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE
 1551 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
 1601 PVLSDSGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP
 1651 GK*

Secuencia de nucleótidos de VWF058 (VWF034 con mutación IHH) (SEQ ID NO: 153)

1 ATGAT TCCTG CCAGA TTTGC CGGGG TGCTG CTTGC TCTGG CCCTC ATTTT
 51 GCCAG GGACC CTTTG TGCAG AAGGA ACTCG CGGCA GGTCA TCCAC GGCC
 101 GATGC AGCCT TTTCG GAAGT GACTT CGTCA ACACC TTTGA TGGGA GCATG
 151 TACAG CTTTG CGGGA TACTG CAGTT ACCTC CTGGC AGGGG GCTGC CAGAA
 201 ACGCT CCTTC TCGAT TATTG GGGAC TTCCA GAATG GCAAG AGAGT GAGCC
 251 TCTCC GTGTA TCTTG GGGAA TTTTT TGACA TCCAT TTGTT TGTCA ATGGT
 301 ACCGT GACAC AGGGG GACCA AAGAG TCTCC ATGCC CTATG CCTCC AAAGG
 351 GCTGT ATCTA GAAAC TGAGG CTGGG TACTA CAAGC TGTCC GGTGA GGCC
 401 ATGGC TTTGT GGCCA GGATC GATGG CAGCG GCAAC TTTCA AGTCC TGCTG
 451 TCAGA CAGAT ACTTC AACAA GACCT GCGGG CTGTG TGGCA ACTTT AACAT
 501 CTTTG CTGAA GATGA CTTTA TGACC CAAGA AGGGA CCTTG ACCTC GGACC
 551 CTTAT GACTT TGCCA ACTCA TGGGC TCTGA GCAGT GGAGA ACAGT GGTGT
 601 GAACG GGCAT CTCCT CCCAG CAGCT CATGC AACAT CTCCT CTGGG GAAAT
 651 GCAGA AGGGC CTGTG GGAGC AGTGC CAGCT TCTGA AGAGC ACCTC GGTGT
 701 TTGCC CGCTG CCACC CTCTG GTGGA CCCC GAGCT TTTGT GGCC TGTGT
 751 GAGAA GACTT TGTGT GAGTG TGCTG GGGGG CTGGA GTCCG CCTGC CCTGC
 801 CCTCC TGGAG TACGC CCGGA CCTGT GCCCA GGAGG GAATG GTGCT GTACG
 851 GCTGG ACCGA CCACA GCGCG TGCGC CCCAG TGTGC CCTGC TGGTA TGGAG
 901 TATAG GCAGT GTGTG TCCCC TTGCG CCAGG ACCTG CCAGA GCCTG CACAT
 951 CAATG AAATG TGTCA GGAGC GATGC GTGGA TGGCT GCAGC TGCCC TGAGG
 1001 GACAG CTCCT GGATG AAGGC CTCTG CGTGG AGAGC ACCGA GTGTC CCTGC
 1051 GTGCA TTCCG GAAAG CGCTA CCCTC CCGGC ACCTC CCTCT CTCGA GACTG
 1101 CAACA CCTGC ATTTG CCGAA ACAGC CAGTG GATCT GCAGC AATGA AGAAT
 1151 GTCCA GGGGA GTGCC TTGTC ACTGG TCAAT CCCAC TTCAA GAGCT TTGAC
 1201 AACAG ATACT TCACC TTCAG TGGGA TCTGC CAGTA CCTGC TGGCC CCGGA
 1251 TTGCC AGGAC CACTC CTTCT CCATT GTCAT TGAGA CTGTC CAGTG TGCTG
 1301 ATGAC CGCGA CGCTG TGTGC ACCCG CTCCG TCACC GTCCG GCTGC CTGGC
 1351 CTGCA CAACA GCCTT GTGAA ACTGA AGCAT GGGGC AGGAG TTGCC ATGGA
 1401 TGGCC AGGAC ATCCA GCTCC CCCTC CTGAA AGGTG ACCTC CGCAT CCAGC
 1451 ATACA GTGAC GGCCCT CCGTG CGCCT CAGCT ACGGG GAGGA CCTGC AGATG
 1501 GACTG GGATG GCCGC GGGAG GCTGC TGGTG AAGCT GTCCC CCGTC TATGC
 1551 CGGGA AGACC TGCCG CCTGT GTGGG AATTA CAATG GCAAC CAGGG CGACC
 1601 ACTTC CTTAC CCCCT CTGGG CTGGC GGAGC CCGGG GTGGA GGAAT TCGGG
 1651 AACGC CTGGA AGCTG CACGG GGAAT GCCAG GACCT GCAGA AGCAG CACAG
 1701 CGATC CCTGC GCCCT CAACC CGCGC ATGAC CAGGT TCTCC GAGGA GGCGT
 1751 GCGCG GTCCT GACGT CCCCC ACATT CGAGG CCTGC CATCG TGCCG TCAGC
 5 1801 CCGCT GCCCT ACCTG CCGAA CTGCC GCTAC GACGT GTGCT CCTGC TCGGA

ES 2 982 051 T3

1851 CGGCC GCGAG TGCCT GTGCG GCGCC CTGGC CAGCT ATGCC GCGGC CTGCG
 1901 CGGGG AGAGG CGTGC GCGTC GCGTG GCGCG AGCCA GGCCG CTGTG AGCTG
 1951 AACTG CCCGA AAGGC CAGGT GTACC TGCAG TGC GG GACCC CCTGC AACCT
 2001 GACCT GCCGC TCTCT CTCTT ACCCG GATGA GGAAT GCAAT GAGGC CTGCC
 2051 TGGAG GGCTG CTCTT GCCCC CCAGG GCTCT ACATG GATGA GAGGG GGGAC
 2101 TCGGT GCCCA AGGCC CAGTG CCCCT GTTAC TATGA CGGTG AGATC TTCCA
 2151 GCCAG AAGAC ATCTT CTCAG ACCAT CACAC CATGT GCTAC TGTGA GGATG
 2201 GCTTC ATGCA CTGTA CCATG AGTGG AGTCC CCGGA AGCTT GCTGC CTGAC
 2251 CTGTG CCTCA GCAGT CCCCT GTCTC ATCGC AGCAA AAGGA GCCTA TCCTG
 2301 TCGGC CCCCC ATGGT CAAGC TGGTG TGTCC CGCTG ACAAC CTGCG GGCTG
 2351 AAGGG CTCGA GTGTA CCAAA ACGTG CCAGA ACTAT GACCT GGAGT GCATG
 2401 AGCAT GGGCT GTGTC TCTGG CTGCC TCTGC CCCCC GGGCA TGGTC CGGCA
 2451 TGAGA ACAGA TGTGT GGGCC TGGAA AGGTG TCCCT GCTTC CATCA GGGCA
 2501 AGGAG TATGC CCCTG GAGAA ACAGT GAAGA TTGGC TGCAA CACTT GTGTC
 2551 TGTGC GGACC GGAAG TGGAA CTGCA CAGAC CATGT GTGTG ATGCC ACGTG
 2601 CTCCA CGATC GGCAT GGCCC ACTAC CTCAC CTTCG ACGGG CTCAA ATACC
 2651 TGTTT CCCGG GGAGT GCCAG TACGT TCTGG TGCAG GATTA CTGCG GCAGT
 2701 AACCC TGGGA CCTTT CGGAT CCTAG TGGGG AATAA GGGAT GCAGC CACCC
 2751 CTCAG TGAAA TGCAA GAAAC GGGTC ACCAT CCTGG TGGAG GGAGG AGAGA
 2801 TTAGG CTGTT TGACG GGGAG GTGAA TGTGA AGAGG CCCAT GAAGG ATGAG
 2851 ACTCA CTTTG AGGTG GTGGA GTCTG GCCGG TACAT CATTG TGCTG CTGGG
 2901 CAAAG CCCTC TCCGT GGTCT GGGAC CGCCA CCTGA GCATC TCCGT GGTCC
 2951 TGAAG CAGAC ATACC AGGAG AAAGT GTGTG GCCTG TGTGG GAATT TTGAT
 3001 GGCAT CCAGA ACAAT GACCT CACCA GCAGC AACCT CCAAG TGGAG GAAGA
 3051 CCCTG TGGAC TTTGG GAACT CCTGG AAAGT GAGCT CGCAG TGTGC TGACA
 3101 CCAGA AAAGT GCCTC TGGAC TCATC CCCTG CCACC TGCCA TAAAC ACATC
 3151 ATGAA GCAGA CGATG GTGGA TTCCT CCTGT AGAAT CCTTA CCAGT GACGT
 3201 CTTC AGGAC TGCAA CAAGC TGGTG GACCC CGAGC CATAT CTGGA TGTCT
 3251 GCATT TACCA CACCT GCTCC TGTGA GTCCA TTGGG GACTG CGCCG CATTC
 3301 TGCGA CACCA TTGCT GCCTA TGCCC ACGTG TGTGC CCAGC ATGGC AAGGT
 3351 GGTGA CCTGG AGGAC GGCCA CATTG TGCCC CCAGA GCTGC GAGGA GAGGA
 3401 ATCTC CGGGA GAACG GGTAT GAGGC TGAGT GGCGC TATAA CAGCT GTGCA
 3451 CCTGC CTGTC AAGTC ACGTG TCAGC ACCCT GAGCC ACTGG CCTGC CCTGT
 3501 GCAGT GTGTG GAGGG CTGCC ATGCC CACTG CCCTC CAGGG AAAAT CCTGG
 3551 ATGAG CTTTT TGGCC GGTGC CCTGC GTTGA CCCTG AAGAC TGTCC AGTGT GTGAG
 3601 GTGGC TGGCC GGCGT TTTGC CTCAG GAAAG AAAGT CACCT TGAAT CCCAG
 3651 TGACC CTGAG CACTG CCAGA TTTGC CACTG TGATG TTGTC AACCT CACCT
 3701 GTGAA GCCTG CCAGG AGCCG ATATC GGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC
 3751 GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA GCCAG CCACC TCCGG GTCTG AGACA CCCGG
 3801 GACTT CCGAG APTGC CACCC CTGAG TCCGG ACCCG GGTCC GAGCC CGCCA
 3851 CTTCC GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC AAGCG AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA
 3901 GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC
 3951 AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC
 4001 CCGAA TCAGG GCCAG GGTCT GAGCC TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA
 4051 GGCAC CTCTG AGTCC GCCAG ACCAG AGTCC GGACC CGGAT CTCCC GCTGG
 4101 GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA
 4151 CTGAG GAAGG TACCT CAACC GAGCC ATCCG AGGGA TCAGC TCCCG GCACC
 4201 TCAGA GTCGG CAACC CCGGA GTCTG GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC
 4251 ACCAG AGTCC GGTCC CCGGA CTTC AATC AGCAA CACCC GAGTC CGGCC
 4301 CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT
 4351 GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC
 4401 CACTG AGGAG GGCAC CAGCA CAGAA CCAAG CGAGG GCTCC GCACC CGGAA
 4451 CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GGTTC AGCAC CCGGC TCTGA GCGGG CCACA
 4501 AGTGG CAGTG AGACA CCGGG CACTT CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG
 4551 CCCAG GCATC AGTAC CGAGC CCTCT GAAGG CAGTG CGCCA GATTG TGGCG
 4601 GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG
 4651 GGATC CGGTG GCGGG GGATC CCTGG TCCCC CCGGG CAGCG GAGGC GACAA
 4701 AACTC ACACA TGCCC ACCGT GCCCA GCTCC AGAAC TCCTG GCGGG ACCGT
 4751 CAGTC TTCCT CTTCC CCCCC AAACC CAAGG ACACC CTCAT GCCTT CCCGG

ES 2 982 051 T3

4801 ACCCC TGAGG TCACA TGCCT GGTGG TGGAC GTGAG CCACG AAGAC CCTGA
 4851 GGTCA AGTTC AACTG GTACG TGGAC GGCCT GGAGG TGCAT AATGC CAAGA
 4901 CAAAG CCGCG GGAGG AGCAG TACAA CAGCA CGTAC CGTGT GGTCA GCGTC
 4951 CTCAC CGTCC TGGCC CAGGA CTGGC TGAAT GGCAA GGAGT ACAAG TGCAA
 5001 GGTCT CCAAC AAAGC CCTCC CAGCC CCCAT CGAGA AAACC ATCTC CAAAG
 5051 CCAAA GGGCA GCCCC GAGAA CCACA GGTGT ACACC CTGCC CCCAT CCCGC
 5101 GATGA GCTGA CCAAG AACCA GGTCA GCCTG ACCTG CCTGG TCAAA GGCTT
 5151 CTATC CCAGC GACAT CGCCG TGGAG TGGGA GAGCA ATGGG CAGCC GGAGA
 5201 ACAAC TACAA GACCA CGCCT CCCGT GTTGG ACTCC GACGG CTCCT TCTTC
 5251 CTCTA CAGCA AGCTC ACCGT GGACA AGAGC AGGTG GCAGC AGGGG AACGT
 5301 CTTCT CATGC TCCGT GATGC ATGAG GCTCT GCACA ACGCC TACAC GCAGA
 5351 AGAGC CTCTC CCTGT CTCCG GGTA ATGA

Secuencia proteínica de VWF058 (VWF034 con mutación IH) (SEQ ID NO: 154)

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFNVTDFGSM
 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSE SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQRVSP MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
 201 ERASPPSSSS NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
 251 EKTICECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME
 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTTEPC
 351 VHSKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLEV TGQSHFKSFD
 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFISIVIEV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
 451 LHNSLVKLLKH GAGVAMDGQD IQLPLKGLDL RIQHTVTASV RLSYGEDLQM
 501 DWDGRGRLLV KLSPPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
 551 NAWKLHGDCQ DLQKQHSDFC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCLE
 651 NCPKQVYVYQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
 701 CVPKAQPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
 751 AVLSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
 851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGEQ YVLVQDYCGS
 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKRPKDE
 951 THFEVVESEGR YIILLGLKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
 1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPD SSPATCHNNI
 1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCES CESIGDCAAF
 1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVTV RTATLCPQSC EERNLRENGY EAERYNSCA
 1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPFG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGTSESATP
 1251 ESGPGSEPAT SGSETPGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP GTSSESATPES
 1301 GPGTSTEPSE GSAPGSPAGS PTSTEEGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP
 1351 GTSESATPES GPGSPAGSPT STEEGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT
 1401 SESATPESGP GTSSESATPES GPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGSEP
 1451 ATSGSETPGS PAGESPTSTEE GTSTEPSEGS APGTSTEPSE GSAPGSEPAT
 1501 SGSETPGTSE SATPESGPGT STEPSEGSAP DSGGGGSGGG GSGGGGSGGG
 1551 GSGGGGSLVP RSGGDKTHT CPPCPAPPELL GGPSVFLFPP KPKDITMASR
 1601 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
 1651 LTVLAQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPEPSR
 1701 DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP FVLDSGGSFF
 5 1751 LYSKLTVDKS RWQQGNVFC SVMHEALHNA YTKSLSLSP GK*

Secuencia de nucleótidos de FVIII 169 (SEQ ID NO: 155)

1 ATGCA AATAG AGCTC TCCAC CTGCT TCTTT CTGTG CCTTT TCGA TTCTG
 51 CTTTA GTGCC ACCAG AAGAT ACTAC CTGGG TGCAG TGGAA CTGTC ATGGG
 101 ACTAT ATGCA AAGT ATCTC GGTGA GCTGC CTGTG GACGC AAGAT TTCTT

10

ES 2 982 051 T3

```

151  CCTAG AGTGC CAAAA TCTTT TCCAT TCAAC ACCTC AGTCG TGTAC AAAAA
201  GACTC TGTTT GTAGA ATTCA CGGAT CACCT TTTCA ACATC GCTAA GCCAA
251  GGCCA CCCTG GATGG GTCTG CTAGG TCCTA CCATC CAGGC TGAGG TTTAT
301  GATAC AGTGG TCATT ACACT TAAGA ACATG GCTTC CCATC CTGTC AGTCT
351  TCATG CTGTT GGTGT ATCCT ACTGG AAAGC TTCTG AGGGA GCTGA ATATG
401  ATGAT CAGAC CAGTC AAAGG GAGAA AGAAG ATGAT AAAGT CTTC CTTGGT
451  GGAAG CCATA CATAT GTCTG GCAGG TCCTG AAAGA GAATG GTCCA ATGGC
501  CTCTG ACCCA CTGTG CCTTA CCTAC TCATA TCTTT CTCAT GTGGA CCTGG
551  TAAAA GACTT GAATT CAGGC CTCAT TGGAG CCCTA CTAGT ATGTA GAGAA
601  GGGAG TCTGG CCAAG GAAAA GACAC AGACC TTGCA CAAAT TTATA CTAAT
651  TTTTG CTGTA TTTGA TGAAG GAAAA AGTTG GCACT CAGAA AAAAA GAACT
701  CCTTG ATGCA GGATA GGGAT GCTGC ATCTG CTCGG GCCTG GCCTA AAATG
751  CACAC AGTCA ATGGT TATGT AAACA GGTCT CTGCC AGGTC TGATT GGATG
801  CCACA GGAAT TCAGT CTATT GGCAT GTGAT TGGAA TGGGC ACCAC TCCTG
851  AAGTG CACTC AATAT TCCTC GAAGG TCACA CATTT CTTGT GAGGA ACCAT
901  CGCCA GGCTA GCTTG GAAAT CTCGC CAATA ACTTT CCTTA CTGCT CAAAC
951  ACTCT TGATG GACCT TGGAC AGTTT CTACT GTTTT GTCAT ATCTC TTCCC
1001 ACCAA CATGA TGGCA TGGAA GCTTA TGTCA AAGTA GACAG CTGTC CAGAG
1051 GAACC CCAAC TACGA ATGAA AAATA ATGAA GAAGC GGAAG ACTAT GATGA
1101 TGATC TTACT GATTC TGAAT TGGAT GTGGT CAGGT TTGAT GATGA CAACT
1151 CTCCT TCCTT TATCC AAATT CGCTC AGTTG CCAAG AAGCA TCCTA AAACT
1201 TGGGT ACATT ACATT GCTGC TGAAG AGGAG GACTG GGAAT ATGCT CCCTT
1251 AGTCC TCGCC CCCGA TGACA GAAAT TATAA AAGTC AATAT TTGAA CAATG
1301 GCCCT CAGCG GATTG GTAGG AAGTA CAAAA AAGTC CGATT TATGG CATA
1351 ACAGA TGAAA CTTTT AAGAC TCGTG AAGCT ATTCA GCATG AATCA GGAAT
1401 CTTGG GACCT TTAAT TTATG GGGAA GTTGG AGACA CACTG TTGAT TATAT
1451 TTAAG AATCA AGCAA GCAGA CCATA TAACA TCTAC CCTCA CGGAA TCACT
1501 GATGT CCGTC CTTTG TATTC AAGGA GATTA CCAAA AGGTG TAAAA CATTT
1551 GAAGG ATTTT CCAAT TCTGC CAGGA GAAAT ATTCA AATAT AAATG GACAG
1601 TGACT GTAGA AGATG GGGCA ACTAA ATCAG ATCCT CGGTG CCTGA CCCGC
1651 TATTA CTCTA GTTTC GTTAA TATGG AGAGA GATCT AGCTT CAGGA CTCAT
1701 TGGCC CTCTC CTCAT CTGCT AAAAA GAATC TGTAG ATCAA AGAGG AAACC
1751 AGATA ATGTC AGACA AGAGG AATGT CATCC TGTTT TCTGT ATTTG ATGAG
1801 AACCG AAGCT GGTAC CTCAC AGAGA ATATA CAACG CTTTC TCCCC AATCC
1851 AGCTG GAGTG GACTC TGAGG ATCCA GAGTT CCAAG CCTCC AACAT CATGC
1901 ACAGC ATCAA TGGCT ATGTT TTTGA TAGTT TGCAG TTGTC AGTTT GTTTG
1951 CATGA GGTGG CATA CAGTA CATTC TAAGC ATTGG AGCAC AGACT GACTT
2001 CCTTT CTGTC TTCTT CTCTG GATAT ACCTT CAAAC AAAAA ATGGT CTATG
2051 AAGAC AACT CACCC TATTC CCATT CTCAG GAGAA ACTGT CTCA TGTGG
2101 ATGGA AAACC CAGGT CTATG GATTC TGGGG TGCCA CAACT CAGAC TTTTG
2151 GAACA GAGGC ATGAC CGCCT TACTG AAGGT TTCTA GTTGT GACAA GAACA
2201 CTGGT GATTA TTACG AGGAC AGTTA TGAAG ATATT TCAGC ATACT TGCTG
2251 AGTAA AAACA ATGCC ATTGA ACCAA GAAGC TTCTC TCAAA ACGGC GCGCC
2301 AGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA GCCAG
2351 CCAC TCCGG GTCTG AGACA CCGGG GACTT CCGAG AGTGC CACCC CTGAG
2401 TCCGG ACCCG GGTCC GAGCC CGCCA CTTCC GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC
2451 AAGCC AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT
2501 CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG
2551 GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC CCGAA TCAGG GCCAG GGTCT GAGCC
2601 TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA GGCAC CTCTG AGTCC GCCAC ACCAG
2651 AGTCC GGACC CCGAT CTCCC GCTGG GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA
2701 TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA CTGAG GAAGG TACCT CAACC GAGCC
2751 ATCCG AGGGA TCAGC TCCCG GCACC TCAGA GTCGG CAACC CCGGA GTCTG
2801 GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC ACCAG AGTCC GGTCC CGGGA CTTCA
2851 GAATC AGCAA CACCC GAGTC CCGCC CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG
2901 TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG
2951 GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC CACTG AGGAG GGCAC CAGCA CAGAA
3001 CCAAG CGAGG GCTCC GCACC CCGAA CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GGTTC
3051 AGCAC CCGGC TCTGA GCCGG CCACA AGTGG CAGTG AGACA CCGGG CACTT

```

ES 2 982 051 T3

3101 CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG CCCAG GCACT AGTAC CGAGC CCTCT
3151 GAAGG CAGTG CGCCA GCCTC GAGCC CACCA GTCTT GAAAC GCCAT CAAGC
3201 TGAAA TAACT CGTAC TACTC TTCAG TCAGA TCAAG AGGAA ATCGA TTATG
3251 ATGAT ACCAT ATCAG TTGAA ATGAA GAAGG AAGAT TTTGA CATTT ATGAT
3301 GAGGA TGAAA ATCAG AGCCC CCGCA GCTTT CAAAA GAAAA CACGA CACTA
3351 TTTTA TTGCT GCAGT GGAGA GGCTC TGGGA TTATG GGATG AGTAG CTCCC
3401 CACAT GTTCT AAGAA ACAGG GCTCA GAGTG GCAGT GTCCC TCAGT TCAAG
3451 AAAGT TGTTT TCCAG GAATT TACTG ATGGC TCCTT TACTC AGCCC TTATA
3501 CCGTG GAGAA CTAAG TGAAC ATTTG GGACT CCTGG GGCCA TATAT AAGAG
3551 CAGAA GTTGA AGATA ATATC ATGGT AACTT TCAGA AATCA GGCCT CTCGT
3601 CCCTA TTCCT TCTAT TCTAG CCTTA TTTCT TATGA GGAAG ATCAG AGGCA
3651 AGGAG CAGAA CCTAG AAAAA ACTTT GTCAA GCCTA ATGAA ACCAA AACTT
3701 ACTTT TGGAA AGTGC AACAT CATAT GGCAC CCACT AAAGA TGAGT TTGAC
3751 TGCAA AGCCT GGGCT TATTT CTCTG ATGTT GACCT GGAAA AAGAT GTGCA
3801 CTCAG GCCTG ATTGG ACCCC TTCTG GTCTG CCACA CTAAC AACTT GAACC
3851 CTGCT CATGG GAGAC AAGTG ACAGT ACAGG AATTT GCTCT GTTTT TCACC
3901 ATCTT TGATG AGACC AAAAG CTGGT ACTTC ACTGA AAATA TGGAA AGAAA
3951 CTGCA GGGCT CCCTG CAATA TCCAG ATGGA AGATC CCACT TTTAA AGAGA
4001 ATTAT CGCTT CCATG CAATC AATGG CTACA TAATG GATAC ACTAC CTGGC
4051 TTAGT AATGG CTCAG GATCA AAGGA TTCGA TGGTA TCTGC TCAGC ATGGG
4101 CAGCA ATGAA AACAT CCATT CTATT CATTT CAGTG GACAT GTGTT CACTG
4151 TACGA AAAAA AGAGG AGTAT AAAAT GGCAC TGTAC AATCT CTATC CAGGT
4201 GTTTT TGAGA CAGTG GAAAT GTTAC CATCC AAAGC TGGAA TTTGG CGGGT
4251 GGAAT GCCTT ATTGG CGAGC ATCTA CATGC TGGGA TGAGC ACACI TTTTC
4301 TGGTG TACAG CAATA AGTGT CAGAC TCCCC TGGGA ATGGC TTCTG GACAC
4351 ATTAG AGATT TTCAG ATTAC AGCTT CAGGA CAATA TGGAC AGTGG GCCCC
4401 AAAGC TGGCC AGACT TCATT ATTCC GGATC AATCA ATGCC TGGAG CACCA
4451 AGGAG CCCTT TTCTT GGATC AAGGT GGATC TGTTG GCACC AATGA TTATT
4501 CACGG CATCA AGACC CAGGG TGCCC GTCAG AAGTT CTCCA GCCTC TACAT
4551 CTCTC AGTTT ATCAT CATGT ATAGT CTTGA TGGGA AGAAG TGGCA GACTT
4601 ATCGA GGAAG TTCCA CTGGA ACCTT AATGG TCTTC TTTGG CAATG TGGAT
4651 TCATC TGGGA TAAAA CACAA TATTT TTAAC CCTCC AATTA TTGCT CGATA
4701 CATCC GTTTG CACCC AACTC ATTAT AGCAT TCGCA GCACT CTTCG CATGG
4751 AGTTG ATGGG CTGTG ATTTA AATAG TTGCA GCATG CCATT GGGAA TGGAG
4801 AGTAA AGCAA TATCA GATGC ACAGA TTACT GCTTC ATCCT ACTTT ACCAA
4851 TATGT TTGCC ACCTG GTCTC CTTCA AAAGC TCGAC TTCAC CTCCA AGGGA
4901 GGAGT AATGC CTGGA GACCT CAGGT GAATA ATCCA AAAGA GTGGC TGCAA
4951 GTGGA CTTCC AGAAG ACAAT GAAAG TCACA GGAGT AACTA CTCAG GGAGT
5001 AAAAT CTCTG CTTAC CAGCA TGTAT GTGAA GGAGT TCCTC ATCTC CAGCA
5051 GTCAA GATGG CCATC AGTGG ACTCT CTTTT TTCAG AATGG CAAAG TAAAG
5101 GTTTT TCAGG GAAAT CAAGA CTCCT TCACA CCTGT GGTGA ACTCT CTAGA
5151 CCCAC CGTTA CTGAC TCGCT ACCTT CGAAT TCACC CCCAG AGTTG GGTGC
5201 ACCAG ATTGC CCTGA GGATG GAGGT TCTGG GCTGC GAGGC ACAGG ACCTC
5251 TACGA CAAAA CTCAC ACATG CCCAC CGTGC CCAGC TCCAG AACTC CTGGG
5301 CGGAC CGTCA GTCTT CCTCT TCCCC CCAAA ACCCA AGGAC ACCCT CATGA
5351 TCTCC CGGAC CCCTG AGGTC ACATG CGTGG TGGTG GACGT GAGCC ACGAA
5401 GACCC TGAGG TCAAG TTCAA CTGGT ACGTG GACGG CGTGG AGGTG CATAA
5451 TGCCA AGACA AAGCC GCGGG AGGAG CAGTA CAACA GCACG TACCG TGTGG
5501 TCAGC GTCCT CACCG TCCTG CACCA GGACT GGCTG AATGG CAAGG AGTAC
5551 AAGTG CAAGG TCTCC ACAA AGCCC TCCCA GCCCC CATCG AGAAA ACCAT
5601 CTCCA AAGCC AAAGG GCAGC CCCGA GAACC ACAGG TGTAC ACCCT GCCCC
5651 CATCC CGGGA TGAGC TGACC AAGAA CCAGG TCAGC CTGAC CTGCC TGGTC
5701 AAAGG CTTCT ATCCC AGCGA CATCG CCGTG GAGTG GGAGA GCAAT GGGCA
5751 GCCGG AGAAC AACTA CAAGA CCACG CCTCC CGTGT TGGAC TCCGA CGGCT
5801 CCTTC TTCCT CTACA GCAAG CTCAC CGTGG ACAAG AGCAG GTGGC AGCAG
5851 GGGAA CGTCT TCTCA TGCTC CGTGA TGCAT GAGGC TCTGC ACAAC CACTA
5901 CACGC AGAAG AGCCT CTCCC TGTCT CCGGG TAAAT GA

Secuencia proteínica de FVIII 169 (SEQ ID NO: 70)

ES 2 982 051 T3

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51 PRVPKSFPFN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251 HTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EIGHTFLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPFIQI RSVAKKHEKT
401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDLE LIIFKNQASR PYNIIYPHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551 YYSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLE PFSGETVFMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
801 SGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
851 EGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
901 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PEGSPGTSES ATPESGPGTS
951 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
1001 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGSTEPS
1051 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
1101 EDENQSPRSF QKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVQFK
1151 KVVFEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
1201 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
1251 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGE IGPLLVCHTN TLNFAHGRQV TVQEFALFFT
1301 IFDETKSWYF TENMERNCRPCNIIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
1351 LVMAQDQIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
1401 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFVLYSNKC QTPLGMASGH
1451 IRDFQITASG QYQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
1501 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
1551 SSGIKHNIFFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMEIMGCDL NSCSMPLGME
1601 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
1651 VDFQTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSQDGHQW TLFQNGKVK
1701 VFQGNQDSFT PUVNSLDPPL LTRYLRHHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
1751 YDKTHTCPCP PAPERLLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
1801 DPEVKFNWYV DQVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
1851 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPFSRDELTKNQVSLTCLV
1901 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
1951 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

Secuencia de nucleótidos de FVIII 263 (triple mutante IHH) (SEQ ID NO: 156)

1 ATGCA AATAG AGCTC TCCAC CTGCT TCTTT CTGTG CCTTT TGCGA TTCTG
51 CTTTA GTGCC ACCAG AAGAT ACTAC CTGGG TGCAG TGGAA CTGTC ATGGG
101 ACTAT ATGCA AGGCG CGCCA ACATC AGAGA GCGCC ACCCC TGAAA GTGGT
151 CCCGG GAGCG AGCCA GCCAC ATCTG GGTCT GAAAC GCCAG GCACA AGTGA
201 GTCTG CAACT CCCGA GTCCG GACCT GGCTC CGAGC CTGCC ACTAG CGGCT
251 CCGAG ACTCC GGGAA CTTCG GAGAG CGCTA CACCA GAAAG CGGAC CCGGA
301 ACCAG TACCG AACCT AGCGA GGGCT CTGCT CCGGG CAGCC CAGCC GGCTC
351 TCCTA CATCC ACGGA GGAGG GCACT TCCGA ATCCG CCACC CCGGA GTCAG
401 GGCCA GGATC TGAAC CCGCT ACCTC AGGCA GTGAG ACGCC AGGAA CGAGC
451 GAGTC CGCTA CACCG GAGAG TGGGC CAGGG AGCCC TGCTG GATCT CCTAC
501 GTCCA CTGAG GAAGG GTCAC CAGCG GGCTC GCCCA CCAGC ACTGA AGAAG
551 GTGCC TCGAG CAGTG ATCTC GGTGA GCTGC CTGTG GACGC AAGAT TTCCT
601 CCTAG AGTGC CAAA TCTTT TCCAT TCAAC ACCTC AGTCG TGTAC AAAAA
651 GACTC TGTTT GTAGA ATTCA CGGAT CACCT TTTC AACTC GCTAA GCCAA
5 701 GGCCA CCCTG GATGG GTCTG CTAGG TCCTA CCATC CAGGC TGAGG TTTAT

ES 2 982 051 T3

751 GATAC AGTGG TCATT ACACT TAAGA ACATG GCTTC CCATC CTGTC AGTCT
 801 TCATG CTGTT GGTGT ATCCT ACTGG AAAGC TTCTG AGGGA GCTGA ATATG
 851 ATGAT CAGAC CAGTC AAAGG GAGAA AGAAG ATGAT AAAGT CTTCCT CTGGT
 901 GGAAG CCATA CATAT GTCTG GCAGG TCCTG AAAGA GAATG GTCCA ATGGC
 951 CTCTG ACCCA CTGTG CCTTA CCTAC TCATA TCTTT CTCAT GTGGA CCTGG
 1001 TAAAA GACTT GAATT CAGGC CTCAT TGGAG CCCTA CTAGT ATGTA GAGAA
 1051 GGGAG TCTGG CCAAG GAAAA GACAC AGACC TTGCA CAAAT TTATA CTAAT
 1101 TTTTG CTGTA TTTGA TGAAG GGAAA AGTTG GCACT CAGAA ACAA GAACT
 1151 CCTTG ATGCA GGATA GGGAT GCTGC ATCTG CTCGG GCCTG GCCTA AAATG
 1201 CACAC AGTCA ATGGT TATGT AAACA GGTCT CTGCC AGGTC TGATT GGATG
 1251 CCACA GGAAA TCAGT CTATT GGCAT GTGAT TGGAA TGGGC ACCAC TCCTG
 1301 AAGTG CACTC AATAT TCCTC GAAGG TCACA CATT TTTGT GAGGA ACCAT
 1351 CGCCA GGCTA GCTTG GAAAT CTCGC CAATA ACTTT CCTTA CTGCT CAAAC
 1401 ACTCT TGATG GACCT TGGAC AGTTT CTACT GTTTT GTCAT ATCTC TTCCC
 1451 ACCAA CATGA TGGCA TGGAA GCTTA TGTCA AAGTA GACAG CTGTC CAGAG
 1501 GAACC CCAAC TACGA ATGAA AAATA ATGAA GAAGC GGAAG ACTAT GATGA
 1551 TGATC TTAAT GATTC TGAAG TGGAT GTGGT CAGGT TTGAT GATGA CAACT
 1601 CTCCT TCCTT TATCC AAATT CGCTC AGTTG CCAAG AAGCA TCCTA AAATG
 1651 TGGGT ACATT ACATT GCTGC TGAAG AGGAG GACTG GGACT ATGCT CCCTT
 1701 AGTCC TCGCC CCCGA TGACA GAAAT TATAA AAGTC AATAT TTGAA CAATG
 1751 GCCCT CAGCG GATTG GTAGG AAGTA CAAAA AAGTC CGATT TATGG CATACT
 1801 ACAGA TGAAG CCTTT AAGAC TCGTG AAGCT ATTCA GCATG AATCA GGAAT
 1851 CTTGG GACCT TTAAT TTATG GGGAA GTTGG AGACA CACTG TTGAT TATAT
 1901 TTAAG AATCA AGCAA GCAGA CCATA TAACA TCTAC CCTCA CGGAA TCACT
 1951 GATGT ATGTC CTTTG TATTC AAGGA GATTA CAAAA AGGTG TAAAA CATT
 2001 GAAGG ATTTT CCAAT TCTGC CAGGA GAAAT ATTCA AATAT AAATG GACAG
 2051 TGACT GTAGA AGATG GGCCA ACTAA ATCAG ATCCT CGGTG CCTGA CCCGC
 2101 TATTA CTCTA GTTTC GTTAA TATGG AGAGA GATCT AGCTT CAGGA CTCAT
 2151 TGGCC CTCTC CTCAT CTGCT ACAA GAATC TGTA ATCAA AGAGG AAACC
 2201 AGATA ATGTC AGACA AGAGG AATGT CATCC TGTTT TCTGT ATTTG ATGAG
 2251 AACCG AAGCT GGTAC CTCAC AGAGA ATATA CAACG CTTTC TCCCC AATCC
 2301 AGCTG GAGTG CAGCT TGAGG ATCCA GAGTT CCAAG CCTCC AACAT CATGC
 2351 ACAGC ATCAA TGGCT ATGTT TTTGA TAGTT TGCAG TTGTC AGTTT GTTTG
 2401 CATGA GGTGG CATACT TGGTA CATTC TAAGC ATTGG AGCAC AGACT GACTT
 2451 CCTTT CTGTC TTCTT CTCTG GATAT ACCTT CAAAC ACAA ATGGT CTATG
 2501 AAGAC ACACT CACCC TATTC CCATT CTCAG GAGAA ACTGT CTTC AATCG
 2551 ATGGA AAACC CAGGT CTATG GATTC TGGGG TGCCA CAACT CAGAC TTTCG
 2601 GAACA GAGGC ATGAC CGCCT TACTG AAGGT TTCTA GTTGT GACAA GAACA
 2651 CTGGT GATTA TTACG AGGAG AGTTA TGAAG ATATT TCAGC ATACT TGCTG
 2701 AGTAA AAACA ATGCA ATTTA ACCAA GAAGC TTCTC TCAAA AUGGC GUGCC
 2751 AGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA GCCAG
 2801 CCACC TCCGG GTCTG AGACA CCCCC GACTT CCGAG AGTGC CACCC CTGAG
 2851 TCCGG ACCCG GGTCC GAGCC CGCCA CTTC GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC
 2901 AAGCG AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT
 2951 CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG
 3001 GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC CCGAA TCAGG GCCAG GGTCT GAGCC
 3051 TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA GGCAC CTCTG AGTCC GCCAC ACCAG
 3101 AGTCC GGACC CGGAT CTCCC GCTGG GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA
 3151 TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA CTGAG GAAGG TACCT CAACC GAGCC
 3201 ATCCC AGGGA TCAGC TCCCC GCACC TCAGA GTCGG CAACC CCGGA GTCTG
 3251 GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC ACCAG AGTCC GGTCC CGGGA CTTC A
 3301 GAATC AGCAA CACCC GAGTC CCGCC CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG
 3351 TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG
 3401 GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC CACTG AGGAG GGCAC CAGCA CAGAA
 3451 CCAAG CGAGG GCTCC GCACC CCGAA CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GGTTC
 3501 AGCAC CCGGC TCTGA CCGCG CCACA AGTGG CAGTG AGACA CCGCG CACTT
 3551 CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG CCCAG GCACT AGTAC CGAGC CCTCT
 3601 GAAGG CAGTG CGCCA GCCTC GAGCC CACCA GTCTT GAAAC GCCAT CAAGC
 3651 TGAAG TAACT CGTAC TACTC TTCAG TCAGA TCAAG AGGAA ATCGA TTATG

ES 2 982 051 T3

3701 ATGAT ACCAT ATCAG TTGAA ATGAA GAAGG AAGAT TTTGA CATTT ATGAT
3751 GAGGA TGAAA ATCAG AGCCC CCGCA GCTTT CAAAA GAAAA CACGA CACTA
3801 TTTTA TTGCT GCAGT GGAGA GGCTC TGGGA TTATG GGATG AGTAG CTCCC
3851 CACAT GTTCT AAGAA ACAGG GCTCA GAGTG GCAGT GTCCC TCAGT TCAAG
3901 AAAGT TGTTC TCCAG GAATT TACTG ATGGC TCCTT TACTC AGCCC TTATA
3951 CCGTG GAGAA CTAAG TGAAC ATTTG GGAAT CCTGG GGCCA TATAT AAGAG
4001 CAGAA GTTGA AGATA ATATC ATGGT AACTT TCAGA AATCA GGCCT CTCCT
4051 CCCTA TTCCT TCTAT TCTAG CCTTA TTTCT TATGA GGAAG ATCAG AGGCA
4101 AGGAG CAGAA CCTAG AAAAA ACTTT GTCAA GCCTA ATGAA ACCAA AACTT
4151 ACTTT TGGAA AGTGC AACAT CATAT GGCAC CCACT AAAGA TGAGT TTGCA
4201 TGCAA AGCCT GGGCT TATTT CTCTG ATGTT GACCT GGAAA AAGAT GTGCA
4251 CTCAG GCCTG ATTGG ACCCC TTCTG GTCTG CCACA CTAAC ACACT GAACC
4301 CTGCT CATGG GAGAC AAGTG ACAGT ACAGG AATTT GCTCT GTTTT TCACC
4351 ATCTT TGATG AGACC AAAAG CTGGT ACTTC ACTGA AAATA TGGAA AGAAA
4401 CTGCA GGGG CCTG CAATA TCCAG ATGGA AGATC CCACT TTTAA AGAGA
4451 ATTAT CGCTT CCATG CAATC AATGG CTACA TAATG GATAC ACTAC CTGGC
4501 TTAGT AATGG CTCAG GATCA AAGGA TTCGA TGGTA TCTGC TCAGC ATGGG
4551 CAGCA ATGAA AACAT CCATT CTATT CATTT CAGTG GACAT GTGTT CACTG
4601 TACGA AAAAA AGAGG AGTAT AAAAT GGCAC TGTAC AATCT CTATC CAGGT
4651 GTTTT TGAAA CAGTG GAAAT GTTAC CATCC AAAGC TGGAA TTTGG CGGGT
4701 GGAAT GCCTT ATTGG CGAGC ATCTA CATGC TGGGA TGAGC ACACT TTTTC
4751 TGGTG TACAG CAATA AGTGT CAGAC TCCCC TGGGA ATGGC TTCTG GACAC
4801 ATTAG AGATT TTCAG ATTAC AGCTT CAGGA CAATA TGGAC AGTGG GCCCC
4851 AAAGC TGGCC AGACT TCATT ATTCC GGATC AATCA ATGCC TGGAG CACCA
4901 AGGAG CCCTT TTCTT GGATC AAGGT GGATC TGTG GCACC AATGA TTATT
4951 CACGG CACTA AGACC CAGGG TGCCC GTCAG AAGTT CTCCA GCCTC TACAT
5001 CTCTC AGTTT ATCAT CATGT ATAGT CTTGA TGGGA AGAAG TGGCA GACTT
5051 ATCGA GGAAA TTCCA CTGGA ACCTT AATGG TCTTC TTTGG CAATG TGGAT
5101 TCATC TGGGA TAAAA CACAA TATTT TTAAC CCTCC AATTA TTGCT CGATA
5151 CATCC GTTTG CACCC AACTC ATTAT AGCAT TCGCA GCACT CTTCG CATGG
5201 AGTTG ATGGG CTGTG ATTTA AATAG TTGCA GCATG CCATT GGGAA TGGAG
5251 AGTAA AGCAA TATCA GATGC ACAGA TTACT GCTTC ATCCT ACTTT ACCAA
5301 TATGT TTGCC ACCTG GTCTC CTTCA AAAGC TCGAC TTCAC CTCCA AGGGA
5351 GGAGT AATGC CTGGA GACCT CAGGT GAATA ATCCA AAAGA GTGGC TGCAA
5401 GTGGA CTTCC AGAAG ACAAT GAAAG TCACA GGAGT AACTA CTCAG GGAGT
5451 AAAAT CTCTG CTTAC CAGCA TGTAT GTGAA GGAGT TCCTC ATCTC CAGCA
5501 GTCAA GATGG CCATC AGTGG ACTCT CTTTT TTCAG AATGG CAAAG TAAAG
5551 GTTTT TCAGG GAAAT CAAGA CTCCT TCACA CCTGT GGTGA ACTCT CTAGA
5601 CCCAC CGTTA CTGAC TCGCT ACCTT CGAAT TCACC CCCAG AGTTG GGTGC
5651 ACCAG ATTGC CCTGA GGATG GAGGT TCTGG GCTGC GAGGC ACAGG ACCTC
5701 TACGA CAAAA CTCAC ACATG CCCAC CGTGC CCAGC TCCAG AACTC CTGGG
5751 CCGAC CGTCA GTCTT CCTCT TCCCC CCAAA ACCCA AGGAC ACCCT CATGG
5801 CCTCC CGGAC CCCTG AGGTC ACATG CGTGG TGGTG GACGT GAGCC ACGAA
5851 GACCC TGAGG TCAAG TTCAA CTGGT ACGTG GACGG CGTGG AGGTG CATAA
5901 TGCCA AGACA AAGCC GCGGG AGGAG CAGTA CAACA GCACG TACCG TGTGG
5951 TCAGC GTCCT CACCG TCCTG GCCCA GGACT GGCTG AATGG CAAGG AGTAC
6001 AAGTG CAAGG TCTCC AACAA AGCCC TCCCA GCCCC CATCG AGAAA ACCAT
6051 CTCCA AAGCC AAAGG GCAGC CCCGA GAACC ACAGG TGTAC ACCCT GCCCC
6101 CATCC CGCGA TGAGC TGACC AAGAA CCAGG TCAGC CTGAC CTGCC TGGTC
6151 AAAGG CTTCT ATCCC AGCGA CATCG CCGTG GAGTG GGAGA GCAAT GGGCA
6201 GCCGG AGAAC AACTA CAAGA CCACG CCTCC CGTGT TGGAC TCCGA CGGCT
6251 CCTTC TTCCT CTACA GCAAG CTCAC CGTGG ACAAG AGCAG GTGGC AGCAG
6301 GGGAA CGTCT TCTCA TGCTC CGTGA TGCAT GAGGC TCTGC ACAAC GCCTA
6351 CACGC AGAAG AGCCT CTCCC TGTCT CCGGG TAAAT GA

Secuencia proteínica de FVIII 263 (triple mutante IHH) (SEQ ID NO: 157)

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYLGAIVE LSWDYMQGAP TSESATPESG
5 51 PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG

ES 2 982 051 T3

101 TSTEPSEGS PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
 151 ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSSDL GELPVDARFP
 201 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 301 GSHTYVWQVL KENGMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 401 HTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPPEVHSIFL EGHTFLVRNH
 451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCEP
 501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVL PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 601 TDETFKTRIA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIIYPHGIT
 651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 751 NRSWYLTEINI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMMS
 851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 901 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
 951 SGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
 1001 EGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
 1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
 1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
 1151 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGTSTEPS
 1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
 1251 EDENQSPRSF QKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVQFQK
 1301 KVVFEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
 1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGA PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
 1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
 1451 IFDETKSWYF TENMERNCR PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
 1501 LVMAQDQIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
 1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TFLVLYSNKC QTPLGMASGH
 1601 IRDFQITASG QYQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
 1651 HGIKTQGARQ KESSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
 1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMEMLGCDL NSCSMPLGME
 1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
 1801 VDFQTKMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
 1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQL
 1901 YDKTHTCPPP PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMASRTPEV TCVVVDVSHE
 1951 DPEVFNWYV DGEVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL AQDWLNGKEY
 2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPSPRDEL TKNQVSLTCLV
 2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTDPVLD SDGSEFLYSK LTVDKSRWQQ
 2101 GNVFSCSVMH EALHNAYTQK SLSLSPGK*

Secuencia de nucleótidos de FVIII 282 (SEQ ID NO: 158)

1 ATGCA AATAG AGCTC TCCAC CTGCT TCTTT CTGTG CCTTT TGCGA TTCTG
 51 CTTTA GTGCC ACCAG AAGAT ACTAC CTGGG TGCGA TGGAA CTGTC ATGGG
 101 ACTAT ATGCA AAGTG ATCTC GGTGA GCTGC CTGTG GACGC AAGAT TTCCT
 151 CCTAG AGTGC CAAA TCTTT TCCAT TCAAC ACCTC AGTCG TGTAC AAAAA
 201 GACTC TGTTT TAGA ATTCA CGGAT CACCT TTCA ACATC GCTAA GCCAA
 251 GGCCA CCCTG GATGG GTCTG CTAGG TCCTA CCATC CAGGC TGAGG TTTAT
 301 GATAC AGTGG TCATT AACT TAAGA ACATG GCTTC CCATC CTGTC AGTCT
 351 TCATG CTGTT GGTGT ATCCT ACTGG AAAGC TTCTG AGGGA GCTGA ATATG
 401 ATGAT CAGC CAGTC AAAGG GAGAA AGAAG ATGAT AAAGT CTTCC CTGGT
 451 GGAAG CCATA CATAT GTCTG GCAGG TCCTG AAAGA GAATG GTCCA ATGGC
 501 CTCTG ACCCA CTGTG CCTTA CCTAC TCATA TCTTT CTCAT GTGGA CCTGG
 551 TAAAA GACTT GAATT CAGGC CTCAT TGGAG CCCTA CTAGT ATGTA GAGAA
 601 GGGAG TCTGG CCAAG GAAAA GACAC AGACC TTGCA CAAAT TTATA CTAAT
 651 TTTTG CTGTA TTGTA TGAAG GGAAA AGTTG GCACT CAGAA ACAA GAACT
 5 701 CCTTG ATGCA GGATA GGGAT GCTGC ATCTG CTCGG GCCTG GCCTA AAATG

ES 2 982 051 T3

751 CACAC AGTCA ATGGT TATGT AAACA GGTCT CTGCC AGGTC TGATT GGATG
 801 CCACA GGAAA TCAGT CTATT GGCAT GTGAT TGGAA TGGGC ACCAC TCCTG
 851 AAGTG CACTC AATAT TCCTC GAAGG TCACA CATTT CTTGT GAGGA ACCAT
 901 CGCCA GGCTA GCTTG GAAAT CTCCG CAATA ACTTT CCTTA CTGCT CAAAC
 951 ACTCT TGATG GACCT TGGAC AGTPT CTACT GTTTT GTCAT ATCTC TTCCC
 1001 ACCAA CATGA TGGCA TGGAA GCTTA TGTCA AAGTA GACAG CTGTC CAGAG
 1051 GAACC CCAAC TACGA ATGAA AAATA ATGAA GAAGC GGAAG ACTAT GATGA
 1101 TGATC TTACT GATTC TGA AA TGGAT GTGGT CAGGT TTGAT GATGA CAACT
 1151 CTCCT TCCTT TATCC AAATT CGCTC AGTTG CCAAG AAGCA TCCTA AAAPT
 1201 TGGGT ACATT ACATT GCTGC TGAAG AGGAG GACTG GGACT ATGCT CCCTT
 1251 AGTCC TCGCC CCCGA TGACA GAAGT TATAA AAGTC AATAT TTGAA CAATG
 1301 GCCCT CAGCG GATTG GTAGG AAGTA CAAA AAGTC CGATT TATGG CATAc
 1351 ACAGA TGA AA CCTTT AAGAC TCGTG AAGCT ATTCA GCATG AATCA GGAT
 1401 CTTGG GACCT TFACT TTATG GGGAA GTTGG AGACA CACTG TTGAT TATAT
 1451 TTAAG AATCA AGCAA GCAGA CCATA TAACA TCTAC CCTCA CGGAA TCACt
 1501 GATGT CCGTC CTTTG TATTC AAGGA GATTA CCAA AGGTG TAAAA CATTt
 1551 GAAGG ATTTT CCAAT TCTGC CAGGA GAAAT ATTCA AATAT AAATG GACAG
 1601 TGACT GTAGA AGATG GGCCA ACTAA ATCAG ATCCT CGGTG CCTGA CCCGC
 1651 TATTA CTCTA GTTTC GTTAA TATGG AGAGA GATCT AGCTT CAGGA CTCAc
 1701 TGGCC CTCTC CTCAT CTGCT ACAA GAATC TGTAG ATCAA AGAGG AAACC
 1751 AGATA ATGTC AGACA AGAGG AATGT CATCC TGTTT TCTGT ATTTG ATGAG
 1801 AACCG AAGCT GGTAC CTCAC AGAGA ATATA CAACG CTTTC TCCCC AATCC
 1851 AGCTG GAGTG CAGCT TGAGG ATCCA GAGTT CCAAG CCTCC AACAT CATGC
 1901 ACAGC ATCAA TGGCT ATGTT TTTGA TAGTT TGCAG TTGTC AGTTT GTTTG
 1951 CATGA GGTGG CATAc CATTC TAAGC ATTGG AGCAC AGACT GACTT
 2001 CCTTT CTGTC TTCTT CTCTG GATAT ACCTT CAAAC ACAA ATGGT CTATG
 2051 AAGAC ACACT CACCC TATTC CCATT CTCAG GAGAA ACTGT CTCA TGTCG
 2101 ATGGA AAACC CAGGT CTATG GATTC TGGGG TGCCA CAACT CAGAC TTTCG
 2151 GAACA GAGGC ATGAC CGCCT TACTG AAGGT TTCTA GTTGT GACAA GAACA
 2201 CTGGT GATTA TTACG AGGAC AGTTA TGAAG ATATT TCAGC ATACT TGCTG
 2251 AGTAA AAACA ATGCC ATTGA ACCAA GAAGC TTCTC TCAA ACGGC GCGCC
 2301 AACAT CAGAG AGCGC CACCC CTGAA AGTGG TCCCC GGAGC GAGCC AGCCA
 2351 CATCT GGGTC GGAAA CGCCA GGCAC AAGTG AGTCT GCAAC TCCCC AGTCC
 2401 GGACC TGGCT CCGAG CCTGC CACTA GCGGC TCCGA GACTC CGGGA ACTTC
 2451 CGAGA GCGCT ACACC AGAAA GCGGA CCCGG AACCA GTACC GAACC TAGCG
 2501 AGGGC TCTGC TCCGG GCAGC CCAGC CCGCT CTCCCT ACATC CACGG AGGAG
 2551 GGCAC TTCCG AATCC GCCAC CCCGG AGTCA GGGCC AGGAT CTGAA CCCGC
 2601 TACCT CAGGC AGTGA GACGC CAGGA ACGAG CGAGT CCGCT ACACC GGAGA
 2651 CTGGG CCAGG GAGCC CTGCT GGATC TCCTA CGTCC ACTGA GGAAG GGTCA
 2701 GGAGC GCGCT ACCAG CACTG AAGAA GGTGC CTGGA GUCCA CCAGT
 2751 CTTGA AACGC CATCA AGCTG AAATA ACTCG TACTA CTCTT CAGTC AGATC
 2801 AAGAG GAAAT CGATT ATGAT GATAC CATAT CAGTT GAAAT GAAGA AGGAA
 2851 GATTT TGACA TTTAT GATGA GGATG AAAAT CAGAG CCCC GCAGC TTTCA
 2901 AAAGA AAACA CGACA CTATT TTATT GCTGC AGTGG AGAGG CTCTG GGATT
 2951 ATGGG ATGAG TAGCT CCCCC CATGT TCTAA GAAAC AGGGC TCAGA GTGGC
 3001 AGTGT CCCTC AGTTC AAGAA AGTTG TTTTC CAGGA ATTTA CTGAT GGCTC
 3051 CTTTA CTCAG CCCTT ATACC GTGGA GAACt AAATG AACAT TTGGG ACTCC
 3101 TGGGG CCATA TATAA GAGCA GAAGT TGAAG ATAAT ATCAT GGTAA CTTTC
 3151 AGAAA TCAGG CCTCT CGTCC CTATT CCTTC TATTC TAGCC TTATT TCTTA
 3201 TGAGG AAGAT CAGAG GCAAG GAGCA GAACC TAGAA AAAAC TTTGT CAAGC
 3251 CTAAT GAAAC CAAAA CTTAC TTTTG GAAAG TGCAA CATCA TATGG CACC
 3301 ACTAA AGATG AGTTT GACTG CAAAG CCTGG GCTTA TTTCT CTGAT GTTGA
 3351 CCTGG AAAAA GATGT GCACT CAGGC CTGAT TGGAC CCCTT CTGGT CTGCC
 3401 ACACT AACAC ACTGA ACCCT GCTCA TGGGA GACAA GTGAC AGTAC AGGAA
 3451 TTTGC TCTGT TTTTC ACCAT CTTTG ATGAG ACCAA AAGCT GGTAC TTCAC
 3501 TGAAA ATATG GAAAG AAACt GCAGG GCTCC CTGCA ATATC CAGAT GGAAG
 3551 ATCCC ACTTT TAAAG AGAAT TATCG CTTCC ATGCA ATCAA TGGCT ACATA
 3601 ATGGA TACAC TACCT GGCTT AGTAA TGGCT CAGGA TCAA GGATT CGATG
 3651 GTATC TGCTC AGCAT GGGCA GCAAT GAAAA CATCC ATTCT ATTCA TTTCA

ES 2 982 051 T3

3701 GTGGA CATGT GTTCA CTGTA CGAAA AAAAG AGGAG TATAA AATGG CACTG
 3751 TACAA TCTCT ATCCA GGTGT TTTTG AGACA GTGGA AATGT TACCA TCCAA
 3801 AGCTG GAATT TGGCG GGTGG AATGC CTTAT TGGCG AGCAT CTACA TGCTG
 3851 GGATG AGCAC ACTTT TTCTG GTGTA CAGCA ATAAG TGTC A GACTC CCCTG
 3901 GGAAT GGCTT CTGGA CAGAT TAGAG ATTTT CAGAT TACAG CTTCA GGACA
 3951 ATATG GACAG TGGGC CCCAA AGCTG GCCAG ACTTC ATTAT TCCGG ATCAA
 4001 TCAAT GCCTG GAGCA CCAAG GAGCC CTTTT CTTGG ATCAA GGTGG ATCTG
 4051 TTGGC ACCAA TGATT ATCA CGGCA TCAAG ACCCA GGGTG CCCGT CAGAA
 4101 GTTCT CCAGC CTCTA CATCT CTCAG TTTAT CATCA TGAT AGTCT TGATG
 4151 GGAAG AAGTG GCAGA CTTAT CGAGG AAATT CCACT GGAAC CTTAA TGGTC
 4201 TTCTT TGGCA ATGTG GATTC ATCTG GGATA AAACA CAATA TTTTT AACCC
 4251 TCCAA TTATT GCTCG ATACA TCCGT TTGCA CCCAA CTCAT TATAG CATTC
 4301 GCAGC ACTCT TCGCA TGGAG TTGAT GGGCT GTGAT TTAAA TAGTT GCAGC
 4351 ATGCC ATTGG GAATG GAGAG TAAAG CAATA TCAGA TGCAC AGATT ACTGC
 4401 TTCAT CCTAC TTTAC CAATA TGTTT GCCAC CTGGT CTCCT TCAA AGCTC
 4451 GACTT CACCT CCAAG GGAGG AGTAA TGCC T GGAGA CCTCA GGTGA ATAAT
 4501 CCAA AGAGT GGCTG CAAGT GGACT TCCAG AAGAC AATGA AAGTC ACAGG
 4551 AGTAA CTA CT CAGGG AGTAA AATCT CTGCT TACCA GCATG TATGT GAAGG
 4601 AGTTC CTCAT CTCCA GCAGT CAAGA TGGCC ATCAG TGGAC TCTCT TTTTT
 4651 CAGAA TGGCA AAGTA AAGGT TTTTC AGGGA AATCA AGACT CCTTC ACACC
 4701 TGTGG TGAAC TCTCT AGACC CACCG TTACT GACTC GCTAC CTTCG AATTC
 4751 ACCCC CAGAG TTGGG TGCAC CAGAT TGCCC TGAGG ATGGA GGTTC TGGGC
 4801 TGCGA GGCAC AGGAC CTCTA CGACA AA ACT CACAC ATGCC CACCG TGCCC
 4851 AGCTC CAGAA CTCCT GGGCG GACCG TCAGT CTTC TCTTC CCCCC AAAAC
 4901 CCAAG GACAC CCTCA TGATC TCCCG GACCC CTGAG GTCAC ATGCG TGGTG
 4951 GTGGA CGTGA GCCAC GAAGA CCCTG AGGTC AAGTT CAACT GGTAC GTGGA
 5001 CGGCG TGGAG GTGCA TAATG CCAAG ACAA GCGC GGGAG GAGCA GTACA
 5051 ACAGC ACGTA CCGTG TGGTC AGCGT CCTCA CCGTC CTGCA CCAGG ACTGG
 5101 CTGAA TGGCA AGGAG TACAA GTGCA AGGTC TCCAA CAAAG CCCTC CCAGC
 5151 CCCCC TCGAG AAAAC CATCT CCAA GCCAA AGGGC AGCCC CGAGA ACCAC
 5201 AGGTG TACAC CCTGC CCCCC TCCCG GGATG AGCTG ACCAA GAACC AGGTG
 5251 AGCCT GACCT CCCTG GTCAA AGGCT TCTAT CCCAG CGACA TCGCC GTGGA
 5301 GTGGG AGAGC AATGG GCAGC CGGAG AACAA CTACA AGACC ACGCC TCCCG
 5351 TGTTG GACTC CGACG GCTCC TTCTT CCTCT ACAGC AAGCT CACCG TGGAC
 5401 AAGAG CAGGT GGCAG CAGGG GAACG TCTTC TCATG CTCCG TGATG CATGA
 5451 GGCTC TGCAC AACCA CTACA CGCAG AAGAG CCTCT CCCTG TCTCC GGGTA
 5501 AATGA

Secuencia proteínica de FVIII 282 (SEQ ID NO: 159)

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQS DL GELPVDARFP
 51 PRVPKSEFFN TSVVYKKT LF VEFTDHLFNI AKPRPFW MGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVS YWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 151 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPPEVHSIFL EGH TFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTL LM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVREF DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYN IYPHGIT
 501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDP EFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDY YED SYEDISAYLL
 751 SKNNAIEPRS FSQNGAPTSE SATPESGPGS EPATSGSETP GTSESATPES
 801 GPGSEPATSG SETPGTSESA TPESGPGTST EPSEGSAPGS PAGSPTSTEE
 851 GTSESATPES GPGSEPATSG SETPGTSESA TPESGPGSPA GSPTSTEEGS
 901 PAGSPTSTEE GASSPPVLKR HQAEITRPTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE

ES 2 982 051 T3

951 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLRNRAQSG
 1001 SVPQFKKVVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKFNETKTY FWKVQHMAP
 1101 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
 1151 FALFFTIFDE TKSIFYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1201 MDTLPLGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
 1251 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPPL
 1301 GMASGHIRDF QITASGQYGO WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1351 LAPMIIHGK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1401 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
 1451 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1501 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
 1551 QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
 1601 CEAQDLYDKT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1651 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 1701 LNGKEYKCKV SNKALPAPLE KTISKAKQP REPQVYTLPP SRDELTKNOV
 1751 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TFPVLDSDGS FFLYSKLTVD
 1801 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

Secuencia de nucleótidos de FVIII 283 (FVIII 169 con triple mutación IHH) (SEQ ID NO: 160)

1 ATGCA AATAG AGCTC TCCAC CTGCT TCTTT CTGTG CCTTT TGCGA TTCTG
 51 CTTTA GTGCC ACCAG AAGAT ACTAC CTGGG TGCAG TGGAA CTGTC ATGGG
 101 ACTAT ATGCA AAGTG ATCTC GGTGA GCTGC CTGTG GACGC AAGAT TTCCT
 151 CCTAG AGTGC CAAAA TCTTT TCCAT TCAAC ACCTC AGTCG TGATC AAAAA
 201 GACTC TGTTT GTAGA ATTCA CCGAT CACCT TTTCA ACATC GCTAA GCCAA
 251 GGCCA CCCTG GATGG GTCTG CTAGG TCCTA CCATC CAGGC TGAGG TTTAT
 301 GATAC AGTGG TCATT ACACT TAAGA ACATG GCTTC CCATC CTGTC AGTCT
 351 TCATG CTGTT GGTGT ATCCT ACTGG AAAGC TTCTG AGGGA GCTGA ATATG
 401 ATGAT CAGAC CAGTC AAAGG GAGAA AGAAG ATGAT AAAGT CTTCC CTGGT
 451 GGAAG CCATA CATAT GTCTG GCAGG TCCTG AAAGA GAATG GTCCA ATGGC
 501 CTCTG ACCCA CTGTG CCTTA CCTAC TCATA TCTTT CTCAT GTGGA CCTGG
 551 TAAAA GACTT GAATT CAGGC CTCAT TGGAG CCCTA CTAGT ATGTA GAGAA
 601 GGGAG TCTGG CCAAG GAAAA GACAC AGACC TTGCA CAAAT TTATA CTAAT
 651 TTTTG CTGTA TTTGA TGAAG GGAAA AGTTG GCACT CAGAA ACAA GAACT
 701 CCTTG ATGCA GGATA GGGAT GCTGC ATCTG CTCGG GCCTG GCCTA AAATG
 751 CACAC AGTCA ATGGT TATGT AAACA GGTCT CTGCC AGGTC TGATT GGATG
 801 CCACA GGAAA TCAGT CTATT GGCAT GTGAT TGGAA TGGGC ACCAC TCCTG
 851 AAGTG CACTC AATAT TCCTC GAAGG TCACA CATT TTTGT GAGGA ACCAT
 901 CGCCA GGCTA GCTTG GAAAT CTCGC CAATA ACTTT CCTTA CTGCT CAAAC
 951 ACTCT TGATG GACCT TGGAC AGTTT CTACT GTTTT GTCAT ATCTC TTCCC
 1001 ACCAA CATGA TGGCA TGGAA GCTTA TGTC AAGTA GACAG CTGTC CAGAG
 1051 GAACC CCAAC TACGA ATGAA AAATA ATGAA GAAGC GGAAG ACTAT GATGA
 1101 TGATC TTAAT GATTC TGAAA TGGAT GTGGT CAGGT TTGAT GATGA CAACT
 1151 TCCTT TCCTT TATCC AAAT TCGCT AGTTG CCAAG AAGCA TCCTA AAAT
 1201 TGGGT ACATT ACATT GCTGC TGAAG AGGAG GACTG GGACT ATGCT CCCTT
 1251 AGTCC TCGCC CCCGA TGACA GAAGT TATAA AAGTC AATAT TTGAA CAATG
 1301 GCCCT CAGCG GATTG GTAGG AAGTA CAAAA AAGTC CGATT TATGG CATA
 1351 ACAGA TGAAA CCTTT AAGAC TCGTG AAGCT ATTCA GCATG AATCA GGAAT
 1401 CTTGG GACCT TTAAT TTATG GGGAA GTTGG AGACA CACTG TTGAT TATAT
 1451 TTAAG AATCA AGCAA GCAGA CCATA TAACA TCTAC CCTCA CGGAA TCACT
 1501 GATGT CCGTC CTTTG TATTC AAGGA GATTA CCAA AGGTG TAAAA CATT
 1551 GAAGG ATTTT CCAAT TCTGC CAGGA GAAAT ATTCA AATAT AAATG GACAG
 1601 TGACT GTAGA AGATG GGCCA ACTAA ATCAG ATCCT CGGTG CCTGA CCCGC
 1651 TATTA CTCTA GTTTC GTTAA TATGG AGAGA GATCT AGCTT CAGGA CTCAT
 1701 TGGCC CTCTC CTCAT CTGCT ACAA GAATC TGTAG ATCAA AGAGG AAACC
 5 1751 AGATA ATGTC AGACA AGAGG AATGT CATCC TGTTT TCTGT ATTTG ATGAG

ES 2 982 051 T3

1801 AACCG AAGCT GGTAC CTCAC AGAGA ATATA CAACG CTTTC TCCCC AATCC
 1851 AGCTG GAGTG CAGCT TGAGG ATCCA GAGTT CCAAG CCTCC AACAT CATGC
 1901 ACAGC ATCAA TGGCT ATGTT TTTGA TAGTT TGCAG TTGTC AGTTT GTTTG
 1951 CATGA GGTGG CATA C TGGTA CATT C TAAGC ATTGG AGCAC AGACT GACTT
 2001 CCTTT CTGTC TTCTT CTCTG GATAT ACCTT CAAAC ACAA ATGGT CTATG
 2051 AAGAC ACACT CACCC TATT C CATT CTCAG GAGAA ACTGT CTCA TGTCG
 2101 ATGGA AAACC CAGGT CTATG GATT C TGGGG TGCCA CAACT CAGAC TTTCC
 2151 GAACA GAGGC ATGAC CGCCT TACTG AAGGT TTCTA GTTGT GACAA GAACA
 2201 CTGGT GATTA TTACG AGGAC AGTTA TGAAG ATATT TCAGC ATACT TGCTG
 2251 AGTAA AAACA ATGCC ATTGA ACCAA GAAGC TTCTC TCAAA ACGGC GCGCC
 2301 AGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA GCCAG
 2351 CCACC TCCGG GTCTG AGACA CCGGG GACTT CCGAG AGTGC CACCC CTGAG
 2401 TCCGG ACCCG GGTCC GAGCC CGCCA CTTCC GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC
 2451 AAGCG AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT
 2501 CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG
 2551 GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC CCGAA TCAGG GCCAG GGTCT GAGCC
 2601 TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA GGCAC CTCTG AGTCC GCCAC ACCAG
 2651 AGTCC GGACC CGGAT CTCCC GCTGG GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA
 2701 TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA CTGAG GAAGG TACCT CAACC GAGCC
 2751 ATCCG AGGGA TCAGC TCCCG GCACC TCAGA GTCGG CAACC CCGGA GTCTG
 2801 GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC ACCAG AGTCC GGTCC CGGGA CTCA
 2851 GAATC AGCAA CACCC GAGTC CCGCC CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG
 2901 TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG
 2951 GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC CACTG AGGAG GGCAC CAGCA CAGAA
 3001 CCAAG CGAGG GGTCC GCACC CCGAA CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GGTC
 3051 AGCAC CCGGC TCTGA GCCGG CCACA AGTGG CAGTG AGACA CCGGG CACTT
 3101 CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG CCCAG GCACT AGTAC CGAGC CCTCT
 3151 GAAGG CAGTG CGCCA GCCTC GAGCC CACCA GTCTT GAAAC GCCAT CAAGC
 3201 TGAAA TAAC TCGTAC TACTC TTCAG TCAGA TCAAG AGGAA ATCGA TTATG
 3251 ATGAT ACCAT ATCAG TTGAA ATGAA GAAGG AAGAT TTTGA CATTT ATGAT
 3301 GAGGA TGAAA ATCAG AGCCC CCGCA GCTTT CAAAA GAAAA CACGA CACTA
 3351 TTTTA TTGCT GCAGT GGAGA GGCTC TGGGA TTATG GGATG AGTAG CTCCC
 3401 CACAT GTTCT AAGAA ACAGG GCTCA GAGTG GCAGT GTCCC TCAGT TCAGG
 3451 AAAGT TGTTT TCCAG GAATT TACTG ATGGC TCCTT TACTC AGCCC TTATA
 3501 CCGTG GAGAA CTAAA TGAAC ATTTG GGACT CCTGG GGCCA TATAT AAGAG
 3551 CAGAA GTTGA AGATA ATATC ATGGT AACTT TCAGA AATCA GGCCCT CTCGT
 3601 CCCTA TTCCT TCTAT TCTAG CCTTA TTTCT TATGA GGAAG ATCAG AGGCA
 3651 AGGAG CAGAA CCTAG AAAAA ACTTT GTCAA GCCTA ATGAA ACCAA AACTT
 3701 ACTTT TGGAA AGTGC AACAT CATAT GGCAC CCACT AAAGA TGAGT TTGAC
 3751 TGCAA AGCCT GGGCT TATT T CTCTG ATGTT GACCT GGAAA AAGAT GTGCA
 3801 CTCAG GCCTG ATTGG ACCCC TTCTG GTCTG CCACA CTAAC ACACT GAACC
 3851 CTGCT CATGG GAGAC AAGTG ACAGT ACAGG AATTT GCTCT GTTTT TCACC
 3901 ATCTT TGATG AGACC AAAAG CTGGT ACTTC ACTGA AAATA TGGAA AGAAA
 3951 CTGCA GGGCT CCCTG CAATA TCCAG ATGGA AGATC CCACT TTTAA AGAGA
 4001 ATTAT CGCTT CCATG CAATC AATGG CTACA TAATG GATAC ACTAC CTGGC
 4051 TTAGT AATGG CTCAG GATCA AAGGA TTCGA TGGTA TCTGC TCAGC ATGGG
 4101 CAGCA ATGAA AACAT CCATT CTATT CATT T CAGTG GACAT GTGTT CACTG
 4151 TACGA AAAAA AGAGG AGTAT AAAAT GGCAC TGTAC AATCT CTATC CAGGT
 4201 GTTTT TGAGA CAGTG GAAAT GTTAC CATCC AAAGC TGGAA TTTGG CGGGT
 4251 GGAAT GCCTT ATTGG CGAGC ATCTA CATGC TGGGA TGAGC ACACT TTTTC
 4301 TGGTG TACAG CAATA AGTGT CAGAC TCCCC TGGGA ATGGC TTCTG GACAC
 4351 ATTAG AGATT TTCAG ATTAC AGCTT CAGGA CAATA TGGAC AGTGG GCCCC
 4401 AAAGC TGGCC AGACT TCATT ATTCC GGATC AATCA ATGCC TGGAG CACCA
 4451 AGGAG CCCTT TTCTT GGATC AAGGT GGATC TGTTG GCACC AATGA TTATT
 4501 CACGG CACTA AGACC CAGGG TGCCC GTCAG AAGTT CTCCA GCCTC TACAT
 4551 CTCTC AGTTT ATCAT CATGT ATAGT CTTGA TGGGA AGAAG TGGCA GACTT
 4601 ATCGA GGAAA TTCCA CTGGA ACCTT AATGG TCTTC TTTGG CAATG TGGAT
 4651 TCATC TGGGA TAAAA CACAA TATTT TTAAC CCTCC AATTA TTGCT CGATA
 4701 CATCC GTTTG CACCC AACTC ATTAT AGCAT TCGCA GCACT CTTCG CATGG

ES 2 982 051 T3

4751 AGTTG ATGGG CTGTG ATTTA AATAG TTGCA GCATG CCATT GGGAA TGGAG
 4801 AGTAA AGCAA TATCA GATGC ACAGA TTA CTGCTT ATCCT ACTTT ACCAA
 4851 TATGT TTGCC ACCTG GTCTC CTTC AAGC TCGAC TTCAC CTCCA AGGGA
 4901 GGAGT AATGC CTGGA GACCT CAGGT GAATA ATCCA AAAGA GTGGC TGCAA
 4951 GTGGA CTTCC AGAAG ACAAT GAAAG TCACA GGAGT AACTA CTCAG GGAGT
 5001 AAAAT CTCTG CTTAC CAGCA TGTAT GTGAA GGAGT TCCTC ATCTC CAGCA
 5051 GTCAA GATGG CCATC AGTGG ACTCT CTTTT TTCAG AATGG CAAAG TAAAG
 5101 GTTTT TCAGG GAAAT CAAGA CTCCT TCACA CCTGT GGTGA ACTCT CTAGA
 5151 CCCAC CGTTA CTGAC TCGCT ACCTT CGAAT TCACC CCCAG AGTTG GGTGC
 5201 ACCAG ATTGC CCTG GGATG GAGGT TCTGG GCTGC GAGGC ACAGG ACCTC
 5251 TACGA CAAAA CTCAC ACATG CCCAC CGTGC CCAGC TCCAG AACTC CTGGG
 5301 CGGAC CGTCA GTCTT CCTCT TCCCC CCAA ACCCA AGGAC ACCCT CATGG
 5351 CCTCC CGGAC CCCTG AGGTC ACATG CGTGG TGGTG GACGT GAGCC ACGAA
 5401 GACCC TGAGG TCAAG TTCAA CTGGT ACGTG GACGG CGTGG AGGTG CATAA
 5451 TGCCA AGACA AAGCC GCGGG AGGAG CAGTA CAACA GCACG TACCG TGTGG
 5501 TCAGC GTCCT CACCG TCCTG GCCCA GGACT GGCTG AATGG CAAGG AGTAC
 5551 AAGTG CAAGG TCTCC AACAA AGCCC TCCCA GCCCC CATCG AGAAA ACCAT
 5601 CTCCA AAGCC AAAGG GCAGC CCCGA GAACC ACAGG TGTAC ACCCT GCCCC
 5651 CATCC CGGGA TGAGC TGACC AAGAA CCAGG TCAGC CTGAC CTGCC TGGTC
 5701 AAAGG CTTCT ATCCC AGCGA CATCG CCGTG GAGTG GGAGA GCAAT GGGCA
 5751 GCCGG AGAAC AACTA CAAGA CCACG CCTCC CGTGT TGGAC TCCGA CGGCT
 5801 CCTTC TTCTT CTACA GCAAG CTCAC CGTGG ACAAG AGCAG GTGGC AGCAG
 5851 GGGAA CGTCT TCTCA TGCTC CGTGA TGCAT GAGGC TCTGC ACAAC GCCTA
 5901 CACGC AGAAG AGCCT CTCCC TGTCT CCGGG TAAAT GA

Secuencia proteínica de FVIII 283 (FVIII 169 con triple mutación IHH) (SEQ ID NO: 161)

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
 51 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 151 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TRNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPEVHSIFL EGH TFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVFED DNNSPSFIQI RSVAKKHFKT
 401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
 501 DVRLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEYEDTLTLF PFSGETVFMS
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDY YEDISAYLL
 751 SKNNALEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
 801 SGPGSEPAT S GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
 851 EGTSESATPE SGPGSEPAT S GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
 901 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
 951 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
 1001 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGTSTEPS
 1051 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
 1101 EDENQSPRSF QKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPQFK
 1151 KVVFEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
 1201 PYSFYSSLIS YEEDQRQGA E PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
 1251 KAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCHTN TLMFAHGRQV TVQEFALFFT
 1301 IFDETKSWYF TENMERN CRA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
 5 1351 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
 1401 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TFLVYSNKC QTPLGMASGH
 1451 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
 1501 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
 1551 SSGIKHNI FN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRME LMGC DL NSCSMPLGME
 1601 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNARWP QVNNPKEWLQ
 1651 VDFQTMKVT GVTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
 1701 VFQGNQDSFT PVVNSLD PPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
 1751 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPKPKD TLMASRTPEV TCVVVDVSHE
 1801 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL AQDWLNGKEY
 1851 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPFSRDEL T KNQVSLTCLV
 1901 KGFYPSDIAV EWESNGQ PEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 1951 GNVFSCSVMH EALHNAYTQK SLSLSPGK*

ES 2 982 051 T3

Secuencia de nucleótidos de pSYNFVIII 010-(FVIII_{FC} de doble cadena) (SEQ ID NO: 162)

```

1   ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGATTCTG
51  CTTTAGTGCC ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTTCATGGG
101 ACTATATGCA AAGTGATCTC GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCTT
151 CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC ACCTCAGTCG TGTACAAAAA
201 GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC GCTAAGCCAA
251 GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTTCAGTCT
351 TCATGCTGTT GGTGTATCCT ACTGGAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG
401 ATGATCAGAC CAGTCAAAGG GAGAAAAGAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT
451 GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG AAAGAGAATG GTCCAATGGC
501 CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT GTGGACCTGG
551 TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCTACTAGT ATGTAGAGAA
601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT
651 TTTTGCTGTA TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT
701 CCTTGATGCA GGATAGGGAT GCTGCATCTG CTCGGGCCCTG GCCTAAAATG
751 CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTC CTGCCAGGTC TGATTGGATG
801 CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAATGGGC ACCACTCCTG
851 AAGTCACTC AATATTCCTC GAAGTCCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
901 CCTCAGGCGT CCTTGGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCTTTA CTGCTCAAAC
951 ACTCTTGATG GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCAT ATCTCTTCCC
1001 ACCAACATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG
1051 GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA GAAGCGGAAG ACTATGATGA
1101 TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT GATGACAACT
1151 CTCCTTCCTT TATCCAAATF CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACF
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT
1251 AGTCCTCGCC CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG
1301 GCCCTCAGCG GATTGGTAGG AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAF
1351 ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCCTGAAGCT ATTCAGCATG AATCAGGAAT
1401 CTTGGGACCT TACTTTTATG GGGAAGTTGG AGACACACTG TTGATTATAT
1451 TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT
1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAGGTG TAAAACATTT
1551 GAAGGATTTT CCAATTCCTG CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG
1601 TGACTGTAGA AGATGGGCCA ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC
1651 TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA GATCTAGCTT CAGGACTCAT
1701 TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA AGAGGAAACC
1751 AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTCTGT ATTTGATGAG
1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCCAATCC
1851 AGCTGGAGTG CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC
1901 ACAGCATCAA TGGCTATGTT TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTTTG
1951 CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC ATTTGGAGCAC AGACTGACTT
2001 CCTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA ATGGTCTATG
2051 AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAAACTGT CTTTATGTCC
2101 ATGGAACACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAACF CAGACTTTCG
2151 GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA

```

ES 2 982 051 T3

2201 CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTTTCAGC ATACTTGCTG
2251 AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC TTCTCTCAA ACCCACCAGT
2301 CTTGAAACGC CATCAACGGG AAATAACTCG TACTACTCTT CAGTCAGATC
2351 AAGAGGAAAT TGACTATGAT GATACCATAT CAGTTGAAAT GAAGAAGGAA
2401 GATTTTGACA TTATGATGA GGATGAAAAT CAGAGCCCC GCAGCTTCA
2451 AAAGAAAACA CGACACTATT TTATTGCTGC AGTGGAGAGG CTCTGGGATT
2501 ATGGGATGAG TAGCTCCCCA CATGTTCTAA GAAACAGGGC TCAGAGTGGC
2551 AGTGCCCTC AGTTC AAGAA AGTTGTTTT CAGGAATTTA CTGATGGCTC
2601 CTTTACTCAG CCCTTATACC GTGGAGAACT AAATGAACAT TTGGGACTCC
2651 TGGGGCCATA TATAAGAGCA GAAGTTGAAG ATAATATCAT GGTAACTTTC
2701 AGAAATCAGG CCTCTCGTCC CTATTCCTTC TATCTAGCC TTATTTCTTA
2751 TGAGGAAGAT CAGAGGCAAG GAGCAGAACC TAGAAAAAAC TTTGTCAAGC
2801 CTAATGAAAC CAAAACCTTAC TTTTGGAAAG TGCAACATCA TATGGCACCC
2851 ACTAAAGATG AGTTTGACTG CAAAGCCTGG GCTTATTTCT CTGATGTTGA
2901 CCTGGAAAAA GATGTGCACT CAGGCCTGAT TGGACCCCTT CTGGTCTGCC
2951 ACCTAACAC ACTGAACCCT GCTCATGGGA GACAAGTGAC AGTACAGGAA
3001 TTTGCTCTGT TTTTCACCAT CTTTGATGAG ACCAAAAGCT GGTACTTCAC
3051 TGAAAATATG GAAAGAACT GCAGGGCTCC CTGCAATATC CAGATGGAAG
3101 ATCCCACTTT TAAAGAGAAT TATCGCTCC ATGCAATCAA TGGCTACATA
3151 ATGGATACAC TACCTGGCTT AGTAATGGCT CAGGATCAAA GGATTCGATG
3201 GTATCTGCTC AGCATGGGCA GCAATGAAA CATCCATTCT ATTCATTCA
3251 GTGGACATGT GTTCACTGTA CGAAAAAAG AGGAGTATAA AATGGCACTG
3301 TACAATCTCT ATCCAGGTGT TTTTGAGACA GTGGAAATGT TACCATCCAA
3351 AGCTGGAATT TGGCGGGTGG AATGCCTTAT TGGCGAGCAT CTACATGCTG
3401 GGATGAGCAC ACTTTTTCTG GTGTACAGCA ATAAGTGTCA GACTCCCCTG
3451 GGAATGGCTT CTGGACACAT TAGAGATTTT CAGATTACAG CTTCAGGACA
3501 ATATGGACAG TGGGCCCCAA AGCTGGCCAG ACTTCATTAT TCCGGATCAA
3551 TCAATGCCTG GAGCACCAAG GAGCCCTTTT CTTGGATCAA GGTGGATCTG
3601 TTGGCACCAA TGATTATTCA CGGCATCAAG ACCCAGGGTG CCCGTCAGAA
3651 GTTCTCCAGC CTCTACATCT CTCAGTTTAT CATCATGTAT AGTCTTGATG
3701 GGAAGAAGTG GCAGACTTAT CGAGGAAAT CCACTGGAAC CTTAATGGTC
3751 TTCTTTGGCA ATGTGGATTC ATCTGGGATA AAACACAATA TTTTTAACCC
3801 TCCAATTATT GCTCGATACA TCCGTTTGCA CCCAACTCAT TATAGCATTC
3851 GCAGCACTCT TCGCATGGAG TTGATGGGCT GTGATTTAAA TAGTTGCAGC
3901 ATGCCATTGG GAATGGAGAG TAAAGCAATA TCAGATGCAC AGATTACTGC
3951 TTCATCCTAC TTTACCAATA TGTTTGCCAC CTGGTCTCCT TCAAAAGCTC
4001 GACTTCACCT CCAAGGGAGG AGTAATGCCT GGAGACCTCA GGTGAATAAT
4051 CCAAAGAGT GGCTECAAGT GGACTTCCAG AAGACAATGA AAGTCACAGE
4101 AGTAACTACT CAGGGAGTAA AATCTCTGCT TACCAGCATG TATGTGAAGG
4151 AGTTCCTCAT CTCCAGCAGT CAAGATGGCC ATCAGTGGAC TCTCTTTTTT
4201 CAGAATGGCA AAGTAAAGGT TTTTCAGGGA AATCAAGACT CCTTCACACC
4251 TGTGGTGAAC TCTCTAGACC CACCGTTACT GACTCGCTAC CTTCGAATTC
4301 ACCCCAGAG TTGGGTGCAC CAGATGCCC TGAGGATGGA GGTTCGGGC
4351 TGCGAGGCAC AGGACCTCTA CGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCCC
4401 AGCTCCAGAA CTCCTGGGCG GACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAC
4451 CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCCTGGTG
4501 GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA
4551 CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA
4601 ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG
4651 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCAGC
4701 CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC
4751 AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC
4801 AGCCTGACCT GCCTGCTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA
4851 GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACA CTACAAGACC ACGCCTCCCG
4901 TGTGTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC
4951 AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTT TCATGCTCCG TGATGCATGA
5001 GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA
5051 AATGA

Secuencia proteínica de pSYNFVIII 010-(FVIII Fc de doble cadena) (SEQ ID NO: 163)

ES 2 982 051 T3

```

1   MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51  PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251 HTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EIGHTFLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLML DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MUYEDTLTLF PFSGETVFMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNPVVKR HQREITRRTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
801 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLRNRQSG
851 SVPQFKKVVV QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
901 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAERPKN FVKPNETKTY FWKVQHMAP
951 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGILIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
1001 FALFTIFIDE TKSIFYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1051 MDTLPLGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
1101 YNLYPGVFET VEMPLSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
1151 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1201 LAPMIIHGIK TQCARQKFS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1251 FFGNVDSGGI KHNIENPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
1301 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1351 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
1401 QNGKVKVFGG NQDSFTFVVN SLDPPLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
1451 CEAQDLYDKT HTCPCPAPAE LLGGPSVFLP PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1501 VDVSHEDEPV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRNV SVLTVLHQDW
1551 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNOV
1601 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD
1651 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

```

Secuencia proteínica de FVIII 195 (FVIIIc de doble cadena con dos XTEN AE144 en el aminoácido 1656 y 1900) (SEQ ID NO: 73)

5

```

1   MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51  PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251 HTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EIGHTFLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLML DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MUYEDTLTLF PFSGETVFMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNPVVKR HQREITRRTL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
801 GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
851 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSTPSCA
901 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD DTISVEMKKE

```

951 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLRNRAQSG
 1001 SVPQFKKVVV QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAERPNK FVKPNETKTY FWKVQHMAP
 1101 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
 1151 FALFFTIFDE TKSIFYFTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
 1201 PGTSESATPE SGPGSEPATG GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
 1251 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG SPTSTEEGTS
 1301 ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1351 MDTLPLGLVMA QDQIRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
 1401 YNLYPGVFET VEMPLSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
 1451 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1501 LAPMIIHGK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1551 FFGVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
 1601 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1651 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
 1701 QNGKVKVFQ NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
 1751 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1801 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 1851 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
 1901 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD
 1951 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKLSL SPGK*

Secuencia proteínica madura de pSYN-FVIII-173 (SEQ ID NO: 72)

1 ATRRYYLGA V ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFPF NTSVVYKKTLL
 51 FVEFTDHLFN IAKRPPWMM LLGPTIQAEV YDVTVITLKN MASHPVSLHA
 101 VGVSYWKASE GAEDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD
 151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA
 201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR
 251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
 301 MDLQGQFLLC HISSHQHDGM EAYVKVDSCP EEPQLRMKNN EEAEDYDDDL
 351 TDSEMDVVRP DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAE EDWDYAPLVL
 401 APDDRSYKXQ YLNNGPQRIG RKYKVRERMA YTDDEFKTR AIQHESGILG
 451 PLYGVEGVD LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRLYSRR LPKGVKHLKD
 501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYSSSFVME RDLASGLIGP
 551 LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYLTEN IQRFLPNPAG
 601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS
 651 VFFSGYTFKH KMYEDTLTL FPFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
 701 GMTALLKVSS CDKNTGDYVE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNGAPGT
 751 SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGTSE
 801 SATPESGPGT STEPSEGSAP GSPAGSPTST EEGTSESATP ESGPGSEPAT
 851 SGSETPGTSE SATPESGPGS PAGSPTSTEE GSPAGSPTST EEGTSTEPSE
 901 GSAPGTSESA TPESGPGTSE SATPESGPGT SESATPESGP GSEPATSGSE
 951 TPGSEPATSG SETPGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT STEPSEGSAP
 1001 GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAPASSP PVLKRHQREI
 1051 TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEDENQSPRS FQKTRHYFI
 1101 AAVEERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVQPF KVVVFQEFTD GSFTQPLYRG
 1151 ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI SYEEDQRQGA
 1201 EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD VDLEKDVHSG
 1251 LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDETKSWY FTEENMERNCR
 1301 APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI RWYLLSMGSN
 1351 ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GVFTVEMLP SKAGIWRVEC
 1401 LIGEHLHAGM STFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS GOYQGWAPKL
 1451 ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR QKFSSLYISQ
 1501 FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNIF NPPIIARYIR
 1551 LHPHTYSIRS TLRMELMGCD LNSCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF
 1601 ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV TGVTQGVKS
 5 1651 LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVVNSLDPP

 1701 LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LYDKTHTCPP CPAPELLGGP
 1751 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
 1801 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
 1851 AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
 1901 NNYKTTTPVL DSDGSEFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSVSM HEALHNHYTQ
 1951 KSLSLSPGK

Secuencia proteínica de FVIII 196 (FVIIIc de doble cadena con tres XTEN AE144 en el aminoácido 26,1656 y 1900) (SEQ ID NO: 74)

10

ES 2 982 051 T3

```

1   MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVGAPGS
51  SPSASTGTGP GSSPSASTGT GPGASPGTSS TGSFPGASPGT SSTGSPGSST
101 PSGATGSPGS SPSASTGTGP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
151 TASSSPGSST PSGATGSPGS STPSGATGSP GASPGTSSTG SPASSDARFP
201 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
301 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
401 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EIGHTFLVRNH
451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCEP
501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHFKT
551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEGVDTL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGELFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFOAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF PFSGETVFMS
851 MENPGLWLIG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
901 SKNNAIEPRS FSQNPVVKR HQREITRTTL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
951 GTSSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
1001 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSSTPSGA
1051 TGSPGSSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SDQBEIDYD DTISVEMKKE
1101 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLRNRAQSG
1151 SVPQFKKVVV QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
1201 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAERKKN FVKENETKTY FWKVQHMAP
1251 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
1301 FALFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
1351 PGTSESATPE SGPGSEPATs GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
1401 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG SPTSTEEGTS
1451 ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1501 MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
1551 YNLYPGVFET VEMPLSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPPL
1601 GMASGHIRDF QITASGQYGO WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1651 LAPMIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1701 FFGNVDSSGI KHNI FNPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
1751 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1801 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVT TQGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
1851 QNGKVKVFQG NQDSFPPVFN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
1901 CEAQDLYDKT HTPPCPAPPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1951 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
2001 LNGKEYKCKV SNKALPAPPE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
2051 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD
2101 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

```

Secuencia proteínica de FVIII 199 (FVIIIc de cadena sencilla con tres XTEN AE144 en el aminoácido 1656 y 1900) (SEQ ID NO: 75)

ES 2 982 051 T3

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251 HTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EIGHTFLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHFKT
401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDLE LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601 NRSWYLTENI QRFLPNEAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLE PFSGETVFMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNPPVLR HQAEITRRTL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
801 GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
851 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST
901 TGSPGSSPTS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD DTISVEMKKE
951 DFDIYDEDED QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRRAQSG
1001 SVPQFKKVVV QEFDTGSSFTQ PLYRGELENEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP
1101 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
1151 FALFTTIFDE TKSIFYTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
1201 PGTSESATPE SGPGSEPARTS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
1251 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGS TSTEEGSPAG SPTSTEEGTS
1301 ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1351 MDTLPLGLVMA QDQIRRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
1401 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
1451 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1501 LAPMIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1551 FFGNVDSGI KHNI FNPPII ARYIRLHPTH YSTRSTLRME LMGCDLNSCS
1601 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1651 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVT QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
1701 QNGKVKVQGG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRTHPQSVWH QIALRMEVLG
1751 CEAQDLYDKT HTPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1801 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
1851 LNGKEYKCKV SNKALPAPLE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
1901 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD
1951 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

Secuencia proteínica de FVIII 201 (FVIII_{FC} de cadena sencilla con tres XTEN AE144 en el aminoácido 26,1656 y 1900) (SEQ ID NO: 76)

5

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVGAPGS
51 SPSASTGTGP GSSPSASTGT GPGASPGTSS TGSPGASPGT SSTGSPGSSST
101 PSGATGSPGS SPSASTGTGP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
151 TASSSPGSSST PSGATGSPGS STPSGATGSP GASPGTSSTG SPASSDARFP
201 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
301 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
401 HTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EIGHTFLVRNH
451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHFKT
551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDLE LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR

ES 2 982 051 T3

701 YSSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 751 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF PFSGETVEMS
 851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 901 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQAEITRTTL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
 951 GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
 1001 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSTPSGA
 1051 TGSPGSSPTS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD DTISVEMKKE
 1101 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLRNRAQSG
 1151 SVPQFKKVVV QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 1201 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPRKN FVKENETKTY FWKVQHMAP
 1251 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
 1301 FALFTIFIDE TKSIFYTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
 1351 PGTSESATPE SGPGSEPAT S GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
 1401 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG SPTSTEEGTS
 1451 ESATPESGPG TSTEPSEGA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1501 MDTLPLGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
 1551 YNLYPGVFET VEMLPKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
 1601 GMASGHIRDF QITASGQYGO WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1651 LAPMIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1701 FFGNVDSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
 1751 MPLGEMSKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1801 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
 1851 QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
 1901 CEAQDLYDKT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1951 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 2001 LNGKEYKCKV SNKALPAIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
 2051 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD
 2101 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

Secuencia proteínica de FVIII 203 (FVIIIc de cadena sencilla con dos XTEN AE; un XTEN AE288 en dominio B y un XTEN AE144 en el aminoácido 1900) (SEQ ID NO: 77)

5

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
 51 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 151 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNR S LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EIGHTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PNYIYPHGIT
 501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 551 YSSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF PFSGETVEMS
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 751 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
 801 SGPGSEPAT S GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
 851 EGTSESATPE SGPGSEPAT S GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
 901 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
 951 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
 1001 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGTSTEPS
 1051 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
 1101 EDENQSPRSF QKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPQFK
 1151 KVVFEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
 1201 PYSFYSSLIS YEEDQRQGA E PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
 1251 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT

ES 2 982 051 T3

1301 IFDETKSWYF TENMERNCRG APTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES
 1351 ATPESGPGSE PATSGSETPG TSESATPESG PGTSTEPSEG SAPGTSESAT
 1401 PESGPGSPAG SPTSTEEGSP AGSPTSTEEG SPAGSPTSTE EGTSESATPE
 1451 SGPGTSTEPS EGSAPGASSA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
 1501 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
 1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
 1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
 1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
 1701 SSGIKHNI FN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
 1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
 1801 VDFQRTMKVT GVTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
 1851 VFQGNQDSFT PNVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
 1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
 1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
 2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPFSRDEL TKNQVSLTCLV
 2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 2101 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

Secuencia proteínica de FVIII 204 (FVIIIc de cadena sencilla con dos XTEN AE; un XTEN AE288 en dominio B y un XTEN AE144 en el aminoácido 403) (SEQ ID NO: 78)

5

1 MQIELSTCFE LCLLRFCFSA TRRYLGAIVE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
 51 PRVPKSFPFN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPF
 151 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRSL PGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPEVHSIFL EGTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLML DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCEP
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 401 WVHYIAEEEE DWYAPLVLA PDGAPTSTEP SEGSAPGSPA GSPTSTEEGT
 451 STEPSEGSAP GTSTEPSEGS APGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAPGTSE
 501 SATPESGPGS EPATSGSETP GTSTEPSEGS APGTSTEPSE GSAPGTSESA
 551 TPESGPGTSE SATPESGPGA SDRSYKSYQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 601 TDEFTKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDIT LIIFKNQASR FYNIYPHGIT
 651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFVDFE
 751 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLE PFSGETVFM
 851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 901 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
 951 SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
 1001 EGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
 1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
 1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
 1151 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGTSTEPS
 1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
 1251 EDENQSPRSF QKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVQPFK
 1301 KVVFEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
 1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
 1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGI IGPLLVCNTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
 1451 IFDETKSWYF TENMERNCRG APTSESATPE FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
 1501 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
 1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
 1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
 1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
 1701 SSGIKHNI FN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
 1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
 1801 VDFQRTMKVT GVTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
 1851 VFQGNQDSFT PNVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
 1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
 1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
 2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPFSRDEL TKNQVSLTCLV
 2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 2101 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

10 Secuencia proteínica de FVIII 205 (FVIIIc de cadena sencilla con dos XTEN AE; un XTEN AE288 en dominio B y un XTEN AE144 en el aminoácido 18) (SEQ ID NO: 79)

ES 2 982 051 T3

```

1      MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQGAP TSESATPESG
51     PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
101    TSTEPSEGS SA PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
151    ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSSDL GELPVDARFP
201    PRVPKSFPEF TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
251    DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
301    GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
351    GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWFKM
401    HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
451    RQASLEISPI TFLTAQTLML DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCEP
501    EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHFKT
551    WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601    TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIIYPHGIT
651    DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701    YSSFFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751    NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDEPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801    HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF PFSGETVFMS
851    MENPGLWLIG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
901    SKNNATEPRS FSQNCAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
951    SGPGESEPAT GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
1001   EGTSESATPE SGPGSEPAT GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
1051   SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
1101   ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
1151   PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPSTSTEPS
1201   EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
1251   EDENQSPRSF QKTRHYFIA AVERLDWYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPQFK
1301   KVVFQEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLCP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
1351   PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
1401   CKAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
1451   IFDETKSWYF TENMERN CRA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
1501   LVMAQDQIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
1551   VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TFLFLVYSNKC QTPLGMASGH
1601   IRDFQITASG QYQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMI I
1651   HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
1701   SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMEMLMGCDL NSCSMPLGME
1751   SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
1801   VDFQKTMKVT GVTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFQNGKVK
1851   VFQGNQDSFT FVNSLDPP LTRYLRIFPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQL
1901   YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH
1951   DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
2001   KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPFSRDEL TKNQVSLTCLV
2051   KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
2101   GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

```

Secuencia proteínica de pSYN FVIII 266 (FVIII Fc con XTEN AE42 en el aminoácido 18 y XTEN AE288 en dominio B)
SEQ ID NO: 80)

ES 2 982 051 T3

```

1   MQIELSTCFE LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP GSPAGSPTST
51  EEGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPASSS DLGELPVDAR FPPRVPKSFP
101 FNTSVVYKKT LEVFEFTDHLF NIAKPRPPWM GLLGPTIQAE VYDVTVITLK
151 NMASHPVSLH AVGVSYWKAS EGAEYDDQTS QREKEDDKVF PGGSHTYVWQ
201 VLKENGPMAS DPLCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC REGSLAKEKT
251 QTLHKFILLF AVFDEGKSWH SETKNSLMQD RDAASARAWP KMHTVNGYVN
301 RSLPGLIGCH RKSVMVHVIG MGTTPPEVHSI FLEGHTFLVR NHRQASLEIS
351 PITFLTAQTL LMDLQGFLLF CHISSHQHDG MEAYVKVDSC PEEPQLRMKN
401 NEEAEYDIDD LTDSEMDVVR FDDDNSPSFI QIRSVAKKHP KTWVHYIAAE
451 EEDWDYAPLV LAPDDRSYKS QYLNNGPQRI GRKYKKVRFM AYTDETFKTR
501 EAIQHESGIL GPLLYGEVGD TLLIIFKNQA SRPYNIYPHG ITDVRPLYSR
551 RLPKGVKHLK DFPILPGEIF KYKWTVTVED GPTKSDPRCL TRYYSSEFNM
601 ERDLASGLIG PLLICYKESV DQRGNQIMSD KRNVILFSVF DENRSWYLTE
651 NIQRFLNPA GVQLEDPEFQ ASNIMHSING YVFDLSQLSV CLHEVAYWYI
701 LSIGAQTDFL SVFFSGYTFK HKMVYEDTLT LFPFSGETVF MSMENPGLWI
751 LGCHNSDFRN RGMTALLKVS SCDKNTGDY EDSEYEDISAY LLSKNNALIEP
801 RSFSQNGAPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA
851 TSGSETPGTS ESATPESGPG TSTEPSEGS SA PGSPAGSPTS TEEGTSESAT
901 PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSETS
951 TEEGTSTEPS EGSAPGTSES ATPESGPGTS ESATPESGPG TSESATPESG
1001 PGSEPATSGS ETPGSEPATG GSETPGSPAG SPTSTEEGTS TEPSEGSAPG
1051 TSTEPSEGS SA PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGTSTE PSEGSAPASS
1101 PPVLKRHQAE ITRTTLQSDQ EEIDYDDTIS VEMKKEDFDI YDEDENQSPR
1151 SFQKTRHYF IAAVERLWDY GMSSSPHVLN NRAQSGSVQ FKKVVFQEF
1201 DGSFTQPLYR GELNEHLGLL GPYIRAEVED NIMVTFRNQA SRPYSFYSSL
1251 ISYEEDQRQC AEPKKNFVKP NETKTYFWKV QHHMAPTKDE FDCKAWAYFS
1301 DVDLEKDVHS GLIGPLLVC TNTLNPAHGR QVTVQEFALF FTIFDETKSW
1351 YFTENMERN RAPCNIQMED PTFKENYRFH AINGYIMDTL PGLVMAQDQR
1401 IRWYLLSMGS NENIHSIHFS GHVFTVRKKE EYKMALYNLY PGVFETVEML
1451 PSKAGTWRVE CLIGEHLHAG MSTLFLVYSN KCQTPLGMAS GHIRDFQITA
1501 SQQYQGWAPK LARLHYSGSI NAWSTKEPFS WIKVDLLAPM IIHGIKTQGA
1551 RQKFSLSYIS QFLIMYSLDG KKWQTYRGN TGLMVFVFGN VDSGSIKHNI
1601 FNPPIIARYI RLHPTHYSIR STLRMELMGC DLNCSMPLG MESKAISDAQ
1651 ITASSYFTNM FATWSPSKAR LHLQGRSNAW RPQVNNPKEW LQVDFQKTMK
1701 VTGVTQGVK SLLTSMYVKE FLISSQDGH QWTLFFQNGK VKVFQGNQDS
1751 FTPVNSLDP PLLTRYLRH PQSWVHQIAL RMEVLGCEAQ DLYDKTHTCP
1801 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMI SRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
1851 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
1901 LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
1951 AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
2001 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK *

```

Secuencia proteínica de pSYN FVIII 267 (FVIII Fc con XTEN AE72 en el aminoácido 18 y XTEN AE288 en dominio B)
SEQ ID NO: 81)

5

```

1   MQIELSTCFE LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP TSESATPESG
51  PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
101 TSTEPSEGS SA PGASSDLGE LPVDARFPPR VPKSFFNTS VVYKKTLEVE
151 FTDHLFNIAK PRPPWMGLLG PTIQAEVYDT VVITLKNMAS HPVSLHAVGV
201 SYWKASEGAE YDDQTSQREK EDDKVFPGGS HTYVWQVLKE NGPMASDPLC
251 LTYSYLSHVD LVKDLNSGLI GALLVCREGS LAKEKTQTLH KFILLFAVFD
301 EGKSWHSETK NSLMQDRDAA SARAWPKMHT VNGYVNRSLP GLIGCHRKSV
351 YWHVIGMGT PEVHSIFLEG HTFLVRNHRQ ASLEISPITF LTAQTLMLDL
401 GQFLLFCHIS SHQHDGMEAY VKVDSCPEEP QLRMKNNEEA EDYDDDLTDS
451 EMDVVRFD DD NSPSFIQIRS VAKKHPKTWV HYIAAEEEDW DYAPLVLAPD
501 DRYSKSYLN NGPQRIGRKY KKVRFMAYTD ETFKTREAIQ HESGILGPLL
551 YGEVGD TLLI IFKNQASRPY NIYPHGITDV RPLYSRRLPK GVKHLKDFPI
601 LPGEIFKYKW TVTVEDGPTK SDPRCLTRY Y SSVNMRDL ASGLIGPLLI

```

ES 2 982 051 T3

651 CYKESVDQRG NQIMSDKRVN ILFSVFDENR SWYL TENIQR FLPNPAGVQL
701 EDPEFQASNI MHSINGYVFD SLQLSVCLHE VAYWYILSIG AQTDFLSVFF
751 SGYTFKHKMV YEDTLTLTFPF SGETVFMSME NPLGLWILGCH NSDFRNRRGMT
801 ALLKVSSCDK NTGDYYEDSY EDISAYLLSK NNAIEPRFS QNGAPGTSSES
851 ATPESGPGSE PATSGSETPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT
901 PESGPGTSTE PSEGSAPGSP AGSPTSTEEG TSESATPESG PGSEPATSGS
951 ETPGTSESAT PESGPGSPAG SPTSTEEGSP AGSPTSTEEG TSTEPSEGS
1001 PGTSESATPE SGPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGSE PATSGSETPG
1051 SEPATSGSET PGSPAGSPTS TEEGTSTEPS EGSAPGTSTE PSEGSAPGSE
1101 PATSGSETPG TSESATPESG PGTSTEPSEG SAPASSPPVL KRHQAEITRT
1151 TLQSDQEEID YDDTISVEMK KEDFDIYDED ENQSPRSFQK KTRHYFIAAV
1201 ERLWDYGMSS SPHVLNRNAQ SGSVPQFKKV VFQEFDTGFS TQPLYRGELN
1251 EHLGLLGPYI RAEVEDNIMV TFRNQASRPY SFYSSLISYE EDQRQGAEP
1301 KNFVKNETK TYFWKVQHMH APTKDEFDCK AWAYFSDVDL EKDVHSGLIG
1351 PLLVCHTNTL NPAHGRQVTV QEFALFFTIF DETKSWYFTE NMERNCRAPC
1401 NIQMEDPTFK ENYRFHAING YIMDTLPGLV MAQDQIRRWY LLSMGSNENI
1451 HSIHFSGHVF TVRKKEEYKM ALYNLYPGVF ETVEMLPSKA GIWRVECLIG
1501 EHLHAGMSTL FLVYSNKCQT PLGMASGHIR DFQITASGQY GQWAPKLARL
1551 HYSGSINAWS TKEPFSWIKV DLLAPMLIHG IKTQGARQKF SSLYISQFII
1601 MYSLDGKKWQ TYRGNSTGTL MVFFGNVDSS GIKHNIENFP IARYIRLHP
1651 THYSIRSTLR MELMGCDLNS CSMPMGESK AISDAQITAS SYFTNMFATW
1701 SPSKARLHLQ GRSNAWRPQV NNPKEWLQVD FQKTMKVTGV TTQGVKSLLT
1751 SMYVKEFLIS SSQDGHQWTL FFQNGKVKVF QGNQDSFTPV VNSLDPPLLT
1801 RYLRIHPQSW VHQIALRMEV LGCEAQDLYD KTHTCPPCA PELLGGPSVF
1851 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
1901 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
1951 QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQPENNY
2001 KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
2051 SLSPGK*

Secuencia proteínica de pSYN FVIII 268 (FVIII Fc con XTEN AE144 en el aminoácido 18) SEQ ID NO: 82)

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQGAP TSESATPESG
51 PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
101 TSTEPSEGS SA PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
151 ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSDDL GELPVDARFP
201 PRVPSFPPFN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
301 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
401 HTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EIGHTFLVRNH
451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCEP
501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
851 MENPGLWILG CHNSDFRN RG MTALLKVSSC DKNTGDY YED SYEDISAYLL
901 SKNNAIEPR SFSQNPV LKR HQAEITRTTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
951 DFDIYDE DEN QSRSFQKKT RHYFIAAVER LDYGMSSSP HVLRNRAQSG
1001 SVPQFKKVV FQEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
1051 RNQASRPYS FYSLLISYEED QRQGAEP RKN FVKNETKTY FWKVQHMAP
1101 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
1151 FALFFTIFDE TKS WYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1201 MDTLPGLVMA QDQIRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
1251 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL

5

ES 2 982 051 T3

1301 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1351 LAPMIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1401 FFGNVDSSGI KHNI FNPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
 1451 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1501 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVT QGVKSLLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
 1551 QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
 1601 CEAQDLYDKT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1651 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 1701 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
 1751 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD
 1801 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

Secuencia proteínica de pSYN FVIII 269 (FVIII Fc con XTEN AE72 en el aminoácido 18) SEQ ID NO: 83)

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP TSESATPESG
 51 PGSEPATSGS ETPGTSESAT PEGSGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
 101 TSTEPSEGS PGASSDLGE LPVDAREFPPR VPKSEPFNTS VVYKKTLEVE
 151 FTDHLFNIK PRPPWMGLLG PTIQAEVYDT VVITLKNMAS HPVSLHAVGV
 201 SYWKASEGAE YDDQTSQREK EDDKVPFPGS HTYVWQVLKE NGPMASDFLC
 251 LTYSYLSHVD LVKDLNSGLI GALLVCREGS LAKEKTQTLH KFILLFAVFD
 301 EGKSWHSETK NSLMQDRDAA SARAWPKMHT VNGYVNRSLP GLIGCHRKSV
 351 YWHVIGMGT PEVHSIFLEG HTFLVRNHRQ ASLEISPIITF LTAQTLMLDL
 401 GQFLLEFCHIS SHQHDGMEAY VKVDSCEPEP QLRMKNNEEA EDYDDDLTDS
 451 EMDVVRFDL NSPFSFIQIRS VAKKHPKTWV HYIAAEEEDW DYAPLVLAPD
 501 DRSYKSYLN NGPQRIGRKY KVRFMAYTD ETKTREAIQ HESGILGPELL
 551 YGEVGDLLI IFKNQASRPY NIYPHGITDV RPLYSRRLPK GVKHLKDFPI
 601 LPGEIFKYK TMTVEDGPTK SDPRCLTRY SSVFVNERDL ASGLIGPLLI
 651 YFIAAVERLW DYGMSSSPHV LRNRAQSGSV PQFKKVVFE FTDGSTFQPL
 701 EDPEFQASNI MHSINGYVFD SLQLSVCLHE VAYWYILSIG AQTDFLSVFF
 751 SGYTFKHKMV YEDTLTLFFP SGETVFMSE NPGWLWILGCH NSDFRNRGMT
 801 ALLKVSSCDK NTGDYYEDSY EDISAYLLSK NNAIEPRFS QNPPVLKRHO
 851 AEITRTTLOS DQEEIDYDDT ISVEMKKEDF DIYDEDENQS PRSFQKTRH
 901 YFIAAVERLW DYGMSSSPHV LRNRAQSGSV PQFKKVVFE FTDGSTFQPL
 951 YRGELEHLG LLGPYIRAEV EDNIMVTFRN QASRPYSFYS SLISYEEDQR
 1001 QGAEPRKNEV KPNETKTYFW KVQHMAPTK DEFDCAWAY FSDVDLEKDV
 1051 HSGLIGPLLV CHTNTLNPAH GRQVTVQEFA LFTIIFDETK SWYFTENMER
 1101 NCRAPCNIQM EDPTFKENYR FHAINGYIMD TLPGLVMAQD QRIRWYLLSM
 1151 GSNENIHSIH FSGHVFVTRK KEEYKMALYN LYPGVFETVE MLPSKAGIWR
 1201 VECLIGEHLH AGMSTLFLVY SNKCQTPLGM ASGHIRDFQI TASGQYQWA
 1251 PKLARLHYS SINAWSTKEP FSWIKVDLLA PMIIHGKIQ GARQKFSSLY
 1301 ISQFIIMYSL DGKKWQTYRG NSTGTLMVFF GNVDSGSIKH NIFNPIIAR
 1351 YIRLHPTHYS IRSTLRMELM GCDLNSCSMP LGMESKAISD AQITASSYFT
 1401 NMFATWSPSK ARLHLQGRSN AWRPQVNNPK EWLQVDFQKT MKVTGVTQO
 1451 VKSLLTSMYV KEFLISSQD GHQWTLFFQN GKVKVFQGNQ DSFTPVVNSL
 1501 DPPLLTRYLR IHPQSWVHQI ALRMEVLGCE AQDLYDKTHT CPPCPAPELL
 1551 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH
 1601 NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT
 1651 ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
 1701 QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNS
 5 1751 YTQKSLSLSP GK*

Secuencia proteínica de pSYNFVIII 271 (FVIII Fc con XTEN AE42 en el aminoácido 18) SEQ ID NO: 84)

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP GSPAGSPTST
 10

ES 2 982 051 T3

51 EEGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPASSS DLGELPVDAR FPPRVPKSFP
 101 FNTSVVYKKT LFVEFTDHLF NIAKPRPPWM GLLGPTIQAE VYDTVVITLK
 151 NMASHPVSLH AVGVSYWKAS EGAEYDDQTS QREKEDDKVF PGGSHTYVWQ
 201 VLKENGPMAS DPLCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC REGSLAKEKT
 251 QTLHKFILLF AVFDEGKSWH SETKNSLMQD RDAASARAWP KMHTVNGYVN
 301 RSLPGLIGCH RKSVMYWHVIG MGTTPPEVHSI FLEGHTFLVR NHRQASLEIS
 351 PITFLTAQTL LMDLGQFLLF CHISSHQHDG MEAYVKVDSC PEEPQLRMKN
 401 NEEAEDYDDD LTDSEMDVVR FDDDNSPSFI QIRSVAKKHP KTWVHYIAAE
 451 EEDWDYAPLV LAPDDRSYKS QYLNNGPQRI GRKYKKVRFM AYTDETFKTR
 501 EAIQHESGIL GPLLYGEVGD TLLIIFKNQA SRPYNIYPHG ITDVRPLYSR
 551 RLPKGVKHLK DFPILPGEIF KYKWTVTVED GPTKSDPRCL TRYYSFVNM
 601 ERDLASGLIG PLLICYKESV DQRGNQIMSD KRNVLFSVF DENRSWYLTE
 651 NIQRFLPNPA GVQLEDPEFQ ASNIMHSING YVFDLQLSV CLHEVAYWYI
 701 LSIGAQTDFL SVFFSGYTFK HKMVYEDTTL LFPFSGETVF MSMENPGLWI
 751 LGCHNSDFRN RGMTALLKVS SCDKNTGDY EDSEYEDISAY LLSKNNAIEP
 801 RSFSQNPVVL KRHQAEITRT TLQSDQEEID YDDTISVEMK KEDFDIYDED
 851 ENQSPRSFQK KTRHYFIAAV ERLWDYGMSS SPHVLRNRAQ SGSVPQFKKV
 901 VFQEFDTGSF TQFLYRGELN EHLGLLGPYI RAEVEDNIMV TFRNQASRPY
 951 SFYSSLISYE EDQRQGAEPF KNFVKPNETK TYFWKQVHHM APTKDEFDCK
 1001 AWAYFSDVDL EKDVSGLIG PLLVCHTNTL NPAHGRQVTV QEFALFFTIF
 1051 DETKSWYFTE NMERNCRAPC NIQMEDPTFK ENYRFHAING YIMDTLPGLV
 1101 MAQDQIRRWY LLSMGSNENI HSIHFSGHVF TVRKKEEYKM ALYNLYPGVF
 1151 ETVEMLPSKA GIWRVECLIG EHLHAGMSTL FLVYSNKCQT PLGMASGHIR
 1201 DFQITASGQY GQWAPKLARL HYSGSINAW S TKEPFSWIKV DLLAPMIHG
 1251 IKTQGARQKF SSLYISQFII MYSLDGKKWQ TYRGNSTGTL MVFFGNVDSS
 1301 GIKHNI FNPP IARYIRLHP THYSIRSTLR MELMGCDLNS CSMPLGMESK
 1351 AISDAQITAS SYFTNMFATW SPSKARLHLQ GRSNAWRPQV NNPKEWLQVD
 1401 FQKTMKVTVG TQGVKSLLT SMYVKEFLIS SSQDGHQWTL FFQNGKVKVF
 1451 QGNQDSFTPV VNSLDPPLLT RYLRIHPQSW VHQIALRMEV LGCEAQDLYD
 1501 KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MTSRTPEVTC VVVDVSHEDP
 1551 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 1601 KVSNKALPAP IEKTIKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
 1651 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 1701 VFSCVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK*

Secuencia proteínica de pSYN FVIII 272 (FVIII con XTEN AE144 en el aminoácido 18 y XTEN AE244 en dominio B-sin Fc) SEQ ID NO: 85)

5

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYLLGAVE LSWDYMGGAP TSESATPESG
 51 PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
 101 TSTEPSEGS SA PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
 151 ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSSDL GELPVDARFP
 201 PRVPKSFPPEN TSVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPF
 301 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 401 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPPEVHSIFL EGHTFLVRNH
 451 RQASLEISPI TFLTAQTLML DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 601 TDEFKTRTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIIFKNQASR PYNIYPHGIT
 651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 701 YYSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 751 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVEMS
 851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 901 SKNNAIEFRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
 951 SGPSEPATSGS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE

ES 2 982 051 T3

1001 EGTSESATPE SGPGESEPAT S GSETPGTSSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
 1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEGE SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
 1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
 1151 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSSESATPE SGPSTSTEPS
 1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
 1251 EDENQSPRSF QKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVQFK
 1301 KVVFEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
 1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKENE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
 1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
 1451 IFDETKSWYF TENMERNCR A PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
 1501 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
 1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFVLVSNKC QTPLGMASGH
 1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
 1651 HGIKTQGARG KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
 1701 SSGIKHNIEN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMEMLGCDL NSCSMPLGME
 1751 SKAISDAQIT GSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
 1801 VDFQTKMKVT GVTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
 1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQLD
 1901 Y*

5 Secuencia proteínica de pSYN-FVIII-161 (SEQ ID NO: 69) (secuencia de FVIII en la posición aminoacídica 1-1457; la región subrayada representa la región Fc; el subrayado curvo representa el conector escindible entre el primer Fc y el fragmento de VWF; la región con subrayado doble representa el fragmento de VWF; la región en negrita representa el conector escindible entre el fragmento de VWF y Fc).

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
 51 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 151 GSHTYVWQVL KENGPASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNR S LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPEVH SIFL EIGHTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIFI RSVAKKHPT
 401 WVHYIAAEEE DWDIAPLVA PDDRSYKSYQ LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIFKNQASR PYNIYPHGIT
 501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF PFSGETVFMS
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 751 SKNNAIEPRS FSNQPPVLR HQREITRTTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
 801 DFDYDEDEN QSPRSFQKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLRNRAQSG
 851 SVPQFKKVVV QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 901 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKFNETKTY FWKVQHMAP
 951 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
 1001 FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1051 MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
 1101 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
 1151 GMASGHIRD F QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1201 LAPMIIHG I K TQCARQKFS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1251 FFGNVDS SGI KHNI FNPP II ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLN SCS
 1301 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1351 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVT QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
 1401 QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRHPQSWVH QIALRMEVLG

1451 CEAQDLYDKT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1501 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 1551 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
 1601 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TFPVLDSGGS FFLYSKLTVD
 1651 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGKRRRRSG GGGSGGGGSG
 1701 GGGSGGGGSG GGGSGGGGSR KRRKRSLSCR PPMVKLVCPA DNLRAEGLEC
 1751 TKTCQNYDLE CMSMGCVSGC LCPPGMVRHE NRCVALERCP CFHQGKEYAP
 1801 GETVKIGCNT CVCRDRKWC TDHVCDATCS TIGMAHYLTF DGLKYLFPGE
 1851 COYVLVQDYC GSNPGTFRIL VGNKGCSDPS VKCKKRVTL VEGGEIELFD
 1901 GEVNVKREMK DETHFEVVES GRYIILLGK ALSVWDRHL SISVVLKQTY
 1951 QEKVCGLCGN FDGIQNNDLT SSNLQVEEDP VDFGNSWKVS SQCADTRKVP
 2001 LDSSPACHN NIMKOTMVD SCRILTSDFV QDCNKLVDPE PYLDVCIYDT
 2051 CSCESTGDCA AFCDTIAAYA HVCAQHGVV TWRTATLCPQ SCEERNLREN
 2101 GYEAELWRYNS CAPACQVTCQ HPEPLACPVQ CVEGCHAHCP PGKILDELLQ
 2151 TCVDPEDCPV CEVAGRRFAS GKVKTLNPSD PEHCQICHCD VVNLTCACQ
 2201 **EPISGTSESA TPESGPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GSEPATSGSE**
 2251 **TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAPGSPA GSPTSTEEGT SESATPESGP**
 2301 **GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSPAGS PTSTEEGSPA GSPTSTEEGT**
 2351 **STEPSEGSAP GTSSESATPES GPGTSESATP ESGPGTSESA TPESGPGSEP**
 2401 **ATSGSETPGS EPATSGSETP GSPAGSPTST EEGTSTEPSE GSAPGTSTEP**
 2451 **SEGSAPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GTSTEPSEGS APDSGGGGSG**
 2501 **GGSGGGGSG GGGSGGGGSL VPRGSGGDKT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF**
 2551 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
 2601 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
 2651 REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 2701 TFPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
 2751 SPGK

Secuencia proteínica de pSYN-FVIII-170 (SEQ ID NO: 71)

1 SLSCRPPMVK LVCADNLRA EGLECTKTCQ NYDLECMSMG CVSGCLCPPG
 51 MVRHENRCVA LERCPCFHQG KEYAPGETVK IGCNTCVCRD RKWNCTDHVC
 101 DATCSTIGMA HYLTFDGLKY LFPGEQCYVL VQDYCGSNPG TFRILVGNKG
 151 CSHPSVRCKK RVTILVEGGE IELFDGEVNV KRPMKDETHF EVVESGRYII
 201 LLLGKALSVV WDRHLSISVV LKQTYQEKVC GLCGNFDGIQ NNDLTSSNLQ
 251 VEEDPVDVFN SWKSSQCAD TRKVPLDSSP ATCHNNIMKQ TMDSSCRIL
 301 TSDVFDQCNK LVDPEPYLDV CIYDTCSCES IGDCAAFCDT IAAAHVCAQ
 351 HGKVVWRTA TLCPQSCEER NRENGYEA E WRYNSCAPAC QVTCQHPEPL
 401 ACPVQCVEGC HAHCPPGKIL DELLQTCVDP EDCPVCEVAG RRFASGKKVT
 451 LNPSDPEHCQ ICHCDVNL TCEACQEPISG TSESATPESG PGSEPATSGS
 501 ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG TSTEPSEGSA
 551 PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
 601 SPAGSPTS EGSAGSPTS TEEGTSTEPS EGSAGTSES ATPESGPGTS
 651 ESATPESGPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGSEPATS GSETPGSPAG
 701 SPTSTEEGTS TEPSEGSAPG TSTEPSEGSA PGSEPATSGS ETPGTSESAT
 751 PESGPGTSTE PSEGSAPDSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSLVPRGS
 801 GGASATRRYY LGAVELSWDY MQSDLGELPV DARFPPRVPK SFFFNSTSVVY
 851 KKTFLVEFTD HLFNIAKPRP PWMGLLGP TI QAEVYDVTVI TLKNMASHPV
 901 SLHAVGVSYW KASEGAEYDD QTSQREKEDD KVFPGGSHY VWQVLKENG
 951 MASDPLCLTY SYLSHVDLVK DLNSGLIGAL LVCREGSLAK EKTQTLHKFI
 1001 LFFAVFDEGK SWHSETKNSL MQDRDAASAR AWPKMHTVNG YVNRSLPGLI
 1051 GCHRKSVYWH VIGMGTTEPV HSIFLEGHTF LVRNHRQASL EISPITFLTA
 1101 QTLLMDLGQF LLFCHISSHQ HDGMEAYVKV DSCPEEPQLR MKNNEEAEDY
 1151 DDDLTDSEMD VVRFDDNSP SFIQIRSVAK KHPKTWVHYI AAEEEDWDYA
 1201 PLVLAPDRS YKSQYLNNGP QRIGRKYKVV RFMAYTDEF KTREAIQHE
 1251 GILGPLLYGE VGD TLLIIFK NQASRPYNIY PHGITDVRPL YSRRLPKGVK
 1301 HLKDFPILPG EIFKYKWTVT VEDGPTKSDP RCLTRYSSSF VNMRDLASG
 1351 LIGPLLYCYK ESDVQRGNQI MSDKRNVLV SVFDENRSWY LTENIQRFPL
 1401 NPAGVQLED P EFQASNIMHS INGVVFDLSIQ LSVCLHEVAY WYILSIGAQT

ES 2 982 051 T3

```

1451 DFLSVFFESGY TFKHKMVYED TLTLFPFSGE TVFMSMENPG LWILGCHNSD
1501 FRNRGMTALL KVSSCDKNTG DYYEDSYEDI SAYLLSKNNA IEPRSFQNP
1551 PVLKRHQREI TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEEDENQSPRS
1601 FQKTRHYFI AVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVPQF KKVVFQEFTE
1651 GSFTQPLYRG ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI
1701 SYEEDQRQGA EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD
1751 VDLEKDVHSG LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDEKSWY
1801 FTEENMERNCR APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI
1851 RWYLLSMGSN ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GVFETVEMLP
1901 SKAGIWRVEC LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPPLGMASG HIRDFQITAS
1951 GQYGGWAPKL ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR
2001 QKFSSLYISQ FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNIF
2051 NPPIIARYIR LHPHYSIRS TLRMELMGCD LNSCSMPLGM ESKAISDAQI
2101 TASSYFTNMF ATWSESKARL HLQGRSNAWR PQVNNPEKWL QVDFQKTMKV
2151 TGVTTQGVKS LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF
2201 TPVNSLDDP LLTRYLRIHP QSVVHQIALR MEVLGCEAQD LY

```

Secuencia de nucleótidos de pSYN FVIII 310 (que codifica FVIII con eliminación completa del dominio B excepto 2 residuos aminoácidos y XTEN AE288 insertado después del aa 742) (SEQ ID NO: 170)

5

```

1 ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGATTCTG
51 CTTTAGTGCC ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAAGTGGAA CTGTCATGGG
101 ACTATATGCA AAGTGATCTC GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCCT
151 CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC ACCTCAGTCG TGTACAAAAA
201 GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTCAACATC GCTAAGCCAA
251 GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT
351 TCATGCTGTT GGTGTATCCT ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG
401 ATGATCAGAC CAGTCAAAGG GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT
451 GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG AAAGAGAATG GTCCAATGGC
501 CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT GTGGACCTGG
551 TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
601 GGGACTCTGG CAAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT
651 TTTTGCTGTA TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT
701 CCTTGATGCA GGATAGGGAT GCTGCATCTG CTCGGGCCTG GCCTAAAAATG
751 CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT CTGCCAGGTC TGATTGGATG
801 CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAAATGGGC ACCACTCCTG
851 AAGTGCACCT AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
901 CGCCAGGCGT CCTTGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC
951 ACTCTTGATG GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCAT ATCTCTTCCC
1001 ACCAACATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG
1051 GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA GAAGCGGAAG ACTATGATGA
1101 TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT GATGACAACT
1151 CTCTTCTCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAAC
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT
1251 AGTCTCGCC CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG
1301 GCCCTCAGCG GATTGGTAGG AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATA
1351 ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT ATTCAGCATG AATCAGGAAT
1401 CTTGGGACCT TACTTTTATG GGGAAAGTTG AGACACACTG TTGATTATAT
1451 TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT
1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CAAAAGGTG TAAAACATTT
1551 GAAGGATTTT CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG
1601 TGACTGTAGA AGATGGGCCA ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC
1651 TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA GATCTAGCTT CAGGACTCAT
1701 TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA AGAGGAAACC
1751 AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCAATCC

```

ES 2 982 051 T3

1851 AGCTGGAGTG CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC
 1901 ACAGCATCAA TGGCTATGTT TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTGTTG
 1951 CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTTCTAAGC ATTTGGAGCAC AGACTGACTT
 2001 CCTTTCTGTG TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA ATGGTCTATG
 2051 AAGACACACT CACCCTATTC CCATTTCTCAG GAGAAACTGT CTTTATGTCG
 2101 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAACCT CAGACTTTTCG
 2151 GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA
 2201 CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTTTCAGC ATACTTGCTG
 2251 AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC TTCCGTACCT CAGAGTCTGC
 2301 TACCCCGAG TCAGGGCCAG GATCAGAGCC AGCCACCTCC GGGTCTGAGA
 2351 CACCCGGGAC TTCCGAGAGT GCCACCCCTG AGTCCGGACC CGGGTCCGAG
 2401 CCCGCCACTT CCGGCTCCGA AACTCCCGGC ACAAGCGAGA GCGTACCCC
 2451 AGAGTCAGGA CCAGGAACAT CTACAGAGCC CTCTGAAGGC TCCGCTCCAG
 2501 GGTCCCCAGC CGGCAGTCCC ACTAGCACCG AGGAGGGAAC CTCTGAAAGC
 2551 GCCACACCCG AATCAGGGCC AGGGTCTGAG CCTGCTACCA GCGGCAGCGA
 2601 GACACCAGGC ACCTCTGAGT CCGCCACACC AGAGTCCGGA CCCGGATCTC
 2651 CCGTGGGAG CCCACCTCC ACTGAGGAGG GATCTCCTGC TGGCTCTCCA
 2701 ACATCTACTG AGGAAGGTAC CTCACCCGAG CCATCCGAGG GATCAGCTCC
 2751 CGGCACCTCA GAGTCGGCAA CCCCGGAGTC TGGACCCGGA ACTTCCGAAA
 2801 GTGCCACACC AGAGTCCGGT CCCGGGACTT CAGAATCAGC AACACCCGAG
 2851 TCCGGCCCTG GGTCTGAACC CGCCACAAGT GGTAGTGAGA CACCAGGATC
 2901 AGAAGCTGCT ACCTCAGGGT CAGAGACACC CGGATCTCCG GCAGGCTCAC
 2951 CAACCTCCAC TGAGGAGGGC ACCAGCACAG AACCAAGCGA GGGTCCGCA
 3001 CCCGGAACAA GCACTGAACC CAGTGAGGGT TCAGCACCCG GCTCTGAGCC
 3051 GGCCACAAGT GGCAGTGAGA CACCCGGCAC TTCAGAGAGT GCCACCCCGG
 3101 AGAGTGGCCC AGGCACTAGT ACCGAGCCCT CTGAAGGCAG TCGCCAGCC
 3151 TCGAGCGAAA TAACTCGTAC TACTCTTCAG TCAGATCAAG AGGAAATCGA
 3201 TTATGATGAT ACCATATCAG TTGAAATGAA GAAGGAAGAT TTTGACATTT
 3251 ATGATGAGGA TGAAAATCAG AGCCCCGCA GCTTTCAAAA GAAAACACGA
 3301 CACTATTTTA TTGCTGCAGT GGAGAGGCTC TGGGATTATG GGATGAGTAG
 3351 CTCCCCACAT TTCTAAGAA ACAGGGCTCA GAGTGGCAGT GTCCCTCAGT
 3401 TCAAGAAAGT TGTTTTCCAG GAATTTACTG ATGGCTCCTT TACTCAGCCC
 3451 TTATACCGTG GAGAACTAAA TGAACATTTG GGACTCCTGG GGCCATATAT
 3501 AAGAGCAGAA GTTGAAGATA ATATCATGGT AACTTTTCAGA AATCAGGCCT
 3551 CTGTCCTTA TTCCTTCTAT TCTAGCCTTA TTTCTTATGA GGAAGATCAG
 3601 AGGCAAGGAG CAGAACCCTAG AAAAAACTTT GTCAAGCCTA ATGAAACCAA
 3651 AACTTACTTT TGAAAGTGC AACATCATAT GGCACCCACT AAAGATGAGT
 3701 TTGACTGCAA AGCCTGGGCT TATTTCTCTG ATGTTGACCT GGAAAAAGAT
 3751 GTGCACTGAC GCCTGATTGG ACCCCTTCTG GTCTGCCACA CTAACACACT
 3801 GAACCTTGC TATGGGAGAC AAGTGCAGCT ACAGGAAITTT GCTCTGTTTTT
 3851 TCACCATCTT TGATGAGACC AAAAGCTGGT ACTTCACTGA AAATATGGAA
 3901 AGAAACTGCA GGGCTCCCTG CAATATCCAG ATGGAAGATC CCACTTTTAA
 3951 AGAGAATTAT CGCTTCCATG CAATCAATGG CTACATAATG GATACACTAC
 4001 CTGGCTTAGT AATGGCTCAG GATCAAAGGA TTCGATGGTA TCTGCTCAGC
 4051 ATGGGCAGCA ATGAAAACAT CCATTTCTATT CATTTCAGTG GACATGTGTT
 4101 CACTGTACGA AAAAAAGAGG AGTATAAAAT GGCACCTGTAC AATCTCTATC
 4151 CAGGTGTTTT TGAGACAGTG GAAATGTTAC CATCCAAAGC TGGAATTTGG
 4201 CGGGTGGAAT GCCTTATTGG CGAGCATCTA CATGCTGGGA TGAGCACACT
 4251 TTTTCTGGTG TACAGCAATA AGTGTGAGAC TCCCCTGGGA ATGGCTTCTG
 4301 GACACATTAG AGATTTTCAG ATTACAGCTT CAGGACAATA TGGACAGTGG
 4351 GCCCCAAAGC TGGCCAGACT TCATTTATCC GGATCAATCA ATGCCTGGAG
 4401 CACCAAGGAG CCCTTTTCTT GGATCAAGGT GGATCTGTTG GCACCAATGA
 4451 TTATTCACGG CATCAAGACC CAGGGTGCCC GTCAGAAGTT CTCCAGCCTC
 4501 TACATCTCTC AGTTTATCAT CATGTATAGT CTTGATGGGA AGAAGTGGCA
 4551 GACTTATCGA GGAAATCCA CTGGAACCTT AATGGTCTTC TTTGGCAATG
 4601 TGGATTCATC TGGGATAAAA CACAATATTT TTAACCTCC AATTATGCT
 4651 CGATACATCC GTTTGCACCC AACTCATTAT AGCATTCCGA GCACTCTTCG
 4701 CATGGAGTTG ATGGGCTGTG ATTTAAATAG TTGCAGCATG CCATTTGGAA
 4751 TGGAGAGTAA AGCAATATCA GATGCACAGA TTACTGCTTC ATCCTACTTT

ES 2 982 051 T3

```

4801 ACCAATATGT TTGCCACCTG GTCTCCTTCA AAAGCTCGAC TTCACCTCCA
4851 AGGGAGGAGT AATGCCTGGA GACCTCAGGT GAATAATCCA AAAGAGTGGC
4901 TGCAAGTGGG CTTCCAGAAG ACAATGAAAG TCACAGGAGT AACTACTCAG
4951 GGAGTAAAA CTCTGCTTAC CAGCATGTAT GTGAAGGAGT TCCTCATCTC
5001 CAGCAGTCAA GATGGCCATC AGTGGACTCT CTTTTTTCAG AATGGCAAAG
5051 TAAAGGTTTT TCAGGGAAAT CAAGACTCCT TCACACCTGT GGTGAACTCT
5101 CTAGACCCAC CGTTACTGAC TCGCTACCTT CGAATTCACC CCCAGAGTTG
5151 GGTGCACCAG ATTGCCCTGA GGATGGAGGT TCTGGGCTGC GAGGCACAGG
5201 ACCTTACGTA CAAAACCTAC ACATGCCACAC CGTGCCACG TCCAGAACTC
5251 CTGGGGCGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAACCCA AGGACACCCT
5301 CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC
5351 ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
5401 CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG
5451 TGTGGTFCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AATGGCAAGG
5501 AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA
5551 ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT
5601 GCCCCATCC CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC
5651 TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT
5701 GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCACG CCTCCCGTGT TGGACTCCGA
5751 CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC
5801 AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC
5851 CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT CCGGGTAAAT GA

```

Secuencia proteínica de pSYN FVIII 310 (FVIII con eliminación completa del dominio B excepto 2 residuos aminoácidos y XTEN AE288 insertado después del aa 742) (SEQ ID NO: 171)

5

```

1 ATRRYLGVAV ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFPE NTSVVKKTL
51 FVEFTDHLFN IAKPRPPWVG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHPVSLSHA
101 VGVSYWKASE GAEYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD
151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSILAKEYTQ TLHKFILLFA
201 VFDEGKSWHS ETKNLSMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR
251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVCR HRQASLEISP ITFLTAQTL
301 MDLGGFLLFC HISSHQHDMG EAYVKVDSCE EEPQLRMKN EEAEDYDDDL
351 TDSEMDVVRF DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAE EDWDYAPLVL
401 APDDRSYKSQ YLNNGPQRIG RKYKKVRFMA YDDEFKTR EAIQHEGILG
451 PLYGVEGDT LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSRR LPKGVKHLKD
501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYSSSFVNME RDLASGLIG
551 LLICVKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYLTEN IQRFLPNPAG
601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS
651 VFFSGYTFKH KMYEDTITL FPFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
701 GMTALLKVSS CDKNTGDYFE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFGTSESATP
751 ESGPGSEPAT SGSETPGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP GTSESATPES
801 GPGTSTEPSE GSAPGSPAGS PTSTEEGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP
851 GTSESATPES GPGSPAGSPT STEEGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT
901 SESATPESGP GTSESATPES GPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGSEP
951 ATSGSETPGS PAGSPTSTEE GTSTEPSEGS APGTSTEPSE GSAPGSEPAT
1001 SGSETPGTSE SATPESGPGT STEPSEGSAP ASSEITRRTL QSDQEEIDYD
1051 DTISVEMKKE DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
1101 HVLNRRAQSG SVFQFKKVV FQEFDTGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA
1151 EVEDNIMVTF RNQASRPYSE YSSLISYEED QRQCAEPRKN FVKPNETKTY
1201 FWKVQHMAP TKDEFDCXAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP
1251 AHGRQVTVQE FALFFTIIDE TKSIFYTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN
1301 YRFHAINGYI MDTLPLGLVMA QDQIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV
1351 RKKEEYKMAL YNLYPGVFET VEMLPKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL
1401 VYSNKCQTPG GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK
1451 EPPSWIKVDL LAPMIIHGK TQGARQKFS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY
1501 RGNSTGTLMV FFGNVDSGI KHNI FNPPII ARYIRLHPHT YSIRSTLRME

1551 LMGCDLNSCS MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR
1601 SNAWREQVNN PKEWLQVDFQ KTMKVTGVT QGVKSLTSM YVKEFLISSS
1651 QDGHQWTLFF QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH
1701 QIALRMEVLG CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
1751 SRTPEVTCV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
1801 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
1851 SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQFENNYKT TPPVLDSDGS
1901 FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

```

10 Secuencia de nucleótidos de pSYN FVIII 312 (que codifica FVIII con eliminación completa del dominio B excepto 5 residuos aminoácidos y XTEN AE288 insertado después del aa 745-versión B5) (SEQ ID NO: 172)

ES 2 982 051 T3

1 ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGGGATTCTG
 51 CTTTAGTGCC ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCAATGGG
 101 ACTATATGCA AAGTGATCTC GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCT
 151 CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC ACCTCAGTCG TGTACAAAAA
 201 GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC GCTAAGCCAA
 251 GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
 301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAATCT
 351 TCATGCTGTT GGTGTATCCT ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG
 401 ATGATCAGAC CAGTCAAAGG GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT
 451 GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG AAAGAGAATG GTCCAATGGC
 501 CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT GTGGACCTGG
 551 TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
 601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT
 651 TTTTGTCTGA TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT
 701 CCTTGATGCA GGATAGGGAT GCTGCATCTG CTCGGGCTCG GCCTAAAATG
 751 CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT CTGCCAGGTC TGATTGGATG
 801 CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAAATGGG ACCACTCCTG
 851 AAGTGCACCT AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
 901 CGCCAGGCGT CCTTGAAAAT CTCGCCAATA ACTTTCTTTA CTGCTCAAAC
 951 ACTCTTGATG GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTGAT ATCTCTTCCC
 1001 ACCAACATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG
 1051 GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA GAAGCGGAAG ACTATGATGA
 1101 TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT GATGACAACT
 1151 CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAAC
 1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT
 1251 AGTCTTCGCC CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG
 1301 GCCCTCAGCG GATTGGTAGG AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATA
 1351 ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT ATTCAGCATG AATCAGGAAT
 1401 CTTGGGACCT TACTTTTATG GGGAAAGTTG AGACACACTG TTGATTATAT
 1451 TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT
 1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAGGTG TAAAACATTT
 1551 GAAGGATTTT CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG
 1601 TGACTGTAGA AGATGGGCCA ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC
 1651 TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA GATCTAGCTT CAGGACTCAT
 1701 TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA AGAGGAAACC
 1751 AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
 1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCCAATCC
 1851 AGCTGGAGTG CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC
 1901 ACAGCATCAA TGGCTATGTT TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTGTTG
 1951 CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC ATTGGAGCAC AGACTGACTT
 2001 CCTTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA ATGGTCTATG
 2051 AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAAACTGT CTTCAATGTCG
 2101 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAACCT CAGACTTTTCG

ES 2 982 051 T3

2151 GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA
 2201 CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTTTCAGC ATACTTGCTG
 2251 AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC TTCTCTCAA ACCTGACCTC
 2301 AGAGTCTGCT ACCCCCGAGT CAGGGCCAGG ATCAGAGCCA GCCACCTCCG
 2351 GGTCTGAGAC ACCCGGGACT TCCGAGAGTG CCACCCCTGA GTCCGGACCC
 2401 GGGTCCGAGC CCGCCACTTC CGGCTCCGAA ACTCCCGGCA CAAGCGAGAG
 2451 CGCTACCCCA GAGTCAGGAC CAGGAACATC TACAGAGCCC TCTGAAGGCT
 2501 CCGCTCCAGG GTCCCCAGCC GGCAGTCCCA CTAGCACCGA GGAGGGAAAC
 2551 TCTGAAAGCG CCACACCCGA ATCAGGGCCA GGGTCTGAGC CTGCTACCAG
 2601 CGGCAGCGAG ACACCAGGCA CCTCTGAGTC CGCCACACCA GAGTCCGGAC
 2651 CCGGATCTCC CGCTGGGAGC CCCACCTCCA CTGAGGAGGG ATCTCCTGCT
 2701 GGCTCTCCAA CATCTACTGA GGAAGGTACC TCAACCGAGC CATCCGAGGG
 2751 ATCAGCTCCC GGCACCTCAG AGTCGGCAAC CCCGGAGTCT GGACCCGGAA
 2801 CTCCGAAAG TGCCACACCA GAGTCCGGTC CCGGGACTTC AGAATCAGCA
 2851 ACACCCGAGT CCGGCCCTGG GTCTGAACCC GCCACAAGTG GTAGTGAGAC
 2901 ACCAGGATCA GAACCTGCTA CCTCAGGGTC AGAGACACCC GGATCTCCGG
 2951 CAGGCTCACC AACCTCCACT GAGGAGGGCA CCAGCACAGA ACCAAGCGAG
 3001 GGCTCCGCAC CCGGAACAAG CACTGAACCC AGTGAGGGTT CAGCACCCGG
 3051 CTCTGAGCCG GCCACAAGTG GCAGTGAGAC ACCCGGCACT TCAGAGAGTG
 3101 CCACCCCCGA GAGTGGCCCA GGCCTAGTA CCGAGCCCTC TGAAGGCAGT
 3151 GCGCCAGCCT CGAGCGAAAT AACTCGTACT ACTCTTCACT CAGATCAAGA
 3201 GGAAATCGAT TATGATGATA CCATATCAGT TGAATGAAG AAGGAAGATT
 3251 TTGACATTTA TGATGAGGAT GAAATCAGA GCCCCCGCAG CTTTCAAAG
 3301 AAAACACGAC ACTATTTTAT TGCTGCAGTG GAGAGGCTCT GGGATTATGG
 3351 GATGAGTAGC TCCCACATG TTCTAAGAAA CAGGGCTCAG AGTGGCAGTG
 3401 TCCCTCAGTT CAAGAAAGTT GTTTTCCAGG AATTTACTGA TGGCTCCTTT
 3451 ACTCAGCCCT TATACCGTGG AGAACTAAAT GAACATTTGG GACTCCTGGG
 3501 GCCATATATA AGAGCAGAAG TTGAAGATAA TATCATGGTA ACTTTCAGAA
 3551 ATCAGGCCTC TCGTCCCAT TCCCTCTATT CTAGCCTTAT TTCTTATGAG
 3601 GAAGATCAGA GGCACAGGAG AGAACTAGA AAAAAGTTTG TCAAGCCTAA
 3651 TGAAACCAAA ACTTACTTTT GGAAAGTGCA ACATCATAAG GCACCCACTA
 3701 AAGATGAGTT TGACTGCAA GCCTGGGCTT ATTTCTCTGA TGTGACCTG
 3751 GAAAAGATG TGCACCTCAG CCTGATTGGA CCCCTTCTGG TCTGCCACAC
 3801 TAACACACTG AACCCCTGCTC ATGGGAGACA AGTGACAGTA CAGGAATTTG
 3851 CTCTGTTTTT ACCATCTTTT GATGAGACCA AAAGCTGGTA CTTCACTGAA
 3901 AATATGGAAA GAAACTGCAG GGCTCCCTGC AATATCCAGA TGGAAGATCC
 3951 CACTTTTAAA GAGAATTATC GCTTCCATGC AATCAATGGC TACATAATGG
 4001 ATACACTACC TGGCTTAGTA ATGGCTCAGG ATCAAAGGAT TCGATGGTAT
 4051 CTGCTCAGCA TGGGCAGCAA TGAAAACATC CATTCTATTC ATTTCACTGG
 4101 ACAATGTTTC ACTGTACGAA AAAAAGAGGA GTATAAAAATG GCACTGTACA
 4151 ATCTCTATCC AGGTGTTTTT GAGACAGTGG AAATGTTACC ATCCAAAGCT
 4201 GGAATTTGGC GGGTGGAAAT CCTTATTGGC GAGCATCTAC ATGCTGGGAT
 4251 GAGCACACTT TTTCTGGTGT ACAGCAATAA GTGTCAAGT CCCCTGGGAA
 4301 TGGCTTCTGG ACACATTAGA GATTTTCAGA TTACAGCTTC AGGACAATAT
 4351 GGACAGTGGG CCCCAAAGCT GGCCAGACTT CATTATCCG GATCAATCAA
 4401 TGCTGGGAGC ACCAAGGAGC CCTTTTCTTG GATCAAGGTG GATCTGTTGG
 4451 CACCAATGAT TATTCACGGC ATCAAGACCC AGGGTGCCCC TCAGAAGTTC
 4501 TCCAGCCTCT ACATCTCTCA GTTTATCATC ATGTATAGTC TTGATGGGAA
 4551 GAAGTGGCAG ACTTATCGAG GAAATTCAC TGGAACCTTA ATGGTCTTCT
 4601 TTGGCAATGT GGATTCATCT GGGATAAAAC ACAATATTTT TAACCCTCCA
 4651 ATTATTGCTC GATACATCCG TTTGCACCCA ACTCATTATA GCATTCGCAG
 4701 CACTCTTCGC ATGGAGTTGA TGGGCTGTGA TTAAATAGT TGCAGCATGC
 4751 CATTGGGAAT GGAGAGTAAA GCAATATCAG ATGCACAGAT TACTGCTTCA
 4801 TCCTACTTTA CCAATATGTT TGCCACCTGG TCTCCTTCAA AAGCTCGACT
 4851 TCACCTCCAA GGGAGGAGTA ATGCCTGGAG ACCTCAGGTG AATAATCCAA
 4901 AAGAGTGGCT GCAAGTGGAC TTCCAGAAGA CAATGAAAGT CACAGGAGTA
 4951 ACTACTCAGG GAGTAAAATC TCTGCTTACC AGCATGTATG TGAAGGAGTT
 5001 CCTCATCTCC AGCAGTCAAG ATGGCCATCA GTGGACTCTC TTTTTTCAGA
 5051 ATGGCAAAGT AAAGGTTTTT CAGGGAAATC AAGACTCCTT CACACCTGTG

ES 2 982 051 T3

5101 GTGAACTCTC TAGACCCACC GTTACTGACT CGCTACCTTC GAATTCACCC
 5151 CCAGAGTTGG GTGCACCAGA TTGCCCTGAG GATGGAGGTT CTGGGCTGCG
 5201 AGGCCACAGGA CCTCTACGAC AAAACTCACA CATGCCACC GTGCCAGCT
 5251 CCAGAACTCC TGGGCGGACC GTCAGTCTTC CTCTTCCCCC CAAAACCCAA
 5301 GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGC GTGGTGGTGG
 5351 ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC
 5401 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG
 5451 CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA
 5501 ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC
 5551 ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT
 5601 GTACACCCTG CCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC
 5651 TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
 5701 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCAGC CTCCCGTGT
 5751 GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA
 5801 GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT
 5851 CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAATG

Secuencia proteínica de pSYN FVIII 312 (FVIII con eliminación completa del dominio B excepto 5 residuos aminoácidos y XTEN AE288 insertado después del aa 745-versión B5) (SEQ ID NO: 173)

5

1 ATRRYYLGA V ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFPP NTSVVYKKT
 51 FVEFTDHLFN IAKPRPPWVG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHPVSLHA
 101 VGVSYWKASE GAEYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD
 151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGS LAKEKTQ TLHKFILLFA
 201 VFDEGKSWHS ETKNLSMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR
 251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
 301 MDLGGFLLFC HISSHQHDGM EAYVKVDS CP EEPQLRMKNN EEAEDYDDDL
 351 TDSEMDVVRV DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL
 401 APDDRSYKSQ YLNNGPQRIG RKYKKVRFMA YTDETFKTR E AIQHESGILG
 451 PLLYGEVGD T LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSRR LPKGVKHLKD
 501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYSSFFVNME RDLASGLIGE
 551 LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYL TEN IQRFLPNPAG
 601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS
 651 VFFSGYTFKH KMYEDTTLT L FPFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
 701 GMTALLKVSS CDKNTGDYVE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNGTSES
 751 ATPESGPGSE PATSGSETPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT
 801 PESGPGTSTE PSEGSAPGSP AGSPTSTEEG TSESATPESG PGSEPATSGS
 851 ETPGTSESAT PESGPGSPAG SPTSTEEGSP AGSPTSTEEG TSTEPSEGS
 901 PGTSESATPE SGPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGSE PATSGSETPG
 951 SEPATSGSET PGSPAGSPTS TEEGTSTEPS EGSAPGTSTE PSEGSAPGSE
 1001 PATSGSETPG TSESATPESG PGTSTEPSEG SAPASSEITR TTLQSDQEEI
 1051 DYDDTISVEM KKEDFDIYDE DENQSPRSFQ KKTRHYFIAA VERLWDYGMS
 1101 SSPHVLNRRA QSGSVPPQFKK VVFQEFDTGS FTQFLYRGEL NEHLGLLGPY
 1151 IRAEVEDNIM VTFRNQASRP YSFYSSLISY EEDQRQGAEP RKNFVKPNET
 1201 KTYFWKVQHH MAPTKDEFDC KAWAYFSDVD LEKDVHSGLI GPLLVCHTNT
 1251 LNPAGHRQVT VQEFALFFTI FDETKSWYFT ENMERNCRAP CNIQMEDPTF
 1301 KENYREHAIN GYIMDTLPLG VMAQDQIRIRW YLLSMGSNEN IHSIHFSGHV
 1351 FTVRKKEEYK MALYNLYPGV FETVEMLP SK AGIWRVECLI GEHLHAGMST
 1401 LFLVYSNKCQ TPLGMASGHI RDFQITASGQ YGQWAPKLAR LHYSGSINAW
 1451 STKEPFSWIK VDLLAPMI IH GIKTQGARQK FSSLYISQFI IMYSLDGKKW
 1501 QTYRGNSTGT LMVFFGNVDS SGIKHNIFNP PIARYIRLH PTHYSIRSTL
 1551 RMELMGCDLN SCSMPLGME S KAI SDAQITA SSYFTNMFAT WSPSKARLHL
 1601 QGRSNAWRPQ VNNPKEWLQV DFQKTMKVTG VTTQGVKSL L TSMYVKEFLI
 1651 SSSQDGHQWT LFFQNGKVKV FQGNQDSFTP VVNSLDPPLL TRYLRIPHQS
 1701 WVHQIALRME VLGCEAQDLY DKHTTCP PCP APELLGGPSV FLFPKPKDT
 1751 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 1801 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 1851 LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 1901 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*

Secuencia de nucleótidos de pSYN VWF059 (que codifica VWF D'D3-Fc con sitio para trombina de región ácida 2 (a2) en el conector) (SEQ ID NO: 196)

10

ES 2 982 051 T3

1 ATGATTCTCG CCAGATTTGC CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTT
 51 GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACTCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC
 101 GATGCAGCCT TTTCGGAAAT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG
 151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA
 201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC
 251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTTTGACA TCCATTTGTT TGTCAATGGT
 301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG
 351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTAATA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT
 401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCCTGCTG
 451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT
 501 CTTTGTGTA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC
 551 CTTATGACTT TGCCAATCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT
 601 GAACGGGCAT CTCCTCCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT
 651 GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT
 701 TTGCCCGCTG CCACCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT
 751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCC CCGCCCTGC
 801 CCTCCTGGAG TACGCCCCGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG
 851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG
 901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT
 951 CAATGAAATG TGTGAGGAGC GATGCGTGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG
 1001 GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC
 1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCAGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG
 1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT
 1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTG ACTGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC
 1201 AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCCGGA
 1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG
 1301 ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCTGGC
 1351 CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA
 1401 TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC
 1451 ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
 1501 GACTGGGATG GCCCGGGGAG GCTGTGGTGG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC
 1551 CGGGAAGACC TCCGECCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG
 1601 ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCGGAGC CCCGGGTGGA GGAATTCGGG
 1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGACTGCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG
 1701 CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT
 1751 GCGCGGTCTC GACGTCCCCC ACATTCGAGG CCTGCCATCG TGCCGTCAGC
 1801 CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA
 1851 CGGCCCGCAG TGCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGCCCTGCG
 1901 CGGGGAGAGG CGTGCAGGTC GCGTGGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG
 1951 AACTGCCCGA AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TCGGGGACCC CCTGCAACCT
 2001 GACCTGCCCG TCTCTCTCTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCCTGCC
 2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC
 2101 TCGGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA
 2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG
 2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC
 2251 GCTGTCTCTA GCAGTCCCCC GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCCTG
 2301 TCGGGCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG
 2351 AAGGGCTCGA GTGTACCAA ACCTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG
 2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCCGGGCA TGGTCCGGCA
 2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA
 2501 AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC
 2551 TGTCGGGACC GGAAGTGGAA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG
 2601 CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTCGACGGG CTCAAATACC

ES 2 982 051 T3

```

2651  TGTTCCTCCG  GGAGTGCCAG  TACGTTCTGG  TGCAGGATTA  CTGCGGCAGT
2701  AACCTGGGGA  CCTTTCGGAT  CCTAGTGGGG  AATAAGGGAT  GCAGCCACCC
2751  CTCAGTGAAG  TGCAAGAAAC  GGGTCACCAT  CCTGGTGGAG  GGAGGAGAGA
2801  TTGAGCTGTT  TGACGGGGAG  GTGAATGTGA  AGAGGCCCAT  GAAGGATGAG
2851  ACTCACTTTG  AGGTGGTGG  GTCTGGCCGG  TACATCATTC  TGCTGCTGGG
2901  CAAAGCCCTC  TCCGTGGTCT  GGGACCGCCA  CCTGAGCATC  TCCGTGGTCC
2951  TGAAGCAGAC  ATACCAGGAG  AAAGTGTGTG  GCCTGTGTGG  GAATTTTGAT
3001  GGCATCCAGA  ACAATGACCT  CACCAGCAGC  AACCTCCAAG  TGGAGGAGA
3051  CCCTGTGGAC  TTTGGGAACT  CCTGGAAAGT  GAGCTCGCAG  TGTGCTGACA
3101  CCAGAAAAGT  GCCTCTGGAC  TCATCCCCTG  CCACCTGCCA  TAACAACATC
3151  ATGAAGCAGA  CGATGGTGG  TTCCTCCTGT  AGAATCCTTA  CCAGTGACGT
3201  CTTCCAGGAC  TGCAACAAGC  TGGTGGACCC  CGAGCCATAT  CTGGATGTCT
3251  GCATTTACGA  CACCTGCTCC  TGTGAGTCCA  TTGGGGACTG  CGCCGCATTC
3301  TGCGACACCA  TTGCTGCCTA  TGCCACCGTG  TGTGCCCAGC  ATGGCAAGGT
3351  GGTGACCTGG  AGGACGGCCA  CATTGTGCCC  CCAGAGCTGC  GAGGAGAGGA
3401  ATCTCCGGGA  GAACGGGTAT  GAGGCTGAGT  GCGCTATAA  CAGCTGTGCA
3451  CCTGCCTGTC  AAGTCACGTG  TCAGCACCTT  GAGCCACTGG  CCTGCCCTGT
3501  GCAGTGTGTG  GAGGGCTGCC  ATGCCACTG  CCCTCCAGGG  AAAATCCTGG
3551  ATGAGCTTTT  GCAGACCTGC  GTTGACCCTG  AAGACTGTCC  AGTGTGTGAG
3601  GTGGCTGGCC  GGCGTTTTGC  CTCAGGAAAG  AAAGTCACCT  TGAATCCCAG
3651  TGACCTGAG  CACTGCCAGA  TTTGCCACTG  TGATGTTGTC  AACCTCACCT
3701  GTGAAGCCTG  CCAGGAGCCG  ATATCGGGCG  CGCCAACATC  AGAGAGCGCC
3751  ACCCTGAAA  GTGGTCCCGG  GAGCGAGCCA  GCCACATCTG  GGTCCGAAAC
3801  GCCAGGCACA  AGTGAGTCTG  CAACTCCCGA  GTCCGGACCT  GGCTCCGAGC
3851  CTGCCACTAG  CGGCTCCGAG  ACTCCGGGAA  CTCCGAGAG  CGCTACACCA
3901  GAAAGCGGAC  CCGGAACCAG  TACCGAACCT  AGCGAGGGCT  CTGCTCCGGG
3951  CAGCCAGACC  GGCTCTCCTA  CATCCACGGA  GGAGGGCACT  TCCGAATCCG
4001  CCACCCCGGA  GTCAGGGCCA  GGATCTGAAC  CCGCTACCTC  AGGCAGTGAG
4051  ACGCCAGGAA  CGAGCGAGTC  CGCTACACCG  GAGAGTGGGC  CAGGGAGCCC
4101  TGCTGGATCT  CCTACGTCCA  CTGAGGAAGG  GTCACCAGCG  GGCTCGCCCA
4151  CCAGCACTGA  AGAAGGTGCC  TCGATACTG  ACAAGAACAC  TGGTGATPAT
4201  TACGAGGACA  GTTATGAAGA  TATTTAGCA  TACTTGCTGA  GTAAAAACAA
4251  TGCCATTGAA  CCAAGAAGCT  TCTCTGACAA  AACTCACACA  TGCCACCGT
4301  GCCCAGCTCC  AGAACTCCTG  GCGGACCGT  CAGTCTTCT  CTTCCCCCA
4351  AAACCAAGG  ACACCCTCAT  GATCTCCCG  ACCCTGAGG  TCACATGCGT
4401  GGTGGTGGAC  GTCAGCCAG  AAGACCCTGA  GGTCAAGTTC  AACTGGTACC
4451  TGGACGGCGT  GGAGGTGCAT  AATGCCAAGA  CAAAGCCGG  GGAGGAGCAG
4501  TACAACAGCA  CGTACCCTGT  GGTACCGTC  CTCACCTCC  TGCACCAGGA
4551  CTGGCTGAAT  GGCAAGGAGT  ACAAGTGCAA  GGTCTCCAAC  AAAGCCCTCC
4601  CAGCCCCCAT  CGAGAAAACC  ATCTCAAAG  CAAAGGGCA  GCCCGAGAA
4651  CCACAGGTGT  ACACCCTGCC  CCCATCCCG  GATGAGCTGA  CCAAGAACCA
4701  GGTGAGCCTG  ACCTGCCTGG  TCAAAGGCTT  CTATCCCAGC  GACATCGCCG
4751  TGGAGTGGGA  GAGCAATGGG  CAGCCGGAGA  ACAACTACAA  GACCACGCTT
4801  CCGGTGTTGG  ACTCCGACGG  CTCCTTCTTC  CTCTACAGCA  AGCTCACCGT
4851  GGACAAGAGC  AGGTGGCAGC  AGGGGAACGT  CTTCTCATGC  TCCGTGATGC
4901  ATGAGCTCT  GCACAACCAC  TACACGAGA  AGACCTCTC  CCTGTCTCCG
4951  GGTAATGA

```

Secuencia proteínica de pSYN VWF059 (VWF D'D3-Fc con sitio para trombina de región a2 de FVIII en el conector) - la zona subrayada en **negrita** muestra la región a2 (SEQ ID NO: 197)

5

```

1  MIPARFAGVL  LALALILPGT  LCAEGTRGRS  STARCSLFGS  DFVNTFDGSM
51  YSFAGYCSYL  LAGGCQKRSF  SIIGDFQNGK  RVSLSVYLGE  FFDIHLFVNG
101  TVTQGDQRVS  MPYASKGLYL  ETEAGYYKLS  GEAYGFVARI  DGSNFGVLL
151  SDRYFNKTCG  LCGNFNIFAE  DDFMTQEGTL  TSDPYDFANS  WALSSGEQWC
201  ERASPPSSC  NISSGEMQKG  LWEQCQLLKS  TSVFARCHPL  VDPEPFVALC
251  EKTLCECAGG  LECACPALLE  YARTCAQEGM  VLYGWDHSA  CSPVCPAGME
301  YRQCVSPCAR  TCQSLHINEM  CQERCVDGCS  CPEGQLLDEG  LCVESTECPC
351  VHSKRYPFG  TSLSRDCNTC  ICRNSQWICS  NEECPGECIV  TGQSHFKSFD

```

ES 2 982 051 T3

401	NRYFTFSGIC	QYLLARDCQD	HSFSIVIVETV	QCADDRDAVC	TRSVTVRLPG
451	LHNSLVKCLKH	GAGVAMDGQD	IQLPLLKGD	RIQHTVTVASV	RLSYGEDLQM
501	DWDGFRLLLV	KLSPVYAGKT	CGLCGNYNNG	QGDDFLTPSG	LAEPVRVEDFG
551	NAWKLHGDCQ	DLQKQHSDFC	ALNPRMTRFS	EEACAVLTSP	TFEACHRAVS
601	PLPYLRNCRY	DVCSCSDGRE	CLCGALASYA	AACAGRGVRV	AWREPGRCEL
651	NCPKGQVYLQ	CGTPCNLTCR	SLSYPDEECN	EACLEGCFCP	PGLYMDERGD
701	CVPKAQCPCY	YDGEIFQPED	IFSDHHTMCY	CEDGFMHCTM	SGVPGSLLPD
751	AVLSSPLSHR	SKRSLSCRPP	MVKLVCPADN	LRAEGLECTK	TCQNYDLECM
801	SMGCVSGCLC	PPGMVRHENR	CVALERCPCF	HQKEYAPGE	TVKIGCNTCV
851	CRDRKWNCTD	HVCDATCSTI	GMAHYLTFDG	LKYLFPGECQ	YVLVQDYCGS
901	NPGETFRILVG	NKGCSPSVK	CKKRVTILVE	GGEIELFDGE	VNVKRPMDKE
951	THFEVVESEGR	YIILLGKAL	SVVWDRHLSI	SVVLKQTYQE	KVCGLCGNFD
1001	GIQNNDLTSS	NLQVEEDPVD	FGNSWKVSSQ	CADTRKVPLD	SSPATCHNNI
1051	MKQTMVDSSC	RILTSDFVQD	CNKLVDPPEY	LDVCIYDTCS	CESIGDCAAF
1101	CDTIAAYAHV	CAQHGVVTV	RTATLCPQSC	EERNLRENGY	EAEWRYNSCA
1151	PACQVTCQHP	EPLACPVCV	EGCHAHCPPG	KILDELLQTC	VPEDCPVCE
1201	VAGRRFASGK	KVTLNPSDPE	HCQICHCDVV	NLTCEACQEP	ISGAPTSESA
1251	TPESGPGSEP	ATSGSETPGT	SESATPESGP	GSEFATSGSE	TPGTSESATP
1301	ESGPTSTEP	SEGSAPGSPA	GSPTSTEEGT	SESATPESGP	GSEPATSGSE
1351	TPGTSESATP	ESGPGSPAGS	PTSTEEGSPA	GSPTSTEEGA	SISDKNTG DY
1401	YEDSIEDISA	YLLSKNNAIE	PRSFSDKTHT	CPPCAPPELL	GGPSVFLFFP
1451	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ
1501	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE
1551	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTP
1601	PVLDSGDSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP
1651	GK*				

Secuencia de nucleótidos de pSYN VWF062 (que codifica VWF D'D3-Fc sin sitio para trombina en el conector) (SEQ ID NO: 198)

5

1	ATGATTCCTG	CCAGATTTGC	CGGGGTGCTG	CTTGCTCTGG	CCCTCATTTT
51	GCCAGGGACC	CTTTGTGCAG	AAGGAACTCG	CGGCAGGTCA	TCCACGGCCC
101	GATGCAGCCT	TTTCGGAAAGT	GACTTCGTCA	ACACCTTTGA	TGGGAGCATG
151	TACAGCTTTG	CGGGATACTG	CAGTTACCTC	CTGGCAGGGG	GCTGCCAGAA
201	ACGCTCCTTC	TCGATTATTG	GGGACTTCCA	GAATGGCAAG	AGAGTGAGCC
251	TCTCCGTGTA	TCTTGGGGAA	TTTTTTGACA	TCCATTTGTT	TGTCATGGT
301	ACCGTGACAC	AGGGGGACCA	AAGAGTCTCC	ATGCCCTATG	CCTCCAAAGG
351	GCTGTATCTA	GAAACTGAGG	CTGGGTACTA	CAAGCTGTCC	GGTGAGGCCT
401	ATGGCTTTGT	GGCCAGGATC	GATGGCAGCG	GCAACTTTCA	AGTCCTGCTG
451	TCAGACAGAT	ACTTCAACAA	GACCTGCGGG	CTGTGTGGCA	ACTTTAACAT
501	CTTTGCTGAA	GATGACTTTA	TGACCCAAGA	AGGGACCTTG	ACCTCGGACC
551	CTTATGACTT	TGCCAACTCA	TGGGCTCTGA	GCAGTGGAGA	ACAGTGGTGT
601	GAACGGGCAT	CTCCTCCCAG	CAGCTCATGC	AACATCTCCT	CTGGGGAAAT
651	GCAGAAGGGC	CTGTGGGAGC	AGTGCCAGCT	TCTGAAGAGC	ACCTCGGTGT
701	TTGCCCGCTG	CCACCCTCTG	GTGGACCCCG	AGCCTTTTGT	GGCCCTGTGT
751	GAGAAGACTT	TGTGTGAGTG	TGCTGGGGGG	CTGGAGTGCG	CCTGCCCTGC
801	CCTCCTGGAG	TACGCCCGGA	CCTGTGCCCA	GGAGGGAAATG	GTGCTGTACG
851	GCTGGACCGA	CCACAGCGCG	TGCAGCCAG	TGTGCCCTGC	TGGTATGGAG
901	TATAGGCAGT	GTGTGTCCCC	TTGCGCCAGG	ACCTGCCAGA	GCCTGCACAT
951	CAATGAAATG	TGTCAGGAGC	GATGCCTGGA	TGGCTGCAGC	TGCCCTGAGG
1001	GACAGCTCCT	GGATGAAGGC	CTCTGCCTGG	AGAGCACCGA	GTGTCCCTGC
1051	GTGCATTCCG	GAAAGCGCTA	CCCTCCCGGC	ACCTCCCTCT	CTCGAGACTG
1101	CAACACCTGC	ATTTGCCGAA	ACAGCCAGTG	GATCTGCAGC	AATGAAGAAT
1151	GTCCAGGGGA	GTGCCTTGTG	ACTGGTCAAT	CCCCTTCAA	GAGCTTTGAC
1201	AACAGATACT	TCACCTTCAG	TGGGATCTGC	CAGTACCTGC	TGGCCCGGGA
1251	TTGCCAGGAC	CACTCCTTCT	CCATTGTCAT	TGAGACTGTC	CAGTGTGCTG
1301	ATGACCGCGA	CGCTGTGTGC	ACCCGCTCCG	TCACCGTCCG	GCTGCCTGGC
1351	CTGCCAACA	GCCTTGTGAA	ACTGAAGCAT	GGGGCAGGAG	TTGCCATGGA
1401	TGGCCAGGAC	ATCCAGCTCC	CCCTCCTGAA	AGGTGACCTC	CGCATCCAGC

ES 2 982 051 T3

1451 ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
 1501 GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC
 1551 CGGGAAGACC TGCAGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACC
 1601 ACTTCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCGGAGC CCCGGGTGGA GGAATTCTGG
 1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGACTGCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG
 1701 CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT
 1751 GCGCGGTCTT GACGTCCCC ACATTGAGG CCTGCCATCG TGCCGTGAGC
 1801 CCGTGCCTT ACCTGCGGAA CTGCCGTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA
 1851 CGGCCGCGAG TGCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCTGCG
 1901 CGGGAGAGG CGTGCGCGTC GCGTGGCGG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG
 1951 AACTGCCCGA AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TGCGGGACCC CCTGCAACCT
 2001 GACCTGCCGC TCTCTCTTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCTGCC
 2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC
 2101 TGCGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA
 2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG
 2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGAAGCTT GCTGCCTGAC
 2251 GCTGTCTCA GCAGTCCCCT GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCCTG
 2301 TCGGCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGTGCACAC CTGCGGGCTG
 2351 AAGGGCTCGA GTGTACCAA ACGTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG
 2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCCTGGCA TGGTCCGGCA
 2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA
 2501 AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC
 2551 TGTCGGGACC GGAAGTGGAA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG
 2601 CTCCACGATC GGATGGCCC ACTACCTCAC CTTGACGGG CTCAAATACC
 2651 TGTTCCTGGG GAGTGGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATA CTGCGGCGAG
 2701 AACCTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC
 2751 CTCAGTAAA TGCAAGAAAC GGGTACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA
 2801 TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG
 2851 ACTCACTTTG AGGTGGTGGG GTCTGGCCGG TACATCATTC TGCTGTGGG
 2901 CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC
 2951 TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGAT
 3001 GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA
 3051 CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA
 3101 CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC
 3151 ATGAAGCAGA CACTGGTGGG TTCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT
 3201 CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT
 3251 GCATTTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCGCATTC
 3301 TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCACGTG TGTGCCAGC ATGGCAAGGT
 3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATGTGCTCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA
 3401 ATCTCCGGGA AAGCGGTAAT GAGGCTGAGT GCGCTATAAA CAGCTGTGCA
 3451 CCTGCTGTC AAGTCACTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT
 3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG
 3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG
 3601 GTGGCTGGGC GCGTTTTGTC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCCAG
 3651 TGACCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT
 3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG ATATCGGGCG CGCCAACATC AGAGAGCGCC
 3751 ACCCTGAAA GTGGTCCCGG GAGCGAGCCA GCCACATCTG GGTCCGAAAC
 3801 GCCAGGCACA AGTGTGCTG CAACTCCCGA GTCCGGACCT GGCTCCGAGC
 3851 CTGCCACTAG CGGCTCCGAG ACTCCGGGAA CTTCCGAGAG CGCTACACCA
 3901 GAAAGCGGAG CCGGAACCAG TACCGAACCT AGCGAGGGCT CTGCTCCGGG
 3951 CAGCCAGCC GGTCTCCTA CATCCACGGA GGAGGGCACT TCCGAATCCG
 4001 CCACCCGGGA GTCAGGGCCA GGATCTGAAC CCGTACCTC AGGCAGTGAG
 4051 ACGCCAGGAA CGAGCGAGTC CGCTACACCG GAGAGTGGGC CAGGGAGCCC
 4101 TGCTGGATCT CCTACGTCCA CTGAGGAAGG GTCACCAGCG GGCTCGCCCA
 4151 CCAGCACTGA AGAAGGTGCC TCGAGCGACA AAATCACAC ATGCCACCG
 4201 TGCCAGCTC CAGAATCCT GGGCGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC
 4251 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGCG
 4301 TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC
 4351 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA

 4401 GTACAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG
 4451 ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC
 4501 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA
 4551 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGATGAGCTG ACCAAGAACC
 4601 AGGTCAAGCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTATCCCAG CGACATCGCC
 4651 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACGCC
 4701 TCCCCTGTTG GACTCCGAG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
 4751 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
 4801 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACAGCGAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
 4851 GGGTAAATGA

ES 2 982 051 T3

Secuencia proteínica de pSYN VWF062 (VWF D'D3-Fc sin sitio para trombina en el conector) (SEQ ID NO: 199)

```

1   MIPAREFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
51  YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
251 EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTECPC
351 VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIVTV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451 LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
501 DWDGGRLLV KLSVPYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
551 NAWKLHGDCQ DLQKQHSDFC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPRGCEL
651 NCPKQVYLQ CGTPCNLTCT SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGEQY YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGIELEFDGE VNVKRPMDKE
951 THFEVVEGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDEPEY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVTV RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGAPTSESA
1251 TPESGPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP
1301 ESGPGTSTEP SEGSAPGSPA GSPTSTEEGT SESATPESGP GSEPATSGSE
1351 TPGTSESATP ESGPGSPAGS PTSTEEGSPA GSPTSTEEGA SSDKTHTCPP
1401 CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY
1451 VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL
1501 PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
1551 VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSEFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM
1601 HEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

```

5

Secuencia de nucleótidos de pSYN VWF073 (que codifica VWF D1D2D'D3-XTEN AE144-sitio para trombina α 2 truncado de FVIII-Fc) (SEQ ID NO:174)

```

1   ATGATTCCTG CCAGATTTGC CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTT
51  GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAAC TCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC
101 GATGCAGCCT TTTCCGGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG
151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA

```

10

ES 2 982 051 T3

201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC
 251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTGTGACA TCCATTTGTT TGTCAATGGT
 301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG
 351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT
 401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCCTGCTG
 451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT
 501 CTTTGTGTA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTGGGACC
 551 CTTATGACTT TGCCAACCTA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT
 601 GAACGGGCAT CTCCTCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT
 651 GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT
 701 TTGCCCCTG CCACCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT
 751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGGC CCTGCCCTGC
 801 CCTCCTGGAG TACGCCCGGA CCTGTGCCCA GGAGGGAAATG GTGTGTACG
 851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG
 901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGGGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT
 951 CAATGAAATG TGTGAGGAGC GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG
 1001 GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC
 1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTGAGACTG
 1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT
 1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTG ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC
 1201 AACAGATACT TCACCTTCTG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCGGGA
 1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG
 1301 ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCCTGGC
 1351 CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA
 1401 TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC GCATCCAGC
 1451 ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
 1501 GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC
 1551 CGGGAGAGCC TGCGGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG
 1601 ACTTCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCGGAGC CCCGGGTGGA GGACTTCGGG
 1651 AACGCTTGA AGCTGCACGG GGACTGCCAG GACTGCAGA AGCAGCACAG
 1701 CGATCCCTGC GGCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT
 1751 GCGCGGTCTT GACGTCCCC ACATTCGAGG CCTGCCATCG TGCCGTCAGC
 1801 CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA
 1851 CGGCCGCGAG TGCCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCTGCG
 1901 CGGGAGAGG GTGCGCGTGC GCGTGGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG
 1951 AACTGCCCCA AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TGCGGGACCC CCTGCAACCT
 2001 GACCTGCCCG TCTCTCTCTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCTGCC
 2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC
 2101 TGCGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA
 2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG
 2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCCTGAC
 2251 GCTGTCTTCA GCAGTCCCCT GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCCTG
 2301 TCGGCCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG
 2351 AAGGCTCGA GTGTACCAA ACCTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG
 2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCTCTGTC CCCCAGGGCA TGGTCCGGCA
 2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA
 2501 AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC
 2551 TGTCGGGACC GGAAGTGGAA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG
 2601 CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTCGACGGG CTCAAATACC
 2651 TGTTCCTCCG GGAGTGCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT
 2701 AACCTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC
 2751 CTCAGTGAAG TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA
 2801 TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG
 2851 ACTCACTTTG AGGTGGTGGG GTCTGGCCGG TACATCATTC TGCTGCTGGG
 2901 CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC
 2951 TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGTG
 3001 GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA
 3051 CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA
 3101 CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC

ES 2 982 051 T3

3151 ATGAAGCAGA CGATGGTGGG TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT
 3201 CTTCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT
 3251 GCATTTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCGCATTC
 3301 TGCGACACCA TTGCTGCCCTA TGCCACCGTG TGTGCCAGC ATGGCAAGGT
 3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA
 3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGGCTGAGT GCGCTATAA CAGCTGTGCA
 3451 CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT
 3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG
 3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG
 3601 GTGGCTGGCC GCGTTTTTC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCCAG
 3651 TGACCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT
 3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG GCGCGCCAA CATCAGAGAG CGCCACCCCT
 3751 GAAAGTGGTC CCGGAGCGA GCCAGCCACA TCTGGGTCCG AAACGCCAGG
 3801 CACAAGTGAG TCTGCAACTC CCGAGTCCGG ACCTGGCTCC GAGCCTGCCA
 3851 CTAGCGGCTC CGAGACTCCG GGAACCTCCG AGAGCGCTAC ACCAGAAAGC
 3901 GGACCCGGAA CCAGTACCGA ACCTAGCGAG GGCTCTGCTC CGGGCAGCCC
 3951 AGCCGGCTCT CCTACATCCA CGGAGGAGGG CACTTCCGAA TCCGCCACCC
 4001 CGGAGTCAGG GCCAGGATCT GAACCCGCTA CCTCAGGCAG TGAGACGCCA
 4051 GGAACGAGCG AGTCCGCTAC ACCGGAGAGT GGGCCAGGGA GCCCTGCTGG
 4101 ATCTCCTACG TCCACTGAGG AAGGGTCACC AGCGGGCTCG CCCACCAGCA
 4151 CTGAAGAAGG TGCCTCGAGC GCGGGTGGAG GATCCGGTGG CGGGGGATCC
 4201 GGTGGCGGGG GATCCGGTGG GCGGGGATCC GGTGGCGGGG GATCCGGTGG
 4251 CGGGGGATCC ATTGAACCAA GAAGCTTCTC TGGCAGCGGA GGCGACAAAA
 4301 CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGTCCAG AACTCCTGGG CGGACCGTCA
 4351 GTCTTCCTCT TCCCCCAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC
 4401 CCCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG
 4451 TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA
 4501 AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCAG TACCCTGTGG TCAGCGTCTT
 4551 CACCGTCTTG CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG
 4601 TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAGCC
 4651 AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA
 4701 TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCTGGTCC AAAGCTTCT
 4751 ATCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC
 4801 AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT
 4851 CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT
 4901 TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTG ACAACCACTA CACGCAGAAG
 4951 AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGA

Secuencia proteínica de pSYN VWF073 (VWFD1D2D'D3-XTEN AE144-sitio para trombina a2 truncado-Fc) (SEQ ID NO: 175)

5

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRFS SIIGDFQNGK RVLSVYLGE FFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
 201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
 251 EKTLCCECAG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME
 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLEDEG LCVESTECPC
 351 VHS GKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSF SIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
 451 LHNSLVKLVK GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQ M
 501 DWDGRGRLLV KLSFPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
 551 NAWKLVHGDQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
 601 PLPYLRNCRY DVCS SDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL
 651 NCPKQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFS DHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
 751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM

ES 2 982 051 T3

801	SMGCVSGCLC	PPGMVRHENR	CVALERCPCF	HQGKEYAPGE	TVKIGCNTCV
851	CRDRKWNCTD	HVCDATCSTI	GMAHYLTFDG	LKYLFPGECQ	YVLVQDYCGS
901	NPGTFRILVG	NKGCSPSVK	CKKRVTLVE	GGEIELFDGE	VNVKRPMKDE
951	THFEVVESGR	YIILLGKAL	SVVWDRHLSI	SVVLKQTYQE	KVCGLCGNFD
1001	GIQNNDLTSS	NLQVEEDPVD	FGNSWKVSSQ	CADTRKVPLD	SSPATCHNNI
1051	MKQTMVDSSC	RILTSDFVQD	CNKLVDEPEY	LDVCIYDTCS	CESIGDCAAF
1101	CDTIAAYAHV	CAQHGVVVTW	RTATLCPQSC	EERNLRENGY	EAEWRYNSCA
1151	PACQVTCQHP	EPLACPVQCV	EGCHAHCPPG	KILDELLQTC	VDPEDCPVCE
1201	VAGRRFASGK	KVTLNPSDPE	HCQICHCDVV	NLTCEACQEP	GAPTSESATP
1251	ESGPGSEPAT	SGSETPGTSE	SATPESGPGS	EPATSGSETP	GTSESATPES
1301	GPGTSTEPSE	GSAPGSPAGS	PTSTEEGTSE	SATPESGPGS	EPATSGSETP
1351	GTSESATPES	GPGSPAGSPT	STEEGSPAGS	PTSTEEGASS	GGGGSGGGGS
1401	GGGGSGGGGS	GGGGSGGGGS	IEPRSFSGSG	GDKTHTCPPC	PAPELLGGPS
1451	VFLFPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV	DGVEVHNAKT
1501	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA
1551	KGQPREPQVY	TLPPSRDELT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQFEN
1601	NYKTTPPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH	EALHNHYTQK
1651	SLSLSPGK*				

REIVINDICACIONES

1. Una proteína quimérica que comprende:
- 5 (i) una primera cadena polipeptídica que comprende:
- (a) una proteína de factor VIII (FVIII) que comprende una parte N terminal y una parte C terminal;
- 10 en la que la parte N terminal de la proteína FVIII comprende el dominio A1, dominio A2 y una parte del dominio B de un FVIII maduro de longitud completa (SEQ ID NO: 65); de modo que la parte N terminal comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos 1 a 745 de SEQ ID NO: 65 fusionada a una primera secuencia de XTEN insertada inmediatamente posterior del aminoácido 745 de SEQ ID NO: 65; y en la que la parte C terminal comprende el dominio A3, el dominio C1 y el dominio C2;
- 15 (b) una primera región Fc; y
- (ii) una segunda secuencia polipeptídica que comprende, del extremo N al extremo C de la misma:
- 20 (a) un fragmento del factor de Von Willebrand (VWF) que comprende un dominio D' y un dominio D3 de VWF, con una sustitución aminoacídica en cada uno de los residuos 1099 y 1142 de SEQ ID NO: 21;
- (b) una segunda secuencia de XTEN, en la que la segunda secuencia de XTEN contiene menos de 288 residuos aminoacídicos;
- 25 (c) un conector escindible que comprende una región a2 de FVIII que comprende la secuencia de aminoácidos de Glu720 a Arg740 correspondiente a SEQ ID NO: 65, en la que la región a2 puede escindirarse por trombina; y
- (d) una segunda región Fc,
- 30 en la que la primera región Fc se liga o se asocia con la segunda región Fc.
2. La proteína quimérica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la primera región Fc se asocia con la segunda región Fc mediante un enlace covalente, preferiblemente mediante un enlace disulfuro.
- 35 3. La proteína quimérica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína de factor VIII comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 % idéntica a los aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO: 67.
- 40 4. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el fragmento de VWF consiste en los aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 21 con las sustituciones aminoacídicas en cada uno de los residuos 1099 y 1142 de SEQ ID NO: 21.
- 45 5. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el conector escindible comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106.
- 50 6. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la segunda secuencia de XTEN comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; o SEQ ID NO: 63.
- 55 7. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la primera secuencia de XTEN comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
8. Una composición farmacéutica que comprende la proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Un polinucleótido o un conjunto de polinucleótidos que codifican la proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 60 10. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido o conjunto de polinucleótidos de la reivindicación 9.
11. La célula hospedadora de la reivindicación 10, en la que la célula hospedadora es una célula de mamífero, preferiblemente una célula HEK293.

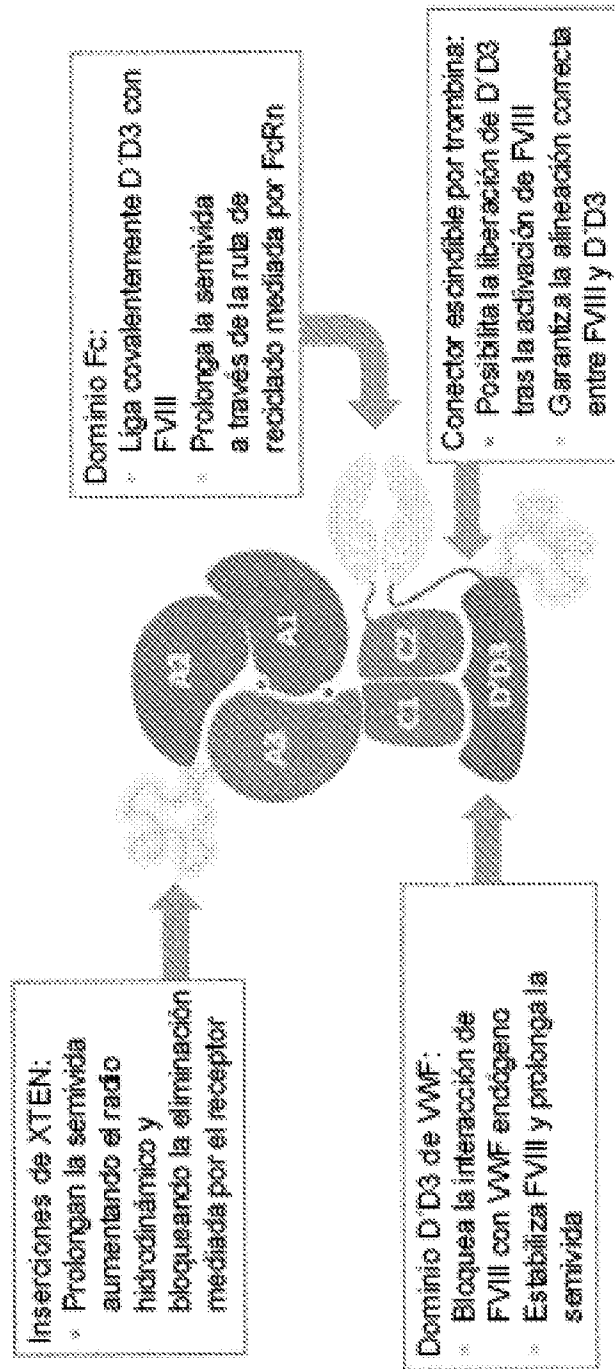


FIG. 1

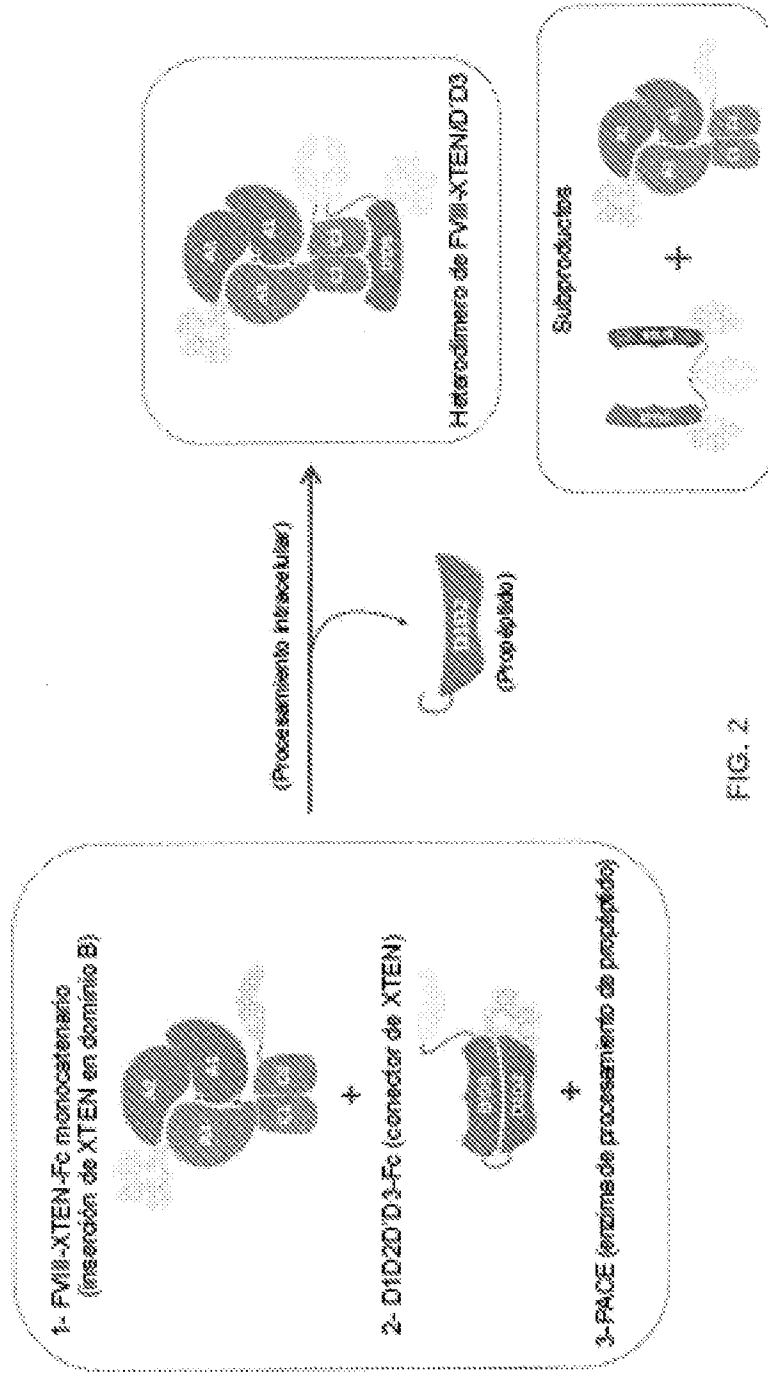


FIG. 2

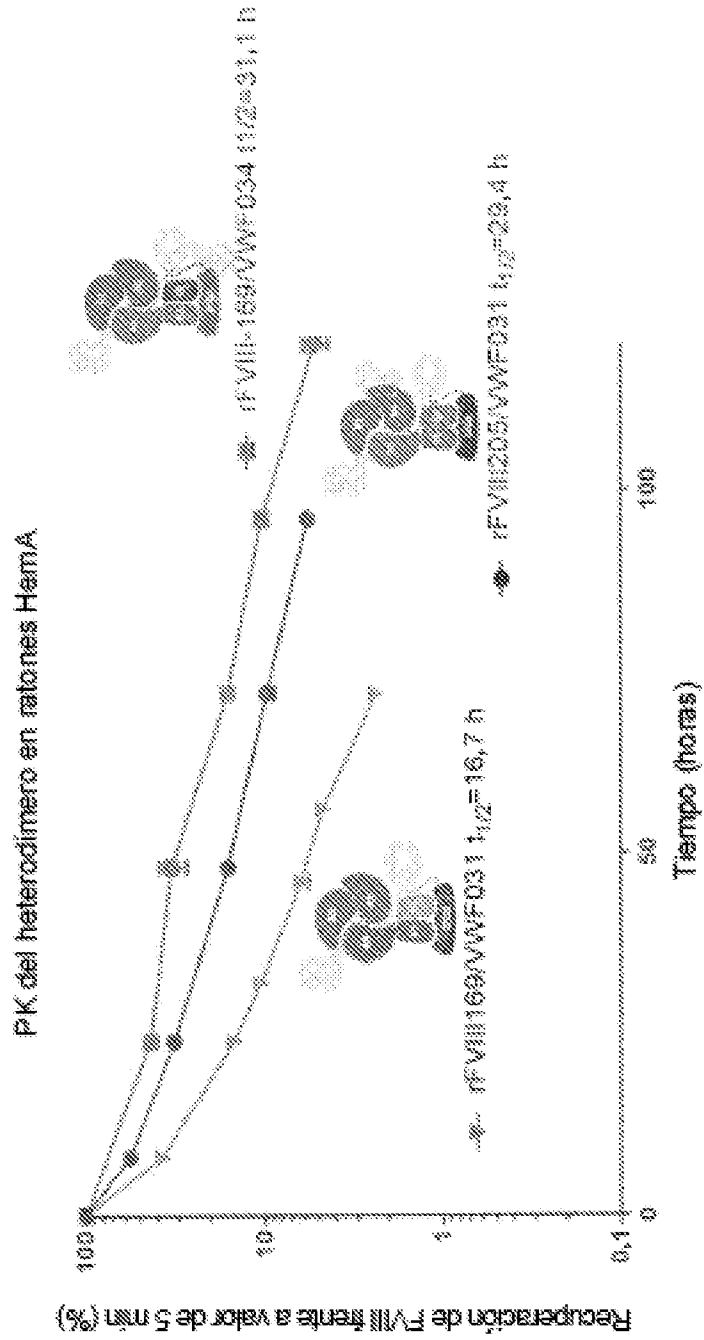


FIG. 3

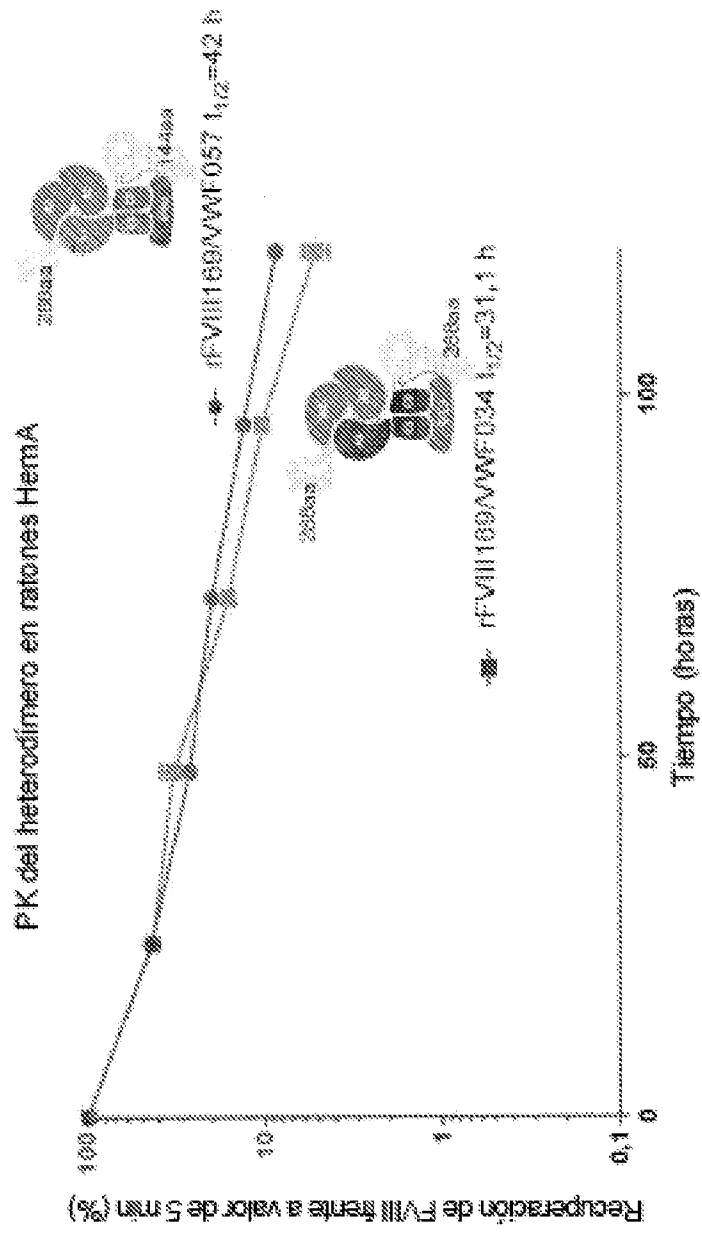


FIG. 4

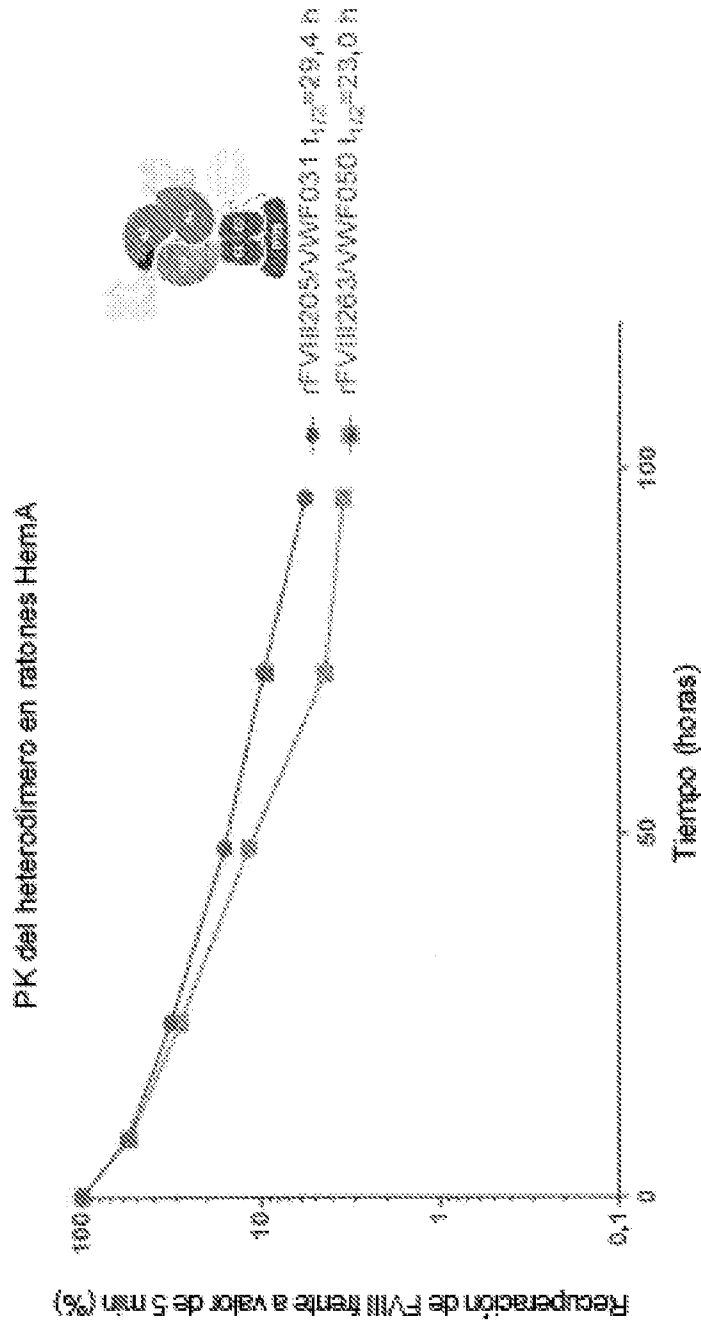


FIG. 5

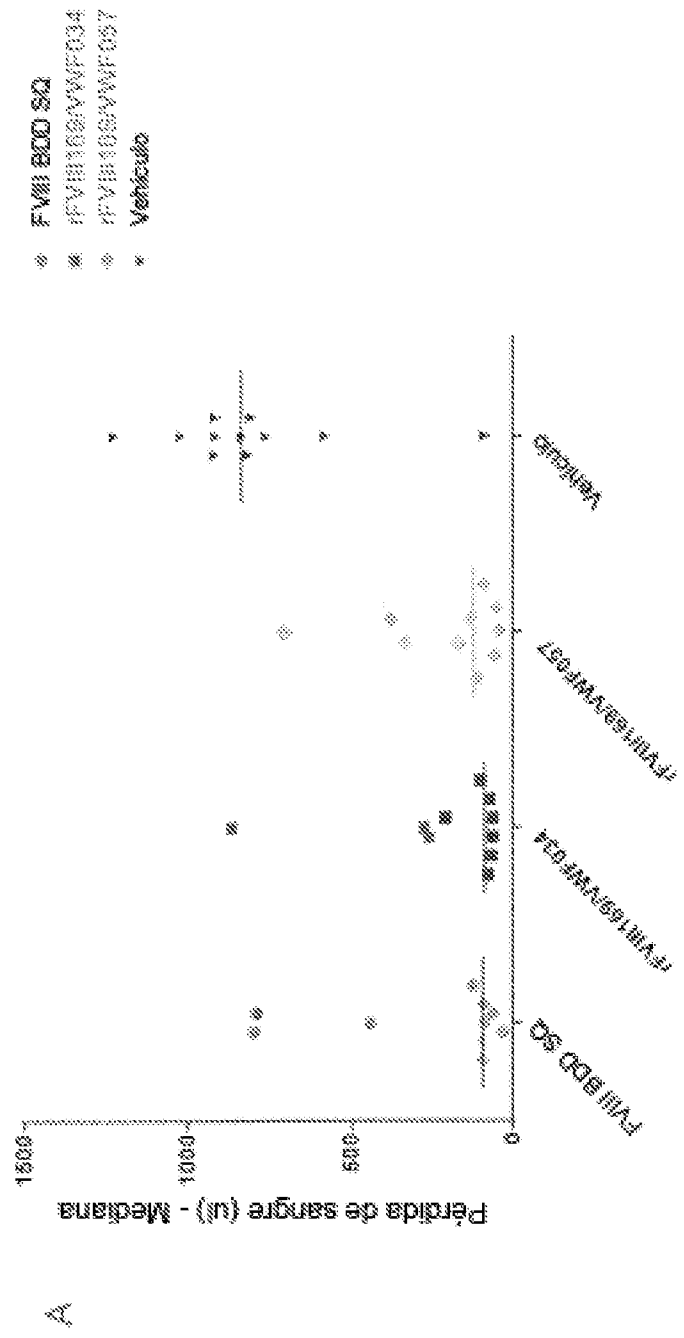


FIG. 6

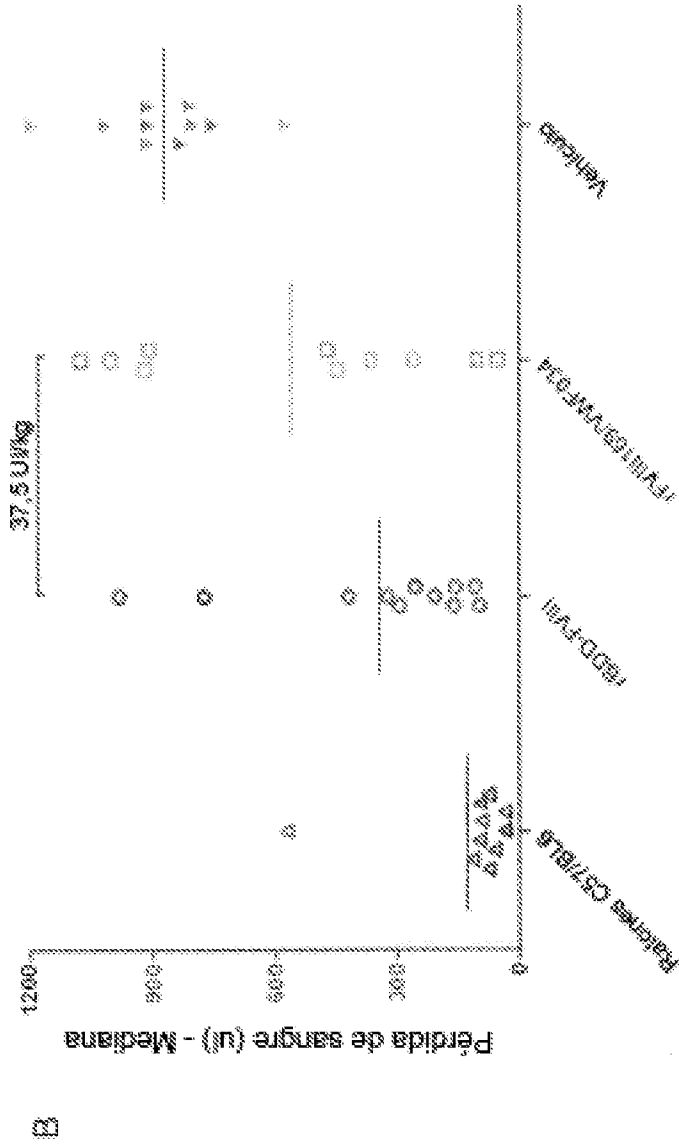


FIG. 6

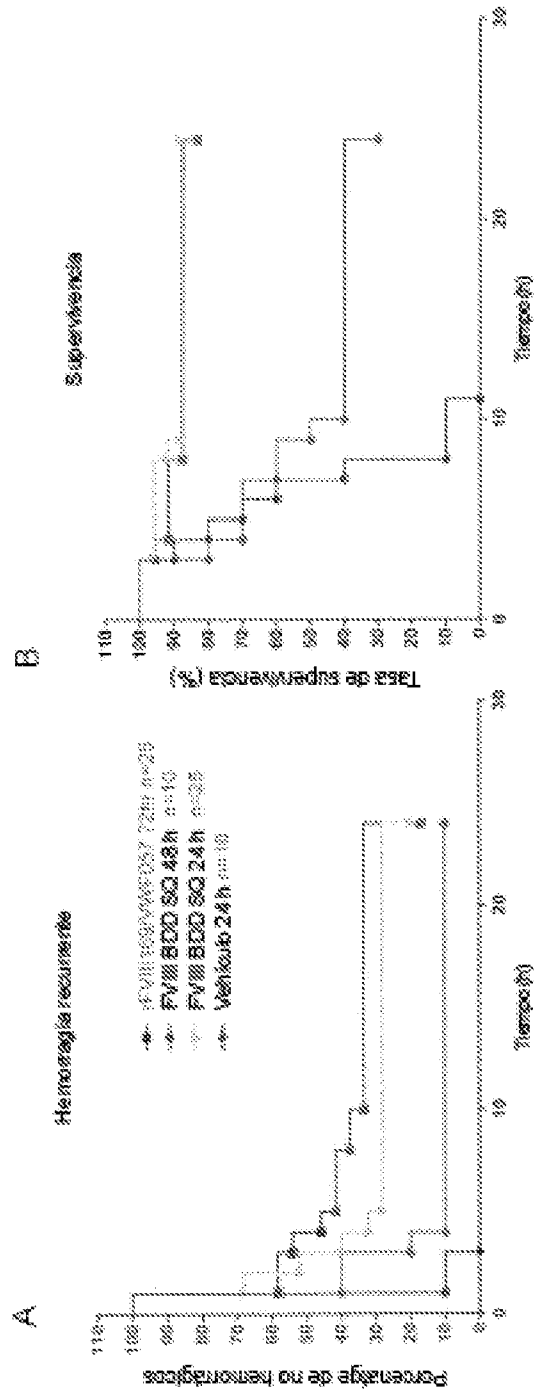


FIG. 7

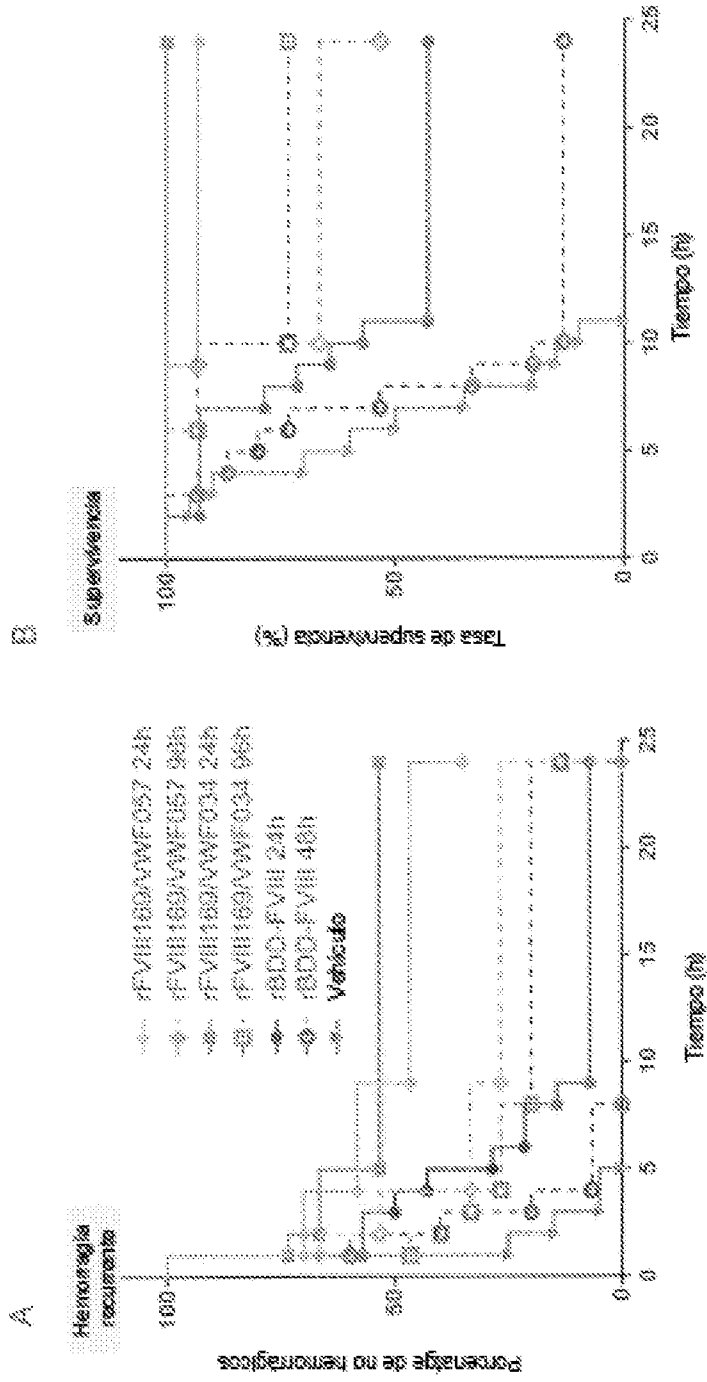


FIG. 8

Diagrama de barras de heterodímero de F VIII-VWF representativo

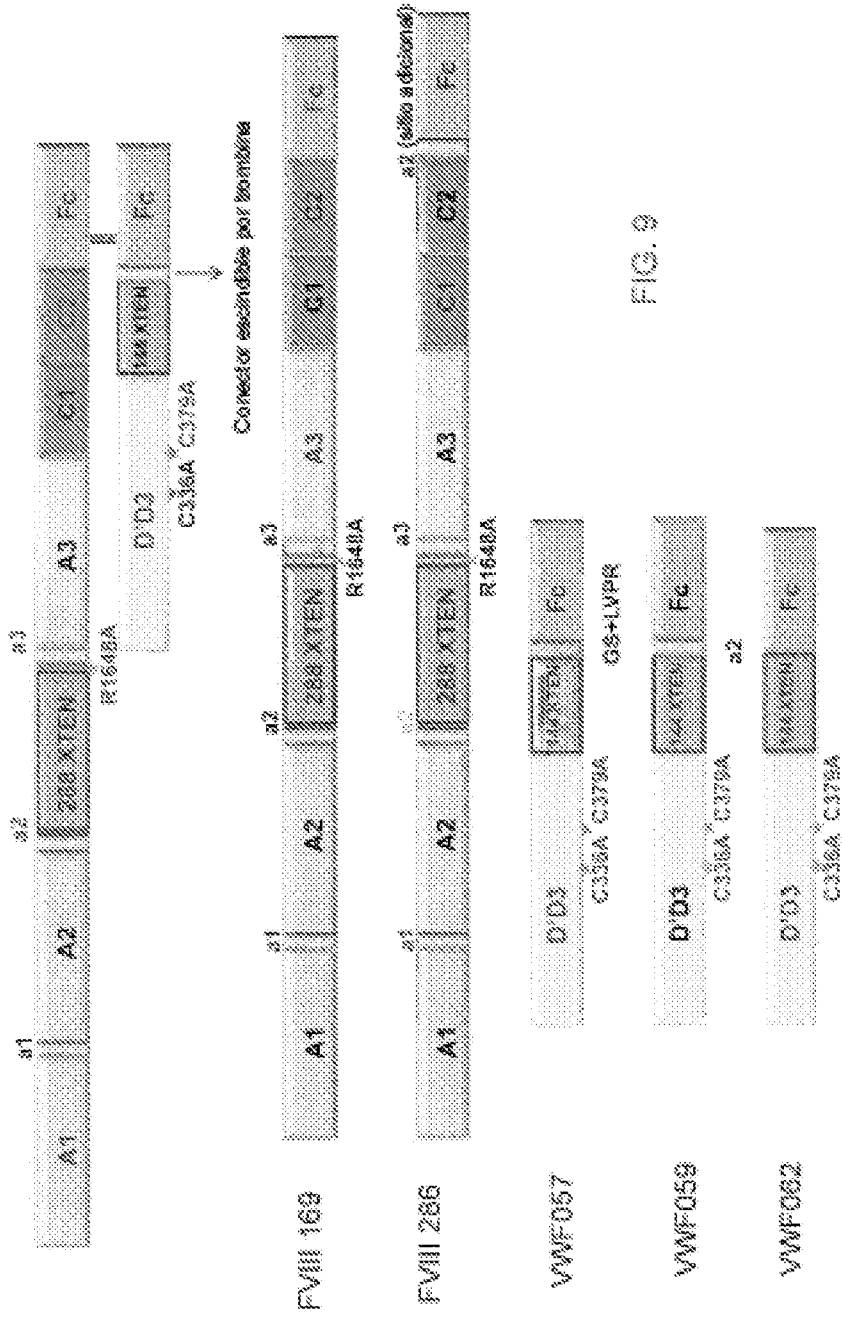




FIG. 10

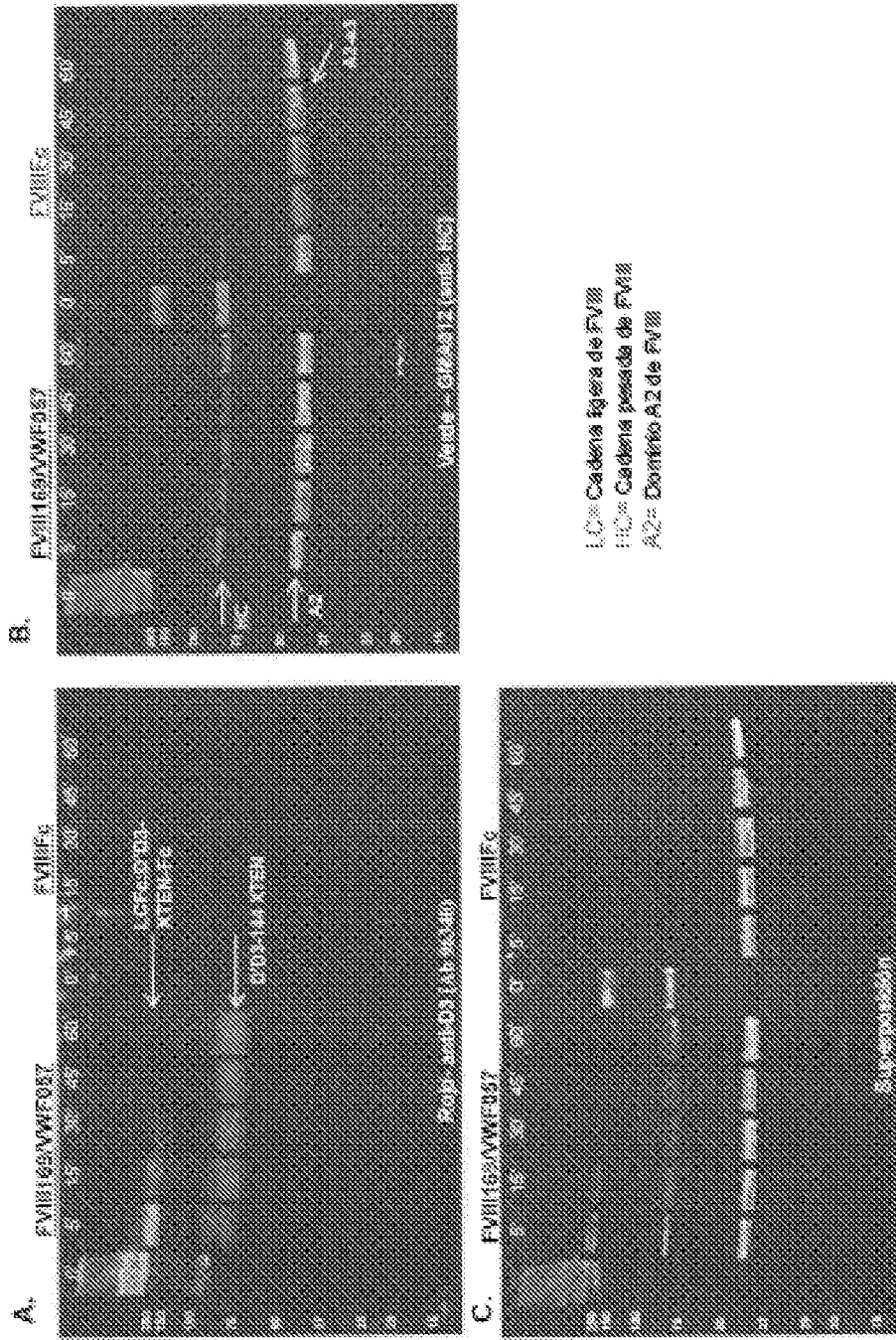


FIG. 11

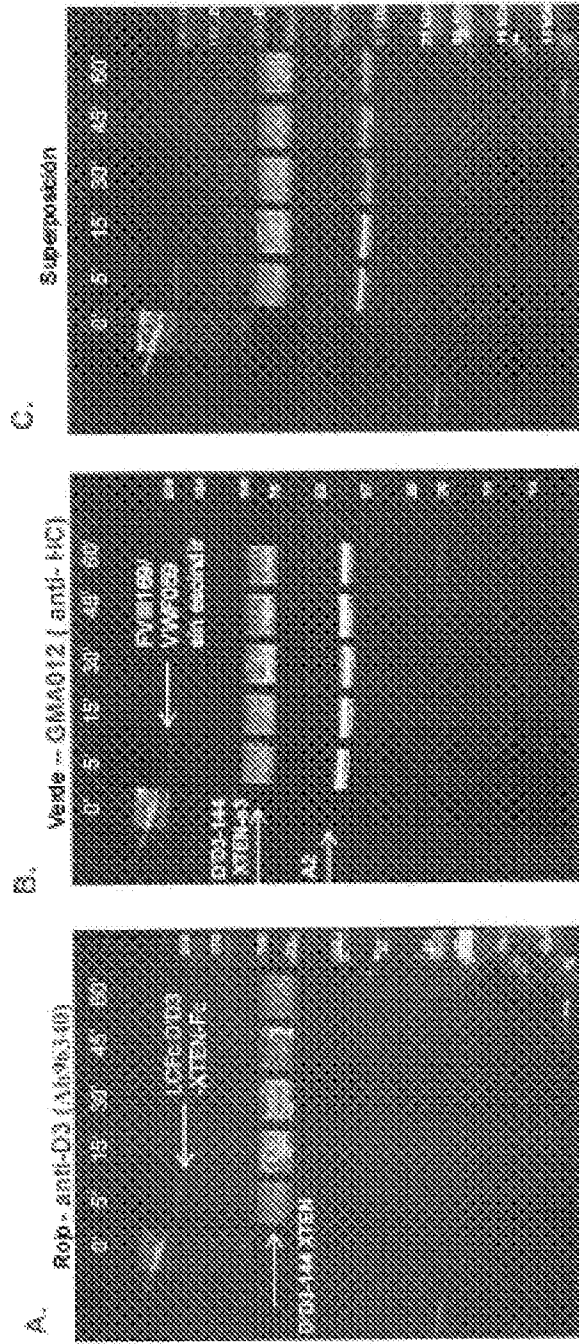


FIG. 12

Eficacia aguda de FVIII169/WF059 en ratones Hema a 75 U/kg

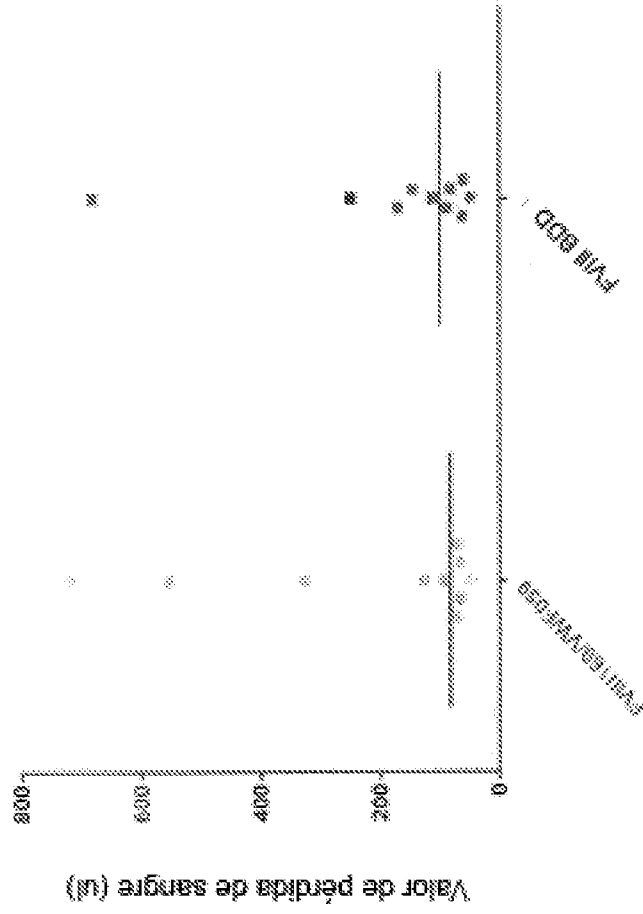


FIG. 13