

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 900 425**

51 Int. Cl.:

A23J 1/00 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2014 PCT/US2014/057524**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15048330**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2014 E 14849291 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.09.2021 EP 3048899**

54 Título: **Métodos de inactivación vírica en columna**

30 Prioridad:

25.09.2013 US 201361882488 P
24.07.2014 US 201462028657 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BOLTON, GLEN y
SELVITELLI, KEITH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 900 425 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

Métodos de inactivación vírica en columna

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un método de inactivación de virus que está presente durante la producción de un polipéptido de interés. En particular, la presente invención se refiere a un método de inactivación vírica en columna usando una solución de lavado de bajo pH y alta salinidad que inactiva eficazmente virus con pérdida mínima en recuperación del polipéptido.

Antecedentes técnicos

15 Con la llegada de la tecnología de proteínas recombinantes, puede producirse una proteína de interés usando líneas celulares cultivadas manipuladas para expresar la proteína. El uso de la proteína recombinante deseada para aplicaciones farmacéuticas, sin embargo, en general está supeditado a la capacidad de recuperar de forma fiable niveles adecuados de la proteína de las impurezas tales como proteínas de la célula hospedadora, aditivos de cultivo celular y virus. Se han empleado diversos métodos de cromatografía para retirar las impurezas y para recuperar la proteína.

20 Se conocen en la técnica varios métodos para inactivar virus basados en diferentes mecanismos. Cada método, sin embargo, tiene sus propias desventajas, y puede no ser adecuado u óptimo para algunos productos proteínicos. Por ejemplo, cuando se usa bajo pH para inactivar virus, tiene el potencial de precipitar proteínas, provocar agregación del producto y/o alterar la conformación de determinadas proteínas, lo que puede dar lugar a pérdida de producto. Además, durante el proceso de purificación de la proteína, la etapa de inactivación vírica a bajo pH se realiza típicamente después de que la proteína de interés haya eluido de la columna de cromatografía y se haya mantenido en un depósito o recipiente, especialmente si la pérdida de producto significativa puede estar provocada por lavado a bajo pH. Añadir una etapa adicional en un depósito o recipiente para inactivar virus es un motivo de molestia.

25 Por lo tanto, hay necesidades de desarrollar etapas de inactivación vírica en columna que puedan inactivar eficazmente virus y al mismo tiempo puedan mejorar el rendimiento del producto de una manera conveniente.

35 Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a un método de inactivación de virus que está presente durante la producción de un polipéptido de interés, que comprende: (a) unir el polipéptido a una matriz de cromatografía, y (b) realizar una etapa de inactivación de virus lavando la matriz de cromatografía unida al polipéptido con una solución de lavado a un pH menor de aproximadamente 4,0, en el que la solución de lavado comprende una concentración suficiente de sal para reducir sustancialmente la elución del polipéptido durante la etapa de inactivación vírica, siendo dicha concentración de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 4,0 M. Las realizaciones que forman parte del alcance de la invención se describen en las reivindicaciones. Cualquier otra realización analizada en la descripción es por referencia únicamente.

45 En determinadas realizaciones, la matriz de cromatografía es una matriz de cromatografía de afinidad. En determinadas realizaciones, la matriz de cromatografía de afinidad es una columna de proteína A. En determinadas realizaciones, la columna de proteína A se selecciona del grupo que consiste en MABSELECT™, MABSELECT™ SuRe, MABSELECT™ SuRe LX, ESHMUNO® A, AMSPHERE™ JWT203, TOYOPEARL® AF-rProtein A-650F, PROSEP®-vA Ultra, PROSEP® Ultra Plus y PROSEP®-vA High Capacity, y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el ligando de proteína A se inmoviliza en una matriz seleccionada del grupo que consiste en matriz basada en dextrano, matriz basada en agarosa, matriz basada en poliestireno, matriz hidrófila basada en polivinil etilo, matriz rígida basada en polimetacrilato, matriz porosa basada en polímero, matriz de poro controlado basada en vidrio y cualquier combinación de las mismas.

55 En determinadas realizaciones, la matriz de cromatografía es una matriz de cromatografía de modo mixto. En determinadas realizaciones, la matriz de cromatografía es una matriz de cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto. En determinadas realizaciones, la matriz de cromatografía de modo mixto se selecciona del grupo que consiste en CAPTO™ Adhere, CAPTO™ MMC, ESHMUNO® HCX, CAPTO™ MMC ImpRes, CAPTO™ Blue, NUVIA™ cPrime, BLUE SEP HAROSE® Fast Flow, CAPTO™ Adhere ImpRes, CHT™ Ceramic Hydroxyapatite, CFT™ Ceramic Fluoroapatite y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía de modo mixto se selecciona del grupo que consiste en matriz basada en dextrano, matriz basada en agarosa, matriz basada en poliestireno, matriz hidrófila basada en polímero de polivinil etilo, matriz macroporosa basada en polímero altamente reticulado, matriz basada en hidroxiapatita ((Ca₅(PO₄)₃OH)₂), matriz basada en fluoroapatita ((Ca₅(PO₄)₃F)₂) y cualquier combinación de las mismas.

En determinadas realizaciones, el polipéptido de interés es un polipéptido que contiene CH₂/CH₃. En determinadas realizaciones, el polipéptido que contiene CH₂/CH₃ es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En determinadas realizaciones, el polipéptido de interés comprende un factor de coagulación. También se divulga FIX-Fc, FVIII-Fc o FVII-Fc. En determinadas realizaciones divulgadas, el polipéptido es un híbrido de monómero-dímero. En determinadas realizaciones divulgadas, el polipéptido comprende además un resto heterólogo. En una realización, el resto heterólogo se selecciona del grupo que consiste en albúmina, polipéptido de unión a albúmina, Fc, PAS, el péptido C terminal (CTP) de la subunidad β de gonadotropina coriónica humana, polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón (HES), moléculas pequeñas de unión a albúmina y cualquier combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, el polipéptido de interés se produce de forma recombinante en un cultivo celular. En determinadas realizaciones, el cultivo celular es un cultivo de células humanas. En una realización, el cultivo de células humanas es células de riñón embrionario humano (HEK) 293.

En determinadas realizaciones, el polipéptido de interés se recoge después de producción recombinante en el cultivo celular. En determinadas realizaciones, el polipéptido se une a la matriz de cromatografía a un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0.

En determinadas realizaciones, la elución del polipéptido durante la etapa de inactivación vírica se reduce hasta menos de un 30 %. En determinadas realizaciones, la elución del polipéptido durante la etapa de inactivación vírica se reduce hasta menos de un 25 %, menos de un 20 %, menos de un 15 %, menos de un 10 % o menos de un 5 %.

En determinadas realizaciones, el pH de la solución de lavado es de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,0. En otras realizaciones, el pH de la solución de lavado es de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,0, de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,5 o de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,0. En determinadas realizaciones, el pH de la solución de lavado es aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,7, aproximadamente 2,8, aproximadamente 2,9, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9 o aproximadamente 4,0.

En determinadas realizaciones, la concentración de la sal en la solución de lavado es de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 2,5 M, de aproximadamente 2,5 M a aproximadamente 3,0 M, de aproximadamente 3,0 M a aproximadamente 3,5 M o de aproximadamente 3,5 M a aproximadamente 4 M.

En determinadas realizaciones, la sal en la solución de lavado es una sal de sodio, una sal de potasio o una sal de amonio.

En determinadas realizaciones, la solución de lavado comprende además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en un polímero, un disolvente orgánico, un detergente y arginina o un derivado de arginina.

En determinadas realizaciones, el método comprende más de una etapa de inactivación vírica, en el que pueden usarse soluciones de lavado idénticas o diferentes. En determinadas realizaciones, al menos una de las soluciones de lavado comprende arginina, un derivado de arginina o una mezcla de los mismos. En determinadas realizaciones, al menos una de las soluciones de lavado comprende un detergente.

En determinadas realizaciones, el método comprende además eluir el polipéptido de la matriz de cromatografía con una solución de elución. En determinadas realizaciones, al menos aproximadamente un 70 % del polipéptido se recupera en la solución de elución. En determinadas realizaciones, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % del polipéptido se recupera en la solución de elución.

Breve descripción de los dibujos/figuras

Figura 1. El cromatograma que muestra la separación de proteínas en una columna de cromatografía de proteína A usando una solución de lavado que contiene sulfato de amonio 2 M a pH 3,5. UV₂₈₀ indica la concentración de proteína en las fracciones recogidas.

Figura 2. El cromatograma que muestra la separación de proteínas en una columna de cromatografía de proteína A usando una solución de lavado que contiene arginina 1 M a pH 4,7. UV₂₈₀ indica la concentración de proteína en las fracciones recogidas.

Figura 3. El cromatograma que muestra la separación de proteínas en una columna de cromatografía de proteína A usando una solución de lavado que contiene LDAO CMC 4x (o al 0,18 % p/p). UV₂₈₀ indica la concentración de proteína en las fracciones recogidas.

Figura 4. El cromatograma que muestra la separación de proteínas en una columna de cromatografía de proteína A usando una solución de lavado que contiene NaCl 2 M y PEG al 20 % a pH 3,0. UV₂₈₀ indica la concentración de proteína en las fracciones recogidas.

Figura 5. El cromatograma que muestra la separación de proteínas en una columna de cromatografía de proteína A usando una solución de lavado que contiene NaCl 2 M y etanol al 2 % a pH 3,0. UV₂₈₀ indica la concentración de proteína en las fracciones recogidas.

Figura 6. El cromatograma que muestra la separación de proteínas en una columna de cromatografía de proteína A usando una solución de lavado que contiene sulfato de amonio 2 M y etanol al 2 % a pH 3,0. UV₂₈₀ indica la concentración de proteína en las fracciones recogidas.

Figura 7. El cromatograma que muestra la separación de proteínas en una columna de cromatografía de proteína A usando una solución de lavado que contiene sulfato de amonio 2 M y acetona al 2 % a pH 3,0. UV₂₈₀ indica la concentración de proteína en las fracciones recogidas.

Figura 8. El cromatograma que muestra la separación de proteínas en una columna de cromatografía de proteína A usando una solución de lavado que contiene sulfato de amonio 2 M a pH 3,0. UV₂₈₀ indica la concentración de proteína en las fracciones recogidas.

Figura 9. El cromatograma que muestra la separación de proteínas en una columna de cromatografía de proteína A usando una solución de lavado que contiene sulfato de amonio 2 M y TRITON™ X-100 al 2 % a pH 3,0. UV₂₈₀ indica la concentración de proteína en las fracciones recogidas.

Figura 10. El cromatograma que muestra la separación de proteínas en una columna de cromatografía de proteína A usando una solución de lavado que contiene NaCl 2 M a pH 3,0. UV₂₈₀ indica la concentración de proteína en las fracciones recogidas.

Figura 11. El cromatograma que muestra la separación de proteínas en una columna de cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto usando una solución de lavado que contiene sulfato de amonio 2 M a pH 3,5 y 4,0. UV₂₈₀ indica la concentración de proteína en las fracciones recogidas.

Figura 12. La concentración de sulfato de amonio se redujo de 2 M a cero sobre un gradiente de 9 CV a pH 3,0 para determinar la concentración mínima de sulfato de amonio requerida para mantener el anticuerpo unido a la resina de proteína A a valores de bajo pH. Se requiere sulfato de amonio 1700 mM para mantener el anticuerpo unido a la resina a bajo pH.

Figura 13. Concentración de proteína, conductividad y pH frente a volúmenes de columna usando un lavado a pH 3,0 con sulfato de amonio 2 M, glicina 100 mM. El alto nivel de sulfato de amonio evitó la elución a bajo pH del anticuerpo, posibilitando potencialmente la inactivación vírica en columna.

Figura 14. Concentración de proteína, conductividad y pH frente a volúmenes de columna usando un lavado a pH 3,5 con sulfato de amonio 2 M, citrato 100 mM para mantener el anticuerpo unido a la resina de intercambio aniónico de modo mixto (Capto Adhere) a bajo pH.

Figura 15. Concentración de proteína, conductividad y pH frente a volúmenes de columna usando un lavado a pH 8,0 con sulfato de amonio 2 M, fosfato 50 mM para mantener el anticuerpo unido a la resina de intercambio catiónico de modo mixto (Capto MMC) a alto pH.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Durante toda esta divulgación, el término "un/o" o "una" entidad se refiere a una o más de esta entidad; por ejemplo, se entiende que "un polipéptido" representa uno o más polipéptidos. Por tanto, las expresiones "un/o" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en este documento.

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).

Como se usa en este documento, el término "aproximadamente" permite el grado de variación inherente en los métodos y en los instrumentos usados para medición o cuantificación. Por ejemplo, dependiendo del nivel de precisión

de los instrumentos usados, el error típico basado en el número de muestras medidas y el error de redondeo, el término "aproximadamente" incluye, sin limitación, $\pm 10\%$.

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".

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, Revised, 2000, Oxford University Press, proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos usados en esta divulgación.

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.

El término "polipéptido", como se usa en este documento, se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos unidos conjuntamente mediante enlaces peptídicos. El término se usa para hacer referencia a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, pero un experto en la materia entenderá que el término no está limitado a cadenas largas y puede referirse a una cadena mínima que comprende dos aminoácidos unidos conjuntamente mediante un enlace peptídico. Si un solo polipéptido es la unidad de funcionamiento diferenciada y requiere asociación física permanente con otros polipéptidos para formar la unidad de funcionamiento diferenciada, los términos "polipéptido" y "proteína", como se usan en este documento, se usan indistintamente. Si la unidad funcional diferenciada está compuesta de más de un polipéptido que se asocia físicamente con otro, el término "proteína", como se usa en este documento, se refiere a los múltiples polipéptidos que se acoplan físicamente y funcionan conjuntamente como la unidad diferenciada. Por tanto, como se usa en este documento, un "péptido", un "fragmento peptídico", una "proteína", una "cadena de aminoácidos", una "secuencia de aminoácidos" o cualquier otro término usado para hacer referencia a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen genéricamente en la definición de un "polipéptido", incluso a aunque cada uno de estos términos pueda tener un significado más específico. El término "polipéptido" puede usarse en lugar de, o indistintamente con cualquiera de estos términos. El término incluye además polipéptidos que han experimentado modificaciones postraduccionales o posteriores a la síntesis, por ejemplo, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos que no son de origen natural.

"Polipéptido expresado de forma recombinante" y "polipéptido recombinante", como se usa en este documento, se refiere a un polipéptido expresado a partir de una célula hospedadora que se ha genomanipulado para que exprese ese polipéptido. El polipéptido expresado de forma recombinante puede ser idéntico o similar a polipéptidos que se expresan normalmente en la célula hospedadora. El polipéptido expresado de forma recombinante también puede ser exógeno a la célula hospedadora, es decir, heterólogo a los péptidos expresados normalmente en la célula hospedadora. Como alternativa, el polipéptido expresado de forma recombinante puede ser quimérico porque partes del polipéptido contienen secuencias de aminoácidos que son idénticas o similares a polipéptidos expresados normalmente en la célula hospedadora, mientras que otras partes son exógenas a la célula hospedadora. Las células hospedadoras incluyen, aunque sin limitación, células procariotas, células eucariotas, células vegetales, células de levadura, células animales, células de insecto, células aves y células de mamífero. Como se usa en este documento, las expresiones "polipéptido expresado de forma recombinante" y "polipéptido recombinante" también abarcan un anticuerpo producido por un hibridoma.

El término "expresión" o "expresa" se usa en este documento para hacer referencia a la transcripción y traducción que se producen dentro de una célula hospedadora. El nivel de expresión de un gen de producto en una célula hospedadora puede determinarse basándose en la cantidad de ARNm correspondiente que esté presente en la célula o la cantidad de la proteína codificada por el gen de producto que se produce por la célula. Por ejemplo, ARNm transcrito a partir de un gen de producto se cuantifica de forma deseable por hibridación de Northern. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, pág. 7.3-7.57 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). La proteína codificada por un gen de producto puede cuantificarse ensayando la actividad biológica de la proteína o empleando ensayos que son independientes de dicha actividad, tal como transferencia de Western, ELISA, HPLC, forteBIO, ensayo de Bradford, absorbancia a 280 nm o radioinmunoensayo usando anticuerpos que puedan reaccionar con la proteína. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, pág. 18.1-18.88 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

El término "solución" se refiere a una mezcla de uno o más líquidos (disolventes) con uno o más sólidos (solutos), tal como una sal, un polímero o un polipéptido. Como se usa en este documento, una solución incluye una solución de tampón.

5 Un "tampón" es una solución que resiste cambios en el pH mediante la acción de sus componentes de conjugado ácido-base. En Tampones se describen diversos tampones que pueden emplearse dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975). Se conocen muchos tampones en la técnica para su uso en soluciones de tampón e incluyen, aunque sin limitación, histidina, citrato, fosfato, succinato, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), acetato, 10 glicina, aconitato, maleato, ftalato, cacodilato, barbitol, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), bis(2-hidroxietil)imino-tris-(hidroximetil)metano (Bistris), ácido N-(2-acetamido)iminodiacético (ADA), piperazina-N,N-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), 1,3-bis[tris(hidroximetil)-metilamino]propano (bistrispropano), ácido N-(acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido N,N'-bis(2-hidroxietil)-2-amino-etanosulfónico (BES), ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-amino-etanosulfónico (TES), ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-etanosulfónico (HEPES), ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-propanosulfónico (HEPPS), N-tris(hidroximetil)metilglicina (Tricina), N,N-bis(2-hidroxietil)glicina (Bicina), glicilglicina, ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), 1,3-bis[tris(hidroximetil)-metilamino]propano (Bistrispropano), así como combinaciones de estos.

20 La expresión "tampón de carga" se refiere al tampón, en que el polipéptido que se está purificando se aplica a un dispositivo de purificación, por ejemplo, una columna de cromatografía o un cartucho de filtro. Típicamente, el tampón de carga se selecciona de modo que pueda conseguirse la separación del polipéptido de interés de las impurezas indeseadas.

25 Las expresiones "solución de lavado" y "tampón de lavado" se usan indistintamente en este documento y se refieren al tampón usado para retirar uno o más contaminantes, tales como impurezas relacionadas con el proceso, del dispositivo de purificación unido al polipéptido (por ejemplo, una matriz de cromatografía) sin retirar cantidades significativas del polipéptido de interés. La solución de lavado puede comprender una sal, un detergente, un disolvente, un polímero o cualquier combinación de los mismos.

30 Las expresiones "solución de elución" y "tampón de elución" se usan indistintamente en este documento y se refieren al tampón, que se usa típicamente para retirar (eluir) el polipéptido de interés del dispositivo de purificación (por ejemplo, una columna cromatográfica o cartucho de filtro) al que se aplicó anteriormente. Típicamente, la solución de elución se selecciona de modo que pueda conseguirse la separación del polipéptido de interés de las impurezas indeseadas. A menudo, la concentración de un ingrediente particular, tal como una sal particular (por ejemplo, NaCl) 35 en la solución de elución se varía durante el procedimiento de elución (gradiente). El gradiente puede ser continuo o escalonado (interrumpido por periodos de retención). En determinadas realizaciones, se usa bajo pH, tal como un valor de pH por debajo de 4,5, en una solución de elución.

40 El término "cromatografía" se refiere al proceso por el que un soluto de interés, típicamente un polipéptido, en una mezcla se separa de otros solutos en una mezcla como un resultado de diferencias en tasas a las que los solutos individuales de la mezcla migran a través de un medio estacionario bajo la influencia de una fase que se mueve, o en procesos de unir y eluir. Las etapas de cromatografía de la presente invención pueden emplear cualquier tipo de método cromatográfico. Por ejemplo, dichos métodos incluyen, sin limitación: cromatografía de gases, cromatografía 45 de líquidos (por ejemplo, cromatografía de líquidos de alto rendimiento); cromatografía de afinidad (tal como cromatografía de afinidad de proteína A o anticuerpo-antígeno); cromatografía de fluidos supercríticos; cromatografía de intercambio iónico (tal como cromatografía de intercambio aniónico o catiónico); cromatografía de exclusión por tamaño; cromatografía en fase inversa; cromatografía bidimensional; cromatografía en lecho móvil simulado; cromatografía de gases de pirólisis, cromatografía de proteínas rápida (FPLC); cromatografía de contracorriente; 50 cromatografía quiral; cromatografía de fase normal acuosa (ANP); cromatografía de modo mixto; y cromatografía de pseudoafinidad.

Todas las etapas cromatográficas de la invención pueden realizarse por cualquier medio mecánico. La cromatografía puede realizarse en una columna. La columna puede procesarse con o sin presión y desde la parte superior a la parte inferior o desde la parte inferior a la parte superior. La dirección del flujo de fluido en la columna puede invertirse durante el proceso de cromatografía. La cromatografía también puede realizarse usando un proceso discontinuo en que el soporte sólido se separa del líquido usado para cargar, lavar y eluir la muestra mediante cualquier medio adecuado, incluyendo gravedad, centrifugación o filtración. La cromatografía puede realizarse también poniendo en contacto la muestra con un filtro que absorbe o retiene algunas moléculas en la muestra más fuertemente que otras.

60 La expresión "cromatografía de afinidad" se refiere a una técnica de separación de proteínas en que un polipéptido de interés se une de forma reversible y específica a un ligando bioespecífico. Preferiblemente, el ligando bioespecífico se fija covalentemente a un material de fase sólida cromatográfica y es accesible al polipéptido de interés en solución según contacta la solución con el material de fase sólida cromatográfica. El polipéptido de interés (por ejemplo, anticuerpo, enzima o proteína receptora) retiene su afinidad de unión específica por el ligando bioespecífico (antígeno, sustrato, cofactor u hormona, por ejemplo) durante las etapas cromatográficas, mientras otros solutos y/o proteínas 65

en la mezcla no se unen apreciable o específicamente al ligando. La unión del polipéptido de interés al ligando inmovilizado permite pasar las proteínas contaminantes o impurezas proteínicas a través del medio cromatográfico mientras la proteína de interés permanece unida específicamente al ligando inmovilizado en el material de fase sólida. El polipéptido de interés unido específicamente se retira entonces en forma activa del ligando inmovilizado con bajo pH, alto pH, alta salinidad, ligando competidor y similares, y se pasa a través de la columna cromatográfica con el tampón de elución, libre de las proteínas contaminantes o impurezas proteínicas que se dejaron pasar anteriormente a través de la columna. Puede usarse cualquier componente como ligando para purificar su proteína de unión específica respectiva, por ejemplo, anticuerpo.

Las expresiones "proteína A" y "ProA" se usan indistintamente en este documento y abarcan la proteína A recuperada de la fuente natural de la misma, proteína A producida sintéticamente (por ejemplo, por síntesis peptídica o por técnicas recombinantes), y variantes de las mismas que conservan la capacidad de unirse a proteínas que tienen una región CH2/CH3, tal como una región Fc. La proteína A puede adquirirse en el mercado, por ejemplo, en Repligen, Pharmacia y Fermatech. La proteína A en general se inmoviliza en un material de soporte de fase sólida. El término "ProA" también se refiere a una resina o columna de cromatografía de afinidad que contiene matriz de soporte sólido cromatográfico al que se fija covalentemente la proteína A.

En la práctica, la cromatografía de proteína A implica usar proteína A inmovilizada en un soporte sólido. También puede usarse proteína G y proteína LG para cromatografía de afinidad. El soporte sólido es una matriz no acuosa a la que se adhiere proteína A. Dichos soportes incluyen agarosa, sepharose, vidrio, sílice, poliestireno, carbón con colodión, arena y cualquier otro material adecuado. Dichos materiales son bien conocidos en la técnica. Puede usarse cualquier método adecuado para fijar la segunda proteína al soporte sólido. Los métodos para fijar proteínas a soportes sólidos adecuados son bien conocidos en la técnica. Dichos soportes sólidos, con y sin proteína A inmovilizada, están fácilmente disponibles en muchas fuentes comerciales incluyendo tales como Vector Laboratory (Burlingame, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), BioRad (Hercules, CA), Amersham Biosciences (parte de GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y Millipore (Billerica, MA). Proteína A inmovilizada en una matriz de vidrio poroso está disponible en el mercado como PROSEP®-A (Millipore). La fase sólida también puede ser una matriz basada en agarosa. Proteína A inmovilizada en matriz de agarosa está disponible en el mercado como MABSELECT™ (GE Healthcare, Uppsala, Suecia).

La expresión "cromatografía de modo mixto" se refiere a un proceso de purificación usando adsorbentes de modo mixto que proporcionan múltiples modos de interacción, tal como interacción hidrófoba, de intercambio catiónico, de intercambio aniónico y de enlaces de hidrógeno entre el polipéptido de interés y los ligandos adsorbentes. Una resina de intercambio aniónico de modo mixto es una que tiene tanto grupos de intercambio aniónico como grupo hidrófobos en el ligando. Las resinas de cromatografía de modo mixto disponible en el mercado incluyen, aunque sin limitación, CAPTO™ MMC, CAPTO™ MMC ImpRes, CAPTO™ Blue, BLUE SEPHAROSE™ 6 Fast Flow, CAPTO™ Adhere y CAPTO™ Adhere ImpRes de GE Healthcare Life Sciences, o ESHMUNO® HCX de EMD Millipore, o NUVIEW™ cPrime, CHT™ Ceramic Hydroxyapatite, y CFT™ Ceramic Fluoroapatite de Bio-Rad.

Las expresiones "resina de intercambio aniónico", "adsorbente de intercambio aniónico" o "matriz de intercambio aniónico" se usan en este documento para hacer referencia a una fase sólida que está cargada positivamente, por ejemplo, que tiene uno o más ligandos cargados positivamente, tal como grupos amino cuaternario, fijados a la misma. Las resinas de intercambio aniónico disponibles en el mercado incluyen DEAE SEPHAROSE™ Fast Flow, Q SEPHAROSE™ Fast Flow, Q SEPHAROSE™ High Performance, Q SEPHAROSE™ XL, CAPTO™ DEAE, CAPTO™ Q y CAPTO™ Q ImpRes de GE Healthcare Life Sciences, o FRACTOGEL® EMD TMAE HiCap, FRACTOGEL® EMD DEAE y ESHMUNO® Q de EMD Millipore, o UNOSPHERE™ Q y NUVIEW™ Q de Bio-Rad.

Las expresiones "resina de intercambio catiónico", "adsorbente de intercambio catiónico" o "matriz de intercambio catiónico" se refieren a una fase sólida que está cargada negativamente y que, por tanto, tiene cationes libres para intercambio con cationes en una solución acuosa que ha pasado sobre o a través de la fase sólida. Un ligando cargado negativamente fijado a la fase sólida para formar la resina de intercambio catiónico puede ser, por ejemplo, un carboxilato o sulfonato. Las resinas de intercambio catiónico disponibles en el mercado incluyen carboximetil-celulosa, sulfopropilo (SP) inmovilizado en agarosa (por ejemplo, SP SEPHAROSE™ XL, SP-SEPHAROSE™ Fast Flow, SP SEPHAROSE™ High Performance, CM SEPHAROSE™ Fast Flow, CM SEPHAROSE™ High Performance, CAPTO™ S y CAPTO™ SP ImpRes de GE Healthcare Life Sciences, o FRACTOGEL® EMD SE HiCap, FRACTOGEL® EMD SO³⁻, FRACTOGEL® EMD COO⁻, ESHMUNO® S y ESHMUNO® CPX de EMD Millipore, o UNOSPHERE™ S y NUVIEW™ S de Bio-Rad).

Como se usa en este documento, las expresiones "reduce sustancialmente la elución del polipéptido" o "reducción sustancial de la elución del polipéptido" pretenden significar que menos de un 30 % del polipéptido diana se eluye de la matriz de cromatografía en una solución de lavado de bajo pH y alta salinidad. En una realización, menos de un 25 %, menos de un 20 %, menos de un 15 %, menos de un 10 % o menos de un 5 % del polipéptido diana se eluye de la matriz de cromatografía en una solución la lavado de bajo pH y alta salinidad.

Como se usa en este documento, las expresiones "porcentaje de recuperación" y "porcentaje de pureza" pretenden significar la recuperación o pureza conseguida cuando un compuesto diana (por ejemplo, una proteína) se transporta

a través de una etapa o procedimiento de purificación, en comparación con la cantidad o pureza del compuesto diana en la muestra antes de la etapa o procedimiento de purificación. Conseguir un aumento en el porcentaje de pureza implica obtener un producto con niveles reducidos de contaminantes (en proporción al compuesto diana) cuando una muestra se compara antes y después de una etapa o procedimiento de purificación. Los porcentajes preferidos dentro del significado de porcentaje de recuperación y porcentaje de pureza como se definen anteriormente incluyen, sin limitación, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 % y al menos aproximadamente un 99 %.

Los métodos para la determinación del rendimiento o pureza de un polipéptido son conocidos por los expertos en la materia. El rendimiento o pureza de un polipéptido puede determinarse mediante cualquier método de análisis adecuado reconocido en la técnica (por ejemplo, intensidad de banda en un gel teñido con plata, electroforesis en gel de poliácridamida, ELISA, HPLC y similares). Un método ejemplar es cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), descrito en este documento a continuación. La pureza puede determinarse usando valores relativos de "área bajo la curva" (ABC), que pueden obtenerse típicamente para los picos en un cromatograma, tal como un cromatograma de HPLC. Opcionalmente, las purezas se determinan por medios cromatográficos u otros medios usando una curva patrón generada usando un material de referencia de pureza conocida. La pureza también puede determinarse en una base ponderal en peso.

Como se usa en este documento, el término "inactivar" u otras formas de esta palabra (por ejemplo, inactivación, inactivado, inactiva, etc.) cuando se usan en referencia a virus pretende indicar no solamente inactivación vírica completa (es decir, nada de virus infeccioso detectable), sino también la disminución o reducción detectable de las concentraciones víricas infecciosas (es decir, niveles en atenuación o atenuados de virus infeccioso detectable). Por tanto, la disminución o reducción de las concentraciones víricas infecciosas se incluye dentro del significado de "inactivación vírica" (y otras formas de este término) se indique o no dicha disminución o reducción explícitamente en este documento. Los métodos de cuantificación para inactivación vírica son bien conocidos en la técnica. Pueden usarse métodos tales como ensayos de placas. Los ensayos de placas determinan el número de unidades formadoras de placas (ufp) en una muestra de virus, suponiendo que cada placa formada es representativa de una partícula vírica infecciosa o ensayos de TCID₅₀, donde un ensayo de dilución de valoración cuantifica la cantidad de virus requerida para destruir un 50 % de los hospedadores infectados o para producir un efecto citopático en un 50 % de las células de histocultivo inoculadas.

El término "polímero" se refiere a una molécula formada por enlace covalente de dos o más monómeros, donde los monómeros no son aminoácidos. Ejemplos no limitantes de polímeros incluyen polietilenglicol, polipropilenglicol y copolímeros de etilen- y propilenglicol.

El término "detergente" se refiere a tensioactivos no iónicos o zwitteriónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); condensado de octilfenol y óxido de etileno (también conocido como Octoxinol-9, t-octilfenoxipoliétoxietanol, TRITON™ o TRITON™ X-100); 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS); 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato (CHAPSO); dodecil sulfato de sodio (SDS), laurel sulfato de sodio, octil glucósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaína, lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil-taurato de sodio o metil oleil-taurato de disodio; y etilsulfato de 1-etil-1-(2-hidroxietil)-2-isoheptadecilimidazolinio (por ejemplo, la gama MONAQUAT™, Mona Industries, Inc., Paterson, Nueva Jersey). Ejemplos no limitantes de productos comerciales que comprenden compuestos similares a TRITON™ X-100 incluyen CONGO™ N1, DOWFAX™ 9N, IGEPA™ CO, MAKON™, NEUTRONYX® 600's, NONIPOL™ NO, POLYTERGENT® B, RENEX™ 600's, SOLAR™ NO, STEROX™, SERFONIC™ N, T-DET-N™, TERGITOL™ NP y TRITON™ N.

El término "anticuerpo" se usa para indicar una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en este documento, el término abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), mutantes Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos multispecíficos tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos monovalentes o mono-específicos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una parte de determinación antigénica de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno siempre que los anticuerpos muestren la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basadas en la identidad de sus dominios constantes de la cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente.

La expresión "polipéptido que contiene Fc", como se usa en este documento, se refiere a una proteína en que uno o más polipéptidos están ligados a una región Fc o una variante o derivado de la misma. El término "Fc" o "región Fc"

se refiere a una región C de una cadena pesada de IgG, incluyendo cualquier variante funcional de Fc de IgG que conserva la capacidad de unirse a proteína A. Un ejemplo de un polipéptido que contiene Fc es ENBREL® (etanercept) que es una proteína de fusión que fusiona un receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) al extremo constante del anticuerpo IgG1.

La expresión "polipéptido que contiene CH2/CH3", como se usa en este documento se refiere a una proteína en que uno o más polipéptidos están ligados a los dominios CH2/CH3 de una cadena pesada de IgG, o una variante funcional o derivado de la misma.

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 inmunoglobulina. 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.

El término "ligado", como se usa en este documento, se refiere a una primera secuencia de aminoácidos unida covalente o no covalentemente a una segunda secuencia de aminoácidos. La expresión "ligado covalentemente" o "ligamiento covalente" se refiere a un enlace covalente, por ejemplo, un enlace disulfuro, un enlace peptídico o uno o más aminoácidos, por ejemplo, un conector, entre los dos restos que están ligados juntos. La primera secuencia de aminoácidos puede unirse o yuxtaponerse directamente a la segunda secuencia de aminoácidos 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).

La expresión "resto heterólogo" se refiere a un polipéptido u otro resto que derive de una entidad distinta de la de la entidad con la que se está comparando. Por ejemplo, un polipéptido heterólogo puede ser sintético, o derivar de una especie diferente, tipo celular diferente de un individuo, o el mismo tipo o diferente de célula de individuos distintos. En una realización, un resto heterólogo puede ser un polipéptido fusionado a otro polipéptido para producir un polipéptido o proteína de fusión. En otra realización, un resto heterólogo puede ser no polipeptídico tal como PEG conjugado con un polipéptido o proteína.

La expresión "híbrido de monómero-dímero", como se usa en este documento, se refiere a una proteína quimérica que comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, que están asociadas entre sí mediante un enlace covalente, en el que la primera cadena comprende una molécula biológicamente activa, por ejemplo, un factor de coagulación tal como factor IX, factor VIII o factor VII, y una región Fc, y la segunda cadena comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región Fc sin el factor de coagulación. La construcción de híbrido de monómero-dímero, por tanto, es un híbrido que comprende un aspecto monomérico que tiene solamente una molécula biológicamente activa y un aspecto dimérico que tiene dos regiones Fc.

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.

El término "hibridoma", como se usa en este documento, se refiere a una célula creada por fusión de una célula inmortalizada derivada de una fuente inmunológica y una célula productora de anticuerpos. El hibridoma resultante es una célula inmortalizada que produce anticuerpos. Las células individuales usadas para crear el hibridoma pueden ser de cualquier fuente mamífera incluyendo, aunque sin limitación, rata, hámster, cerdo, conejo, oveja, cerdo, cabra y ser humano. El término también abarca líneas celulares de trioma, que se producen cuando la descendencia de fusiones de mieloma heterohíbrido, que son el producto de una fusión entre células humanas y una línea celular de mieloma murino, se fusionan posteriormente con un plasmocito. Además, se entiende que el término incluye cualquier línea celular híbrida inmortalizada que produce anticuerpos tal como, por ejemplo, cuadromas (véase, por ejemplo, Milstein *et al.*, Nature, 537:3053 (1983)).

II. Producción y purificación de polipéptidos de interés

A. Polipéptidos de interés

La presente invención puede usarse para inactivar un virus que esté presente durante la producción de cualquier polipéptido que se exprese en una célula hospedadora. El polipéptido puede expresarse a partir de un gen que es endógeno a la célula hospedadora, o a partir de un gen que se introduce en la célula hospedadora a través de

genomanipulación. El polipéptido puede ser uno que se produzca en la naturaleza o, como alternativa, puede tener una secuencia que se manipuló o seleccionó artificialmente por el hombre. Un polipéptido manipulado puede ensamblarse a partir de otros segmentos polipeptídicos que se producen individualmente en la naturaleza, o puede incluir uno o más segmentos que no se producen de forma natural.

Un polipéptido de interés a menudo tiene una actividad biológica o química deseable. Por ejemplo, la presente invención puede emplearse para inactivar virus que está presente durante la producción de una enzima, receptor, anticuerpo, hormona, factor regulador, antígeno, agente de unión farmacéutica o comercialmente relevante, etc.

Lo siguiente es una descripción detallada de algunos de los polipéptidos que pueden expresarse en un cultivo celular y purificarse de acuerdo con el método de inactivación vírica de la presente invención.

Factores de coagulación

En algunas realizaciones, la proteína de interés comprende un factor de coagulación. Factor de coagulación, como se usa en este documento, significa cualquier molécula, o análogo de la misma, que evita o disminuye la duración de un episodio hemorrágico en un sujeto con un trastorno hemostático. Por ejemplo, un factor de coagulación usado en la invención puede ser un factor de coagulación de longitud completa, un factor de coagulación maduro o un factor de coagulación quimérico. En otras palabras, significa cualquier molécula que tenga actividad coagulante. La actividad coagulante, como se usa en este documento, significa la capacidad de participar en una secuencia en cadena de reacciones bioquímicas que culmina en la formación de un coágulo de fibrina y/o reduce la gravedad, duración o frecuencia de la hemorragia o episodio hemorrágico. Pueden encontrarse ejemplos de factores de coagulación en la patente de Estados Unidos n.º 7.404.956.

El factor de coagulación puede ser un factor que participa en la ruta extrínseca. El factor de coagulación puede ser un factor que participa en la ruta intrínseca. Como alternativa, el factor de coagulación puede ser un factor que participa tanto en la ruta extrínseca como en la intrínseca.

Ejemplos no limitantes de factores de coagulación incluyen factor I (fibrinógeno), factor II (protrombina), tromboplastina tisular, factor V (proacelerina, factor lábil), factor VII (factor estable, proconvertina), factor VIII (factor antihemofílico A), factor IX (factor antihemofílico B o factor de Christmas), factor X (factor de Stuart-Prower), factor XI (precedente de tromboplastina plasmática), factor XII (factor de Hageman), factor XIII (factor estabilizante de fibrina), factor de Von Willebrand (VWF), precalicreína (factor de Fletcher), cininógeno de alto peso molecular (HMWK) (factor de Fitzgerald), fibronectina, antitrombina III, cofactor de heparina II, proteína C, proteína S, proteína Z, plasminógeno, alfa 2-antiplasmina, activador tisular de plasminógeno (tPA), urocinasa, inhibidor-1 del activador tisular de plasminógeno (PAI1) e inhibidor-2 del activador de plasminógeno (PAI2).

En una realización, el factor de coagulación puede ser un factor de coagulación humano o un factor de coagulación no humano, por ejemplo, derivado de un primate no humano, un cerdo o cualquier mamífero. El factor de coagulación puede ser un factor de coagulación quimérico, por ejemplo, el factor de coagulación puede comprender una parte de un factor de coagulación humano y una parte de un factor de coagulación porcino o una parte de un primer factor de coagulación no humano y una parte de un segundo factor de coagulación no humano.

En otra realización, el factor de coagulación puede ser un factor de coagulación activado. Como alternativa, el factor de coagulación puede ser una forma inactiva de un factor de coagulación, por ejemplo, un zimógeno. El factor de coagulación inactivo puede experimentar activación posterior a ligarse a al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina. El factor de coagulación inactivo puede activarse posterior a su administración a un sujeto. Como alternativa, el factor de coagulación inactivo puede activarse antes de su administración.

Factor FIX

"Proteína de factor IX" o "proteína FIX", como se usa en este documento, significa proteína de factor FIX funcional en su función normal en la coagulación, salvo que se especifique de otro modo. Por tanto, el polipéptido FIX incluye polipéptidos variantes que son funcionales y los polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos variantes funcionales.

En una realización, los polipéptidos FIX son los polipéptidos FIX humanos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y murinos. Las secuencias polipeptídicas y polinucleotídicas de longitud completa de FIX son conocidas, como lo son muchas variantes funcionales, por ejemplo, fragmentos, mutantes y versiones modificadas. Los polipéptidos FIX incluyen FIX de longitud completa, FIX de longitud completa menos Met en el extremo N, FIX de longitud completa menos la secuencia señal, FIX maduro (menos la secuencia señal y el propéptido) y FIX maduro con una Met adicional en el extremo N. El FIX puede prepararse por medio recombinante ("factor IX recombinante" o "rFIX"), es decir, no se produce de forma natural o derivado de plasma.

Se conoce una gran cantidad de variantes de FIX funcionales. La publicación internacional número WO 02/040544 A3, que en este documento se incorpora por referencia en su totalidad, divulga mutantes que muestran resistencia aumentada a la inhibición por heparina en la página 4, líneas 9-30 y página 15, líneas 6-31. La publicación internacional número WO 03/020764 A2 divulga mutantes de FIX con inmunogenia reducida de linfocitos T en las tablas 2 y 3 (en

las páginas 14-24) y en la página 12, líneas 1-27. La publicación internacional número WO 2007/149406 A2 divulga moléculas FIX mutantes funcionales que muestran estabilidad proteínica aumentada, semivida aumentada *in vivo* e *in vitro*, y resistencia aumentada a proteasas en la página 4, línea 1 a página 19, línea 11. El documento WO 2007/149406 A2 también divulga moléculas FIX quiméricas y otras variantes en la página 19, línea 12 a página 20, línea 9. La publicación internacional número WO 08/118507 A2 divulga mutantes de FIX que muestran actividad coagulante aumentada en la página 5, línea 14 a página 6, línea 5. La publicación internacional número WO 09/051717 A2 divulga mutantes de FIX que tienen un número aumentado de sitios de glucosilación ligados a N y/o ligados a O, lo que provoca una semivida y/o recuperación aumentadas en la página 9, línea 11 a página 20, línea 2. La publicación internacional número WO 09/137254 A2 también divulga mutantes del factor IX con números aumentos de sitios de glucosilación en la página 2, párrafo [006] a página 5, párrafo [011] y página 16, párrafo [044] a página 24, párrafo [057]. La publicación internacional número WO 09/130198 A2 divulga moléculas de FIX mutantes funcionales que tienen un número aumentado de sitios de glucosilación, lo que provoca una semivida aumentada, en la página 4, línea 26 a página 12, línea 6. La publicación internacional número WO 09/140015 A2 divulga mutantes de FIX funcionales que tienen un número aumentado de residuos de Cys, que pueden usarse para la conjugación de polímero (por ejemplo, PEG), en la página 11, párrafo [0043] a página 13, párrafo [0053]. Los polipéptidos FIX descritos en la solicitud internacional n.º PCT/US2011/043569 presentada el 11 de julio de 2011 y publicada como documento WO 2012/006624 el 12 de enero de 2012 también se divulgan en este documento.

En una realización, el polipéptido de interés es un polipéptido FIX de acción prolongada o de larga duración que es un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido FIX y un compañero de unión a FcRn. En determinadas realizaciones, el polipéptido de interés es rFIX-Fc que es una proteína de fusión que comprende una sola molécula del FIX de coagulación recombinante (rFIX) humano ligado covalentemente a la región Fc dimérica de inmunoglobulina G1 (IgG1) sin secuencia intermedia. La expresión "compañero de unión a FcRn" se define en este documento.

Factor VIII

"Proteína de factor VIII" o "proteína FVIII", como se usa en este documento, significa proteína de factor VIII funcional en su función normal en la coagulación, salvo que se especifique de otro modo. Por tanto, el término FVIII incluye proteínas variantes que son funcionales. En una realización, la proteína FVIII es la proteína FVIII humana, porcina, canina, rata o murina. Una proteína FVIII funcional puede ser una proteína de fusión tal como, aunque sin limitación, una proteína de fusión que comprende un FVIII con un dominio B completa o parcialmente eliminado, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio Fc o ambos. Se ha construido una miríada de variantes de FVIII funcionales y pueden usarse como proteínas FVIII recombinantes como se describe en este documento. Véanse las publicaciones PCT n.º WO 2011/069164 A2, WO 2012/006623 A2, WO 2012/006635 A2 o WO 2012/006633 A2. El FVIII puede ser un FVIII monocatenario o un FVIII bicatenario.

Se conoce una gran cantidad de variantes de FVIII funcionales. Además, se han identificado cientos de mutaciones no funcionales en FVIII en pacientes con hemofilia. Véase, por ejemplo, Cutler *et al.*, Hum. Mutat. 19: 274-8 (2002), incorporado en este documento por referencia en su totalidad. Además, comparaciones entre FVIII de seres humanos y otras especies han identificado residuos conservados que probablemente se requieren para la función. Véase, por ejemplo, Cameron *et al.*, Thromb. Haemost. 79: 317-22 (1998) y el documento US 6.251.632.

La secuencia de aminoácidos de FVIII humano se dedujo del ADNc como se muestra en la patente de Estados Unidos n.º 4.965.199. El FVIII humano maduro natural derivado de la secuencia de ADNc (es decir, sin el péptido señal secretor, pero antes de otro procesamiento postraduccional) puede encontrarse como SEQ ID NO: 1 en el documento WO 2013/123457 A1. El FVIII con el dominio B parcial o completamente eliminado es funcional y se ha usado en productos terapéuticos de FVIII comerciales. Véase, por ejemplo, el documento EP 506757 B2.

En una realización descrita en este documento, el polipéptido de interés es un polipéptido FVIII de acción prolongada o de larga duración que es un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido FVIII y un compañero de unión a FcRn. En determinadas realizaciones descritas en este documento, el polipéptido de interés es rFVIII-Fc que es una proteína de fusión que comprende una sola molécula del FVIII de coagulación recombinante (rFVIII) humano ligado covalentemente a la región Fc dimérica de inmunoglobulina G1 (IgG1) sin secuencia intermedia.

Factor VII

"Proteína de factor VII" o "proteína FVII", como se usa en este documento, significa proteína de factor VII funcional en su función normal en la coagulación, salvo que se especifique de otro modo. Puede ser una forma madura de factor VII o una variante del mismo. El factor VII es una serina proteasa que es parte de la secuencia en cadena de la coagulación. El FVII incluye un dominio Gla, dos dominios EGF (EGF-1 y EGF-2) y un dominio serina proteasa (o dominio peptidasa S1) que está muy conservado entre todos los miembros de la familia de la peptidasa S1 de serina proteasas, tal como, por ejemplo, con quimotripsina. El FVII se produce como un zimógeno monocatenario, un polipéptido bicatenario similar a zimógeno activado (por ejemplo, FVII activable) y una forma bicatenaria completamente activada.

Como se usa en este documento, una proteína o polipéptido "similar a zimógeno" se refiere a una proteína que se ha activado por escisión proteolítica, pero aún muestra propiedades que se asocian con un zimógeno, tales como, por ejemplo, baja o ninguna actividad, o una conformación que se parece a la conformación de la forma de zimógeno de la proteína. Por ejemplo, cuando no está unido a tromboplastina tisular, la forma activada bicatenaria de FVII es una proteína similar a zimógeno; conserva una conformación similar al zimógeno FVII sin escindir y, por tanto, muestra actividad muy baja. Tras la unión a tromboplastina tisular, la forma activada bicatenaria de FVII experimenta cambio conformacional y adquiere su actividad completa como factor de coagulación.

Variantes de FVII ejemplares incluyen aquellas con actividad específica aumentada, por ejemplo, mutaciones que aumentan la actividad de FVII aumentando su actividad enzimática (Kcat o Km). Dichas variantes se han descrito en la técnica e incluyen, por ejemplo, formas mutantes de la molécula como se describe, por ejemplo, en Persson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 13583 (2001); Petrovan y Ruf, J. Biol. Chem. 276: 6616 (2001); Persson *et al.*, J. Biol. Chem. 276: 29195 (2001); Soejima *et al.*, J. Biol. Chem. 276: 17229 (2001); Soejima *et al.*, J. Biol. Chem. 247: 49027 (2002).

En una realización, el polipéptido de interés es un polipéptido FVII de acción prolongada o de larga duración que es un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido FVII y un compañero de unión a FcRn. En determinadas realizaciones, el polipéptido de interés es rFVII-Fc que es una proteína de fusión que comprende una sola molécula del FVII de coagulación recombinante (rFIX) humano ligado covalentemente a la región Fc dimérica de inmunoglobulina G1 (IgG1) sin secuencia intermedia.

Factores de coagulación quiméricos

En determinadas realizaciones, el polipéptido de interés comprende un factor de coagulación quimérico. En determinadas realizaciones, el factor de coagulación quimérico comprende un factor de coagulación y un dominio CH2/CH3. CH2 y CH3 son dos dominios constantes ubicados en la región Fc de una cadena pesada de IgG. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana habitualmente se extiende desde el aminoácido 231 al aminoácido 341 de acuerdo con el sistema de numeración como se describe en Kabat *et al.* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD, incorporado en este documento por referencia en su totalidad. El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana habitualmente se extiende desde el aminoácido 342 a 447 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat *et al.*, 1991. Un dominio CH2/CH3 incluye cualquier derivado funcional o variante de los dominios CH2 y CH3.

En determinadas realizaciones, el factor de coagulación quimérico comprende un factor de coagulación y una región Fc. En una realización, el factor de coagulación quimérico es FIX-Fc, FVIII-Fc o FVII-Fc. Se describen diversos ejemplos de polipéptidos quiméricos e híbridos FIX-Fc, FVIII-Fc o FVII-Fc, por ejemplo, en las publicaciones de Estados Unidos n.º 2013/0202595 A1, 2013/0108629 A1, y la patente de Estados Unidos n.º 8.329.182.

En una realización, el polipéptido de interés es un factor de coagulación de acción prolongada o de larga duración que es un polipéptido quimérico que comprende un factor de coagulación y un compañero de unión a FcRn. En determinadas realizaciones, el polipéptido de interés es una proteína de fusión que comprende una sola molécula de factor de coagulación recombinante humano ligado covalentemente a la región Fc dimérica de inmunoglobulina G1 (IgG1) sin secuencia intermedia.

Restos heterólogos

En determinadas realizaciones, el polipéptido de interés es un polipéptido quimérico que comprende una molécula biológicamente activa y al menos un resto heterólogo. En una realización, la molécula biológicamente activa es un factor de coagulación. En una realización, el resto heterólogo puede prolongar la semivida del factor de coagulación.

En determinadas realizaciones, el resto heterólogo es una IgG o un fragmento de la misma, una albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una secuencia PAS, una secuencia polimérica homoaminoacídica (HAP), transferrina o un fragmento de la misma y cualquier combinación de los mismos, o un resto no polipeptídico que comprende polietilenglicol (PEG), poli(ácido siálico), hidroxietil almidón (HES), un derivado de los mismos y cualquier combinación de los mismos.

En una realización, el resto heterólogo comprende una primera región Fc. En otra realización, el resto heterólogo comprende una segunda región Fc.

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 inmunoglobulina 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 una realización, la "región Fc" se refiere a la parte de una sola cadena pesada de inmunoglobulina que empieza en la región de bisagra exactamente cadena arriba 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, una región Fc completa comprende al menos un dominio de bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

La región Fc de una región constante de inmunoglobulina, dependiendo del isotipo de la inmunoglobulina, puede incluir los dominios CH2, CH3 y CH4, así como la región de bisagra. Las proteínas quiméricas que comprenden una región Fc de un inmunoglobulina 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).

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 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 aminoacídicas 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, US2007/0248603, US2007/0286859, US2008/0057056; 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).

En determinadas realizaciones, un polipéptido quimérico usado de acuerdo con 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 de 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 aminoacídicos 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.

El compañero de unión a FcRn ("BP de FcRn") comprende compañeros de unión al receptor de Fc neonatal (FcRn) funcionales, salvo que se especifique de otro modo. Un compañero de unión a FcRn es cualquier molécula que pueda unirse específicamente por el receptor FcRn con transporte activo consiguiente por el receptor FcRn del compañero de unión a FcRn. Por tanto, la expresión BP de FcRn incluye cualquier variante de Fc de IgG que sea funcional. Por ejemplo, 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 están todos dentro de una sola cadena pesada de Ig. Los BP de 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 hechas a numeración de aminoácidos de inmunoglobulinas o fragmentos o regiones de inmunoglobulina se basan todas en Kabat *et al.* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD. El receptor FcRn se ha aislado de varias especies de mamífero incluyendo seres humanos. Las secuencias del FcRn humano, FcRn de rata y FcRn de ratón son conocidas (véase, por ejemplo,

Story *et al.* 1994, J. Exp. Med. 180: 2377, incorporado en este documento por referencia en su totalidad). Un BP de FcRn puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina con o sin la región de bisagra de la inmunoglobulina. Se proporciona variantes de BP de FcRn ejemplares en los documentos WO 2004/101740 y WO 2006/074199).

En determinadas realizaciones, el resto heterólogo es una albúmina o un fragmento de la misma. La seroalbúmina humana (HSA o HA), una proteína de 609 aminoácidos en su forma de longitud completa, es responsable de una proporción significativa de la presión osmótica del suero y también funciona como transportador de ligandos endógenos y exógenos. El término "albúmina", como se usa en este documento, incluye albúmina de longitud completa o un fragmento, variante, derivado o análogo funcional de la misma. Ejemplos adicionales de albúmina o los fragmentos o variantes de la misma se divulgan en las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2008/0194481A1, 2008/0004206 A1, 2008/0161243 A1, 2008/0261877 A1 o 2008/0153751 A1 o las publicaciones de solicitud PCT n.º 2008/033413 A2, 2009/058322 A1 o 2007/021494 A2.

En determinadas realizaciones, el resto heterólogo es un resto de unión a albúmina, que comprende un péptido de unión a albúmina, un dominio bacteriano de unión a albúmina, un fragmento de anticuerpo de unión a albúmina o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, la proteína de unión a albúmina puede ser una proteína bacteriana de unión a albúmina, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo incluyendo anticuerpos de dominio (véase la patente de Estados Unidos n.º 6.696.245). Una proteína de unión a albúmina, por ejemplo, puede ser un dominio bacteriano de unión a albúmina, tal como la proteína G estreptocócica (Konig, T. y Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83). Otros ejemplos de péptidos de unión a albúmina que pueden usarse como compañero de conjugación son, por ejemplo, los que tienen una secuencia consenso Cys-Xaa 1 -Xaa 2 -Xaa 3 -Xaa 4 -Cys, en la que Xaa 1 es Asp, Asn, Ser, Thr o Tip; Xaa 2 es Asn, Gln, H es, Ile, Leu o Lys; Xaa 3 es Ala, Asp, Phe, Trp o Tyr; y Xaa 4 es Asp, Gly, Leu, Phe, Ser o Thr como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0069395 o Dennis *et al.* (Dennis et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 35035-35043).

En otras realizaciones, el resto heterólogo es una secuencia PAS. Una secuencia PAS, como se usa en este documento, significa una secuencia de aminoácidos que comprende principalmente residuos de alanina y serina o que comprende principalmente residuos de alanina, serina y prolina, formando la secuencia de aminoácidos una conformación de enrollamiento aleatorio en condiciones fisiológicas. Por consiguiente, la secuencia PAS es un componente básico, un polímero de aminoácidos o un casete de secuencia que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en alanina, serina y prolina, que puede usarse como parte del resto heterólogo en la proteína química. Además, los expertos en la materia son conscientes de que un polímero de aminoácidos también puede formar una conformación de enrollamiento aleatorio cuando se añaden residuos distintos de alanina, serina y prolina como constituyente minoritario en la secuencia PAS.

Ejemplos no limitantes de las secuencias PAS que forman una conformación de enrollamiento aleatorio comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 17), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 18), APSSPSPAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO: 19), APSSPSPAPSSPSPASPS (SEQ ID NO: 20), SSPSAPSPSPSPSPSPSPA (SEQ ID NO: 21), AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 22) y ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 23) o cualquier combinación de las mismas. Ejemplos adicionales de secuencias PAS son conocidas de, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2010/0292130 A1 y la publicación de solicitud PCT n.º WO 2008/155134 A1.

En otras realizaciones más, el resto heterólogo es un polímero homoaminoacídico (HAP) rico en glicina. La secuencia HAP puede comprender una secuencia repetitiva de glicina, que tiene al menos 50 aminoácidos de longitud. En una realización, la secuencia HAP puede prolongar la semivida de un resto fusionado a o ligado a la secuencia HAP. Ejemplos no limitantes de la secuencia HAP incluyen, aunque sin limitación (Gly)_n, (Gly₄Ser)_n o S(Gly₄Ser)_n, en la que n es de 1 a 20, de 20 a 40 o de 40 a 200. Véase, por ejemplo, Schlapschy M *et al.*, Protein Eng. Design Selection, 20: 273-284 (2007).

En determinadas realizaciones, el resto heterólogo es transferrina o un fragmento de la misma. Puede usarse cualquier transferrina para preparar las proteínas químicas usadas de acuerdo con la invención. Como ejemplo, Tf humana de tipo silvestre (Tf) es una proteína de 679 aminoácidos, de aproximadamente 75 kDa (sin tener en cuenta la glucosilación), con dos dominios principales, N (aproximadamente 330 aminoácidos) y C (aproximadamente 340 aminoácidos), que parecen originarse a partir de una duplicación génica. Véanse los números de acceso a GenBank NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM039847 y S95936 (ncbi.nlm.nih.gov/). Las transferrina comprende dos dominios, dominio N y dominio C. El dominio N comprende dos subdominios, dominio N1 y dominio N2, y el dominio C comprende dos subdominios, dominio C1 y dominio C2.

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

En otras realizaciones, el resto heterólogo es un polímero soluble conocido en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, polietilenglicol, copolímero de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano o poli(alcohol vinílico).

El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. Para el polietilenglicol, en una realización, el peso molecular es entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa para facilitar la manipulación y fabricación. Pueden usarse otros tamaños, dependiendo del perfil deseado (por ejemplo, la duración de la liberación mantenida deseada, los efectos, si los hay, sobre la actividad biológica, la facilidad de manipulación, el grado o ausencia de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol para una proteína o análogo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 200 a aproximadamente 100 000 kDa.

En algunas realizaciones, el polietilenglicol puede tener una estructura ramificada. Se describen polietilenglicoles ramificados, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.643.575; Morpurgo *et al.*, Appl. Biochem. Biotechnol. 56: 59-72 (1996); Vorobjev *et al.*, Nucleosides Nucleotides 18: 2745-2750 (1999); y Caliceti *et al.*, Bioconj. Chem. 10: 638-646 (1999).

En determinadas realizaciones, el resto heterólogo es un hidroxietil almidón (HES) o un derivado del mismo. El HES es un derivado de amilopectina de origen natural y se degrada por la alfa-amilasa en el organismo. El HES es un derivado sustituido del carbohidrato polimérico amilopectina, que está presente en almidón de maíz a una concentración de hasta un 95 % en peso. El HES presenta propiedades biológicas ventajosas y se usa como agente de reposición de la volemia y en tratamiento de hemodilución en clínica (Sommermeyer *et al.*, Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278 (1987); y Weidler *et al.*, Arzneim.-Forschung/Drug Res., 41, 494-498 (1991)).

El HES se caracteriza principalmente por la distribución de peso molecular y el grado de sustitución. El grado de sustitución, indicado como DS, se refiere a la sustitución molar, es conocido por los expertos en la materia. Véase Sommermeyer *et al.*, Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278 (1987), como se indica anteriormente, en particular pág. 273. En una realización, el HES tiene un peso molecular medio (media ponderada) de 1 a 300 kDa, de 2 a 200 kDa, de 3 a 100 kDa o de 4 a 70 kDa. El HES puede presentar además un grado molar de sustitución de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,1 a 2, más preferido, de 0,1 a 0,9, preferiblemente de 0,1 a 0,8, y una relación entre la sustitución C2:C6 en el intervalo de 2 a 20 con respecto a los grupos hidroxietilo. En determinadas realizaciones, el resto heterólogo puede ser mezclas de hidroxietil almidones que tienen diferentes pesos moleculares medios y/o diferentes grados de sustitución y/o diferentes relaciones de sustitución C2: C6.

En otras realizaciones más, el resto heterólogo no polipeptídico es un polímero, por ejemplo, poli(ácidos siálicos) (PSA) o un derivado de los mismos. Los poli(ácidos siálicos) (PSA) son polímeros no ramificados de origen natural de ácido siálico producidos por determinadas cepas bacterianas y en mamíferos en determinadas células. Roth J., *et al.* (1993) en Polysialic Acid: From Microbes to Man, eds. Roth J., Rutishauser U., Troy F. A. (Birkhäuser Verlag, Basel, Suiza), pág. 335-348. Pueden producirse en diversos grados de polimerización de n = aproximadamente 80 o más residuos de ácido siálico hasta $n = 2$ por hidrólisis ácida limitada o por digestión con neuraminidasas, o por fraccionamiento de las formas naturales derivadas de forma bacteriana del polímero. Se han descrito diversos métodos de fijación o conjugación de poli(ácidos siálicos) a un polipéptido (por ejemplo, véase la patente de Estados Unidos n.º 5.846.951; documento WO-A-0187922 y documento US 2007/0191597 A1).

Se divulga descripción más detallada y las secuencias de los restos heterólogos que pueden usarse en esta invención, por ejemplo, en los documentos WO 2013/123457 A1 y WO 2013/106787 A1.

En determinadas realizaciones, el polipéptido de interés es un híbrido de monómero-dímero que comprende un factor de coagulación. En una realización, el híbrido de monómero-dímero es 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 región Fc y la segunda cadena comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región Fc sin el factor de coagulación. Se describen diversos ejemplos de híbridos de monómero-dímero que comprenden uno o más factores de coagulación en la patente de Estados Unidos n.º 8.329.182.

Anticuerpos

En algunas realizaciones, el polipéptido de interés comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Los anticuerpos son proteínas que tienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno particular. Cualquier anticuerpo que pueda expresarse en una célula hospedadora puede usarse de acuerdo con la presente invención. En una realización, el polipéptido de interés es un anticuerpo monoclonal.

Anticuerpos particulares pueden prepararse, por ejemplo, preparando y expresando genes sintéticos que codifican las secuencias de aminoácidos indicadas o mutando genes de la línea germinal humana para proporcionar un gen que codifique las secuencias de aminoácidos indicadas. Además, estos anticuerpos pueden producirse, por ejemplo, usando uno o más de los siguientes métodos.

Están disponibles numerosos métodos para obtener anticuerpos, particularmente anticuerpos humanos. Un método ejemplar incluye cribar colecciones de expresión de proteínas, por ejemplo, colecciones de presentación en fagos o ribosomas. La presentación en fagos se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.223.409; Smith (1985) Science 228: 1315-1317; documento WO 92/18619; documento WO 91/17271; documento WO 92/20791; documento WO 92/15679; documento WO 93/01288; documento WO 92/01047; documento WO 92/09690; y documento WO 90/02809. La presentación de Fab en fagos se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.658.727; 5.667.988 y 5.885.793.

Además del uso de colecciones de presentación, pueden usarse otros métodos para obtener un anticuerpo. Por ejemplo, puede usarse una proteína o un péptido de la misma como antígeno en un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, hámster o rata.

Pueden generarse anticuerpos humanizados reemplazando secuencias de la región variable Fv que no están directamente implicados en la unión al antígeno con secuencias equivalentes de regiones variables Fv humanas. Se proporcionan métodos generales para generar anticuerpos humanizados por Morrison, S. L. (1985) Science 229: 1202-1207, por Oi *et al.* (1986) BioTechniques 4: 214 y por la patente de Estados Unidos n.º 5.585.089; patente de Estados Unidos n.º 5.693.761; patente de Estados Unidos n.º 5.693.762; patente de Estados Unidos n.º 5.859.205; y patente de Estados Unidos n.º 6.407.213. Esos métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican la totalidad o parte de regiones variables Fv de inmunoglobulina de al menos una de una cadena pesada o ligera. Las fuentes de dicho ácido nucleico son bien conocidas por los expertos en la materia y, por ejemplo, pueden obtenerse de un híbrido que produce un anticuerpo contra una diana predeterminada, como se describe anteriormente, de genes de inmunoglobulina de la línea germinal, o de construcciones sintéticas. El ADN recombinante que codifica el anticuerpo humanizado entonces puede clonarse en un vector de expresión apropiado.

Los anticuerpos pueden estar en forma de anticuerpos de longitud completa, o en forma de fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂, Fd, dAb y scFv. Formas adicionales incluyen una proteína que incluye un solo dominio variable, por ejemplo, un dominio de camélido o camelizado. Véase, por ejemplo, el documento U.S. 2005-0079574 y Davies *et al.* (1996) Protein Eng. 9(6): 531-7.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede ser un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o Fv monocatenario. Típicamente, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo monoespecífico.

En otra realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, humanizado, con injerto de CDR, quimérico, mutado, de afinidad madurada, desimmunizado, sintético o generado *in vitro* de otro modo, y combinaciones de los mismos.

Las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo pueden ser sustancialmente de longitud completa. La proteína puede incluir al menos una, o dos, cadenas pesadas completas, y al menos una, o dos, cadenas ligeras completas, o puede incluir un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o Fv monocatenario). En otras realizaciones más, el anticuerpo tiene una región constante de la cadena pesada elegida de, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE; particularmente, elegida de, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, más particularmente, IgG1 (por ejemplo, IgG1 humana). Típicamente, la región constante de la cadena pesada es humana o una forma modificada de una región constante humana. En otra realización, el anticuerpo tiene una región constante de la cadena ligera elegida de, por ejemplo, kappa o lambda, particularmente, kappa (por ejemplo, kappa humana).

Los métodos de la invención pueden usarse para preparar polipéptidos que comprenden anticuerpos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, es decir, anticuerpos que tienen dominios constantes de inmunoglobulina de anticuerpo humano acoplados a uno o más dominios variables de inmunoglobulina de anticuerpo murino, y/o anticuerpos no humanos, o fragmentos de los mismos. Ejemplos específicos de anticuerpos adecuados para su uso en la presente invención incluyen anticuerpos disponibles en el mercado tales como muromonab-CD3 (ORTHOCLONE OKT-3®, Ortho Biotech), abciximab (R.EOPRO®, Lilly), rituximab (RITUXAN®, Biogen IDEC), natalizumab (TYSABRI®, Biogen IDEC), dacliximab (ZENAPAX®, Roche Laboratories), basiliximab (SIMULECT®, Novartis), infliximab (REMICADE®, Centocor), palivizumab (SYNAGIS®, MedImmune), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), gemtuzuman ozogamicina (MYLOTARG™, Wyeth-Ayerst), alemtuzumab (CAMPATH®, Berlex) y cualquier combinación de los mismos.

Ejemplos de anticuerpos o conjugados de anticuerpo/citotoxina o anticuerpos/luminóforo contemplados para su uso en la invención incluyen los que reconocen uno o más de los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-6, receptor de IL-13, PDGF-β, VEGF, TGF, TGF-β2, TGF-β1, receptor de EGF, receptor de VEGF, complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, LCG (que es un producto génico que se expresa en asociación con cáncer pulmonar), HER-2, una glucoproteína asociada a tumor TAG-72, el antígeno SK-1, epítomos asociados a tumor que están presentes en niveles elevados en los sueros de pacientes con cáncer de colon y/o pancreático, epítomos asociados a cáncer o polipéptidos

expresados en células de cáncer de mama, colon, escamocelular, próstata, pancreático, pulmonar y/o renal y/o en células de melanoma, glioma o neuroblastoma, receptores de TRAIL 1, 2, 3 y 4, el núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, la integrina VLA-4, integrinas B2, TNF- α , la molécula de adhesión VAP-1, molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), molécula de adhesión intercelular-3 (ICAM-3), leucointegrina adhesina, la glucoproteína plaquetaria gp IIb/IIIa, cadena pesada de miosina cardíaca, hormona paratiroidea, rNAPc2 (que es un inhibidor del factor VIIa-tromboplastina tisular), MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), CTLA-4 (que es un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos), receptor de Fc- γ -1, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, L-selectina, IFN- γ , virus sincitial respiratorio, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.

Los métodos de la invención también pueden usarse para anticuerpos antiidiotípicos, o polipéptidos sustancialmente similares incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos antiidiotípicos contra: un anticuerpo dirigido al antígeno tumoral gp72; un anticuerpo contra el gangliósido GD3; o un anticuerpo contra el gangliósido GD2.

Receptores

En algunas realizaciones, el polipéptido de interés comprende un receptor. Los receptores son típicamente glucoproteínas transmembranarias que funcionan reconociendo un ligando de señalización extracelular. Los receptores típicamente tienen un dominio proteína cinasa además del dominio de reconocimiento de ligando, que inicia una ruta de señalización fosforilando moléculas intracelulares diana tras la unión al ligando, dando lugar a cambios en el desarrollo o metabólicos dentro de la célula. El receptor puede modificarse para retirar el uno o más dominios transmembranarios y/o intracelulares, en cuyo lugar puede fijarse opcionalmente un dominio de Ig.

Una gran familia de receptores es las tirosina cinasas receptoras (RTK). La familia de RTK incluye receptores que son cruciales para una diversidad de funciones en numerosos tipos celulares (véase, por ejemplo, Yarden y Ullrich, Ann. Rev. Biochem, 57: 433-478, 1988; Ullrich y Schlessinger, Cell 61: 243-254, 1990, incorporado en este documento). Ejemplos no limitantes de RTK incluyen miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), tirosina cinasa con receptores de inmunoglobulina y de dominios de homología-1 de EGF (TIE-1) y TIE-2 (Sato *et al.*, Nature 376(6535): 70-74 (1995), incorporado en este documento por referencia) y receptor de c-Met, de los que algunos de ellos se ha sugerido que promueven la angiogénesis, directa o indirectamente (Mustonen y Alitalo, J Cell Biol. 129: 895-898, 1995). Otros ejemplos no limitantes de RTK incluyen cinasa hepática fetal 1 (FLK-1) (a veces denominada receptor que contiene dominio de inserción de cinasa (KDR) (Terman *et al.*, Oncogene 6:1677-83, 1991) o receptor 2 del factor de crecimiento celular del endotelio vascular (VEGFR-2)), tirosina cinasa-1 de tipo fins (Flt-1) (DeVries *et al.* Science 255: 989-991, 1992; Shibuya *et al.*, Oncogene 5: 519-524, 1990), a veces denominado receptor 1 del factor de crecimiento celular del endotelio vascular (VEGFR-1), neuropilina-1, endogлина, endosialina y Ax1.

Receptores acoplados a proteína G

En algunas realizaciones, el polipéptido de interés comprende un receptor acoplado a proteína G (GPCR). Los GPCR son proteínas que tienen siete dominios transmembranarios. Tras la unión de un ligando a un GPCR, se transduce una señal dentro de la célula, que provoca un cambio en una propiedad biológica o fisiológica de la célula.

Los GPCR, junto con las proteínas G y efectores (enzimas intracelulares y canales que se modulan por proteínas G), son los componentes de un sistema de señalización modular que conecta el estado de los segundos mensajeros intracelulares con aportes extracelulares. Estos genes y productos génicos son posibles agentes causantes de enfermedad.

La superfamilia de proteínas GPCR ahora contiene más de 250 tipos de parálogos, receptores que representan variantes generadas por duplicaciones génicas (u otros procesos), en oposición a los ortólogos, el mismo receptor de diferentes especies. La superfamilia puede descomponerse en cinco familias: familia I, receptores tipificados por el receptor de rodopsina y beta2-adrenérgico y actualmente representada por más de 200 miembros únicos; familia II, la familia recientemente caracterizada de receptor de la hormona paratiroidea/calcitonina/secretina; familia III, la familia del receptor metabotrópico de glutamato en mamíferos; familia IV, la familia del receptor de AMPc, importante en la quimiotaxis y el desarrollo de *D. discoideum*; y familia V, los receptores de feromonas de acoplamiento fúngico tales como STE2.

Factores de crecimiento y otras moléculas de señalización

En algunas realizaciones, el polipéptido de interés comprende un factor de crecimiento o una molécula de señalización. Los factores de crecimiento típicamente son glucoproteínas que se secretan por células y se unen a y activan receptores en otras células, iniciando un cambio metabólico o en el desarrollo en la célula receptora.

Polipéptidos que contienen CH2/CH3

Cualquier polipéptido que contenga un dominio CH2/CH3 es adecuado para su uso de acuerdo con la presente invención. En una realización, el polipéptido que contiene CH2/CH3 es una forma soluble del receptor de TNF fusionado a una región Fc (TNFR-Fc). Un TNFR-Fc disponible en el mercado es conocido como etanercept (ENBREL®, Immunex Corporation), que es un polipéptido de fusión dimérico que consiste en la parte de unión a ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) de 75 kilodalton humano (p75) ligada a la parte Fc de IgG1 humana. El componente Fc de etanercept contiene el dominio peso constante 2 (CH2), el dominio pesado constante 3 (CH3) y la región de bisagra, pero no el dominio pesado constante 1 (CH1) de IgG1 humana. Debe apreciarse que una región Fc puede contener uno o todos los dominios descritos anteriormente. Etanercept se produce por tecnología de ADN recombinante en un sistema de expresión celular de mamífero de ovario de hámster chino (CHO). Consiste en 934 aminoácidos y tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilodalton (Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc.).

Ortos polipéptidos que pueden purificarse de acuerdo con la invención incluyen polipéptidos de fusión recombinantes que comprenden al menos una parte de una región Fc de un anticuerpo. Un polipéptido fusionado a un dominio Fc (por ejemplo, un dominio CH2/CH3) e idéntico o sustancialmente similar a uno de los siguientes polipéptidos es adecuado para su uso en el presente método divulgado: un ligando flt3, un ligando CD40, eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, ligando Fas, ligando para el activador receptor de NF-kappa B (RANKL), ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL), linfopoyetina derivada del estroma tímico, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células madre, factor de crecimiento epidérmico, RANTES, hormona del crecimiento, insulina, insulínotropina, factores de crecimiento similares a insulina, hormona paratiroidea, interferones, factores de crecimiento nervioso, glucagón, interleucinas 1 a 18, factores estimulantes de colonias, linfotoxina-β, factor de necrosis tumoral (TNF), factor inhibidor de leucemia, oncostatina-M, diversos ligandos para moléculas de superficie celular ELK y Hek (tal como los ligandos para cinasas relacionadas con eph o LERKS) y cualquier combinación de los mismos.

Los polipéptidos adecuados para purificación de acuerdo con la invención también incluyen polipéptidos de fusión recombinantes que comprenden dominios CH2/CH3 de un anticuerpo más un receptor para cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente o polipéptidos sustancialmente similar a dichos receptores. Estos receptores incluyen: ambas formas de TNFR (denominadas p55 y p75), receptores de interleucina-1 (tipo 1 y 2), receptor de interleucina-4, receptor de interleucina-15, receptor de interleucina-17, receptor de interleucina-18, receptor de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, receptor de factor estimulante de colonias de granulocitos, receptores para oncostatina-M y factor inhibidor de leucemia, activador receptor de NF-kappa B (RANK), receptores para TRAIL (receptores 1, 2, 3 y 4 de TRAIL) y receptores que comprenden dominios de muerte, tales como el receptor de Fas o inductor de apoptosis (AIR), así como cualquier combinación de los mismos.

Otros polipéptidos adecuados para su uso en el presente método incluyen antígenos de diferenciación (denominados polipéptidos CD) o sus ligandos o polipéptidos sustancialmente similar a cualquiera de estos, que se fusionan a dominios CH2/CH3 de un anticuerpo. Dichos antígenos se divulgan en Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani *et al.*, eds., Kobe, Japón, 1996). Se divulgan polipéptidos CD similares en seminarios y conferencias posteriores en la serie de procedimientos mencionada anteriormente. Ejemplos de dichos antígenos incluyen CD27, CD30, CD39, CD40, y ligandos para los mismos (ligando de CD27, ligando de CD30, etc.). Varios de los antígenos CD son miembros de la familia del receptor de TNF, que también incluye ligando 41BB y OX40. Los ligandos a menudo son miembros de la familia de TNF, como son el ligando 41BB y el ligando OX40. Por consiguiente, los miembros de las familias de TNF y TNFR pueden purificarse de acuerdo con la presente invención.

Los polipéptidos enzimáticamente activos o sus ligandos también pueden purificarse de acuerdo con la invención. Ejemplos incluyen polipéptidos de fusión recombinantes que comprenden dominios CH2/CH3 de un anticuerpo fusionados a la totalidad o parte de uno de los siguientes polipéptidos o sus ligandos o un polipéptido sustancialmente similar a uno de estos: miembros de la familia de metaloproteínasa-disintegrina, diversas cinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, activador tisular del plasminógeno, factor VIII, factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, globinas, un antagonista de IL-2, alfa-1 antitripsina, enzima convertidora de TNF-alfa, ligandos para cualquiera de las enzimas mencionadas anteriormente, otras numerosas enzimas y sus ligandos, y cualquier combinación de los mismos.

B. Producción de polipéptidos de interés en un cultivo celular

Células

Un polipéptido de interés primero se expresa y se produce en una célula hospedadora. Las células hospedadoras incluyen, aunque sin limitación, células procariotas, células eucariotas, células vegetales, células de levadura, células animales, células de insecto, células aviares, células de mamífero y células humanas.

Ejemplos no limitantes de células procariotas que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen células bacterianas, tales como bacterias gramnegativas o grampositivas, por ejemplo, *Escherichia coli*.

Ejemplos no limitantes de células de mamífero que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36: 59 (1977)); línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/1, ECACC n.º: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Países Bajos)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervicouterino humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL5 1); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci., 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Además, pueden utilizarse muchísimas líneas celulares disponible en el mercado y no disponibles en el mercado que expresan polipéptidos o proteínas, de acuerdo con la presente invención.

Las células hospedadoras también pueden seleccionarse o manipularse para modificar sus rutas de modificación postraduccional. Por ejemplo, las células pueden seleccionarse o manipularse para modificar una ruta de glucosilación proteínica.

Procesos de cultivo celular para la producción de polipéptido de interés

Diversos métodos de preparación de células de mamífero para la producción de proteínas o polipéptidos por cultivo discontinuo o semicontinuo son bien conocidos en la técnica. Un ácido nucleico suficiente para conseguir la expresión (típicamente un vector que contiene el gen que codifica el polipéptido o proteína de interés y cualquier elemento de control genético unido de forma funcional) puede introducirse en la línea celular hospedadora por muchísimas técnicas bien conocidas. Típicamente, las células se criban para determinar las células hospedadoras que han captado realmente el vector y expresan el polipéptido o proteína de interés. Los métodos tradicionales de detección de un polipéptido o proteína de interés particular expresada por células de mamífero incluyen, aunque sin limitación, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, citometría de flujo, microscopia de inmunofluorescencia, SDS-PAGE, transferencias de Western, ensayos de actividad biológica y cromatografía de afinidad. Un experto en la materia será consciente de otras técnicas apropiadas para detectar polipéptidos o proteínas expresadas. Si múltiples células hospedadoras expresan el polipéptido o proteína de interés, algunas o todas las técnicas enumeradas pueden usarse para determinar las células que expresan ese polipéptido o proteína a los niveles más altos.

C. Purificación de polipéptido de interés

Los procedimientos para la purificación de proteínas a partir de cultivo celular dependen inicialmente del sitio de expresión de la proteína. Puede provocarse que algunas proteínas se secreten directamente desde la célula en el medio de crecimiento circundante; otras se generan de forma intracelular. Para las últimas proteínas, la primera etapa de un proceso de purificación implica la lisis de la célula, que puede hacerse mediante una diversidad de métodos, incluyendo cizallamiento mecánico, choque osmótico o tratamientos enzimáticos. Dicha alteración libera los contenidos completos de la célula en el homogeneizado, y además produce fragmentos subcelulares que son difíciles de retirar debido a su pequeño tamaño. Estos se retiran en general por centrifugación diferencial o por filtración. Surge el mismo problema, aunque a menor escala, con proteínas secretadas directamente, debido a la muerte natural de las células y liberación de proteínas intracelulares de la célula hospedadora en el transcurso del ciclo de producción de proteínas.

Una vez se ha obtenido una solución aclarada que contiene la proteína de interés, su separación de las otras proteínas producidas por la célula, así como de otras impurezas se intenta habitualmente usando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. Estas técnicas separan mezclas de proteínas basándose en su carga, grado de hidrofobia, tamaño o afinidad de unión específica.

III. Inactivación de virus durante el proceso de purificación de proteínas

Una preocupación crucial durante el proceso de purificación de proteínas es la inactivación o retirada de contaminaciones víricas. Cuando un polipéptido de interés se produce de forma recombinante en un cultivo celular, el ADN recombinante que codifica el polipéptido debe transfectarse en las células productoras de proteína. Los virus pueden permanecer en el cultivo después de transfección y contaminar las muestras proteínicas. Además, las células usadas para expresar proteínas de interés pueden codificar genomas víricos en su ADN o contener de otro modo virus endógenos, que es otra posible fuente de contaminación a un producto terapéutico derivado de células. Un producto terapéutico derivado biológicamente, tal como un polipéptido producido en un cultivo celular, debe experimentar al menos dos etapas robustas de purificación de virus para cumplir los requisitos de seguridad de las agencias reguladoras tales como la FDA para garantizar que no se administran virus activos a un paciente.

Se conocen varios métodos en la técnica para inactivar virus. Por ejemplo, puede usarse arginina para inactivación vírica, tal como el método descrito en la publicación de Estados Unidos n.º 2012/0015424 A1. Cada método, sin embargo, tiene sus propias desventajas, y puede no ser adecuado u óptimo para algunos productos proteínicos.

Cuando se usa bajo pH para inactivar virus, tiene el potencial de precipitar proteínas, provocar agregación del producto y/o alterar la conformación de determinadas proteínas, lo que puede dar lugar a pérdida de producto. Además, durante el proceso de purificación de la proteína, la etapa de inactivación vírica a bajo pH se realiza típicamente después de que la proteína de interés haya eluido de la columna de cromatografía y se haya mantenido en un depósito o recipiente, especialmente si se sabe que la proteína diana eluye de la matriz en condiciones de bajo pH, provocando pérdida significativa de producto. Por ejemplo, un polipéptido que contiene CH2/CH3 tal como un anticuerpo monoclonal o FIX-Fc se eluye de la columna de proteína A a valores de pH por debajo de 4,5.

La presente invención proporciona un método novedoso de inactivación vírica en columna como se define en las reivindicaciones, que comprende lavar una matriz de cromatografía unida al polipéptido con una solución de lavado de bajo pH y alta salinidad que inactiva de forma eficaz los virus y maximiza la recuperación del polipéptido. Realizar la etapa de inactivación a bajo pH sobre un polipéptido unido a una matriz de cromatografía mejora la estabilidad del polipéptido porque el polipéptido unido tiende a conservar su conformación natural y no puede agregarse entre sí. Además, la presencia de alta salinidad en la solución de lavado reduce significativamente la elución del polipéptido en condiciones de bajo pH.

La presente invención proporciona un método de inactivación de virus que está presente durante la producción de un polipéptido de interés, que comprende: (a) unir el polipéptido a una matriz de cromatografía, y (b) realizar una etapa de inactivación vírica lavando la matriz de cromatografía unida al polipéptido con una solución de lavado a un pH de menos de aproximadamente 4,0. La solución de lavado usada de acuerdo con la presente invención comprende una concentración suficiente de sal para reducir sustancialmente la elución del polipéptido durante la etapa de inactivación vírica. La reducción sustancial de la elución del polipéptido se debe probablemente a interacciones hidrófobas potenciadas entre el polipéptido y la matriz.

Los métodos de la presente invención son útiles para inactivar una amplia gama de virus con envuelta. Los virus que pueden inactivarse mediante realizaciones de la presente invención incluyen, sin limitación, virus con envuelta clasificados tales como, por ejemplo, virus de leucemia de mamífero o aviar, virus del herpes, virus de la viruela, hepadnavirus, flavivirus, togavirus, coronavirus, virus de la hepatitis, retrovirus, ortomixovirus, paramixovirus, radovirus, bunyavirus, filovirus, reovirus, virus de la encefalitis, virus Sindbis, virus de la estomatitis vesicular, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la rinitis, virus de Epstein Barr, citomegalovirus, virus de la gripe, virus Sendai, virus de la variolovacuna o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, el polipéptido de interés se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo, un polipéptido que contiene CH2/CH3, un factor de coagulación, un receptor y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el polipéptido de interés es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.

En algunas realizaciones, el polipéptido de interés comprende un factor de coagulación. En determinadas realizaciones, el polipéptido de interés es FIX-Fc, FVIII-Fc o FVII-Fc. En determinadas realizaciones, el polipéptido es un híbrido de monómero-dímero. En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende además un resto heterólogo.

Pueden usarse muchas técnicas de cromatografía conocidas en la técnica en la presente invención. En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía es una matriz de cromatografía de afinidad. En una realización, la matriz de cromatografía de afinidad es una columna de proteína A. En otra realización más, la columna de proteína A se selecciona del grupo que consiste en MABSELECT™, MABSELECT™ SuRe, MABSELECT™ SuRe LX, ESHMUNO® A, AMSPHERE™ JWT203, TOYOPEARL® AF-rProtein A-650F, PROSEP®-vA Ultra, PROSEP® Ultra Plus, PROSEP®-vA High Capacity, y cualquier combinación de las mismas. Ejemplos no limitantes de matriz de cromatografía que puede usarse para inmovilizar el ligando de proteína incluyen matriz basada en dextrano, matriz basada en agarosa, matriz basada en poliestireno, matriz hidrófila basada en polivinil etilo, matriz rígida basada en polimetacrilato, matriz porosa basada en polímero, matriz de poro controlado basada en vidrio y cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía es una matriz de cromatografía de modo mixto. En una realización, la matriz de cromatografía es una matriz de cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto. En una realización, la matriz de cromatografía de modo mixto se selecciona del grupo que consiste en CAPTO™ Adhere, CAPTO™ MMC, ESHMUNO® HCX, CAPTO™ MMC ImpRes, CAPTO™ Blue, NUVIA™ cPrime, BLUE SEPHAROSE® Fast Flow, CAPTO™ Adhere ImpRes, CHT™ Ceramic Hydroxyapatite, CFT™ Ceramic Fluoroapatite y cualquier combinación de las mismas. Ejemplos no limitantes de matriz de cromatografía de modo mixto incluyen matriz basada en dextrano, matriz basada en agarosa, matriz basada en poliestireno, matriz basada en polímero hidrófilo de polivinil etilo, matriz

basada en polímero macroporoso altamente reticulado, matriz basada en hidroxiapatita ((Ca₅(PO₄)₃OH)₂), matriz basada en fluoroapatita ((Ca₅(PO₄)₃F)₂) y cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, el polipéptido de interés en primer lugar se recoge después de producirse de forma recombinante en cultivo celular. En determinadas realizaciones, el polipéptido se carga en la matriz de cromatografía a un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0. En algunas realizaciones, el pH del tampón de carga es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0 o de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0. En una realización, el pH del tampón de carga es aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5 o aproximadamente 8,0.

Una o más etapas de lavado pueden realizarse antes de eluir el polipéptido de la matriz de cromatografía. Pueden usarse soluciones de lavado iguales o diferentes en estas etapas de lavado.

En determinadas realizaciones, el pH de la solución de lavado es de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,0, de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,5 o de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,0. En determinadas realizaciones, el pH de la solución de lavado es aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,7, aproximadamente 2,8, aproximadamente 2,9, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9 o aproximadamente 4,0. En una realización, el pH de la solución de lavado es 3,0. En otra realización, el pH de la solución de lavado es 3,5.

Ejemplos no limitantes de sales que pueden añadirse a la solución o a cualquier tampón usado de acuerdo con la presente invención incluyen sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio, sales de bario, sales de cinc, sales de aluminio, sales de amonio, sales de cloruro, sales de fluoruro, sales de bromuro, sales de yoduro, sales de carbonato, sales de nitrato, sales de fosfato, sales de sulfato, sales de acetato y combinación de las mismas. En una realización, la sal es cloruro de sodio (NaCl). En otra realización, la sal es sulfato de amonio.

En determinadas realizaciones, la concentración de la sal en la solución de lavado es mayor de aproximadamente 0,5 M. En algunas realizaciones, la concentración de la sal en la solución de lavado es de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 2,5 M, de aproximadamente 2,5 M a aproximadamente 3,0 M, de aproximadamente 3,0 M a aproximadamente 3,5 M o de aproximadamente 3,5 M a aproximadamente 4 M. En algunas realizaciones, la concentración de la sal en la solución de lavado es aproximadamente 0,5 M, aproximadamente 0,6 M, aproximadamente 0,7 M, aproximadamente 0,8 M, aproximadamente 0,9 M, aproximadamente 1,0 M, aproximadamente 1,1 M, aproximadamente 1,2 M, aproximadamente 1,3 M, aproximadamente 1,4 M, aproximadamente 1,5 M, aproximadamente 1,6 M, aproximadamente 1,7 M, aproximadamente 1,8 M, aproximadamente 1,9 M, aproximadamente 2,0 M, aproximadamente 2,1 M, aproximadamente 2,2 M, aproximadamente 2,3 M, aproximadamente 2,4 M, aproximadamente 2,5 M, aproximadamente 2,6 M, aproximadamente 2,7 M, aproximadamente 2,8 M, aproximadamente 2,9 M, aproximadamente 3,0 M, aproximadamente 3,1 M, aproximadamente 3,2 M, aproximadamente 3,3 M, aproximadamente 3,4 M, aproximadamente 3,5 M, aproximadamente 3,6 M, aproximadamente 3,7 M, aproximadamente 3,8 M, aproximadamente 3,9 M o aproximadamente 4,0 M. En una realización específica, la concentración de sal es aproximadamente 2 M. En otra realización específica, la concentración de sal es aproximadamente 3 M.

La solución de lavado puede comprender además uno o más componentes distintos tales como un polímero, un disolvente orgánico, un detergente, arginina o un derivado de arginina.

En determinadas realizaciones, el polímero es un polietilenglicol (PEG), un polipropilenglicol o una mezcla de los mismos. En una realización, el polímero es PEG. En una realización específica, el polímero es PEG 3350. En algunas realizaciones, la concentración del polímero es de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 20 %. En algunas realizaciones, la concentración del polímero es de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 15 %, de un 0,1 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 15 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 15 % o de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 20 %. En algunas realizaciones, la concentración del polímero es de aproximadamente un 0,1 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 11 %, aproximadamente un 12 %, aproximadamente un 13 %, aproximadamente un 14 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 16 %, aproximadamente un 17 %, aproximadamente un 18 %, aproximadamente un 19 % o aproximadamente un 20 %.

En determinadas realizaciones, el disolvente orgánico es etanol, metanol, isopropanol, acetona, etilenglicol, propilenglicol, hexaetilenglicol o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, la concentración del disolvente

orgánico es de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 20 %. En algunas realizaciones, la concentración del disolvente orgánico es de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 15 %, de un 0,1 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 15 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 15 % o de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 20 %. En algunas realizaciones, la concentración del disolvente orgánico es de aproximadamente un 0,1 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 11 %, aproximadamente un 12 %, aproximadamente un 13 %, aproximadamente un 14 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 16 %, aproximadamente un 17 %, aproximadamente un 18 %, aproximadamente un 19 % o aproximadamente un 20 %.

En determinadas realizaciones, el detergente se selecciona del grupo que consiste en condensado de octilfenol y óxido de etileno (por ejemplo, TRITON™ X-100); 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS); 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato (CHAPSO); óxido de laurildimetil amina (LDAO); polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); dodecil sulfato de sodio (SDS); laurel sulfato de sodio, octil glucósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaína, lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil-taurato de sodio o metil oleil-taurato de disodio; etilsulfato de 1-etil-1-(2-hidroxietil)-2-isoheptadecilimidazolinio (por ejemplo, la gama MONAQUAT™); y cualquier combinación de los mismos. Otros ejemplos de productos comerciales que comprenden compuestos similares a TRITON™ X-100 incluyen, aunque sin limitación, CONCO™ NI, DOWFAX™ 9N, IGEAL™ CO, MAKON™, NEUTRONYX® 600's, NONIPOL™ NO, POLYTERGENT® B, RENEX™ 600's, SOLAR™ NO, STEROX™, SERFONIC™ N, T-DET-N™, TERGITOL™ NP y TRITON™ N.

En algunas realizaciones, la concentración del detergente es de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 8 %. En algunas realizaciones, la concentración del detergente es de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 7 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 6 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 4 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 3 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 1 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,5 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,1 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 8 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 7 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 6 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 4 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 3 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 1 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,5 %, de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 8 %, de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 7 %, de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 6 %, de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 4 %, de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 3 %, de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 1 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 8 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 7 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 6 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 4 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 3 % o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 2 %. En algunas realizaciones, la concentración del detergente es de aproximadamente un 0,01 %, aproximadamente un 0,05 %, aproximadamente un 0,1 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 % o aproximadamente un 8 %.

En determinadas realizaciones, se realiza más de una etapa de inactivación vírica en columna durante la purificación del polipéptido. En una realización, se usan soluciones de lavado idénticas en múltiples etapas de inactivación vírica. En otra realización, se usan soluciones de lavado diferentes en múltiples etapas de inactivación vírica.

En algunas realizaciones, al menos una de las soluciones de lavado comprende arginina, un derivado de arginina o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, la concentración de arginina es de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 1 M. En algunas realizaciones, la concentración de arginina es de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 0,5 M o de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 1 M. En algunas realizaciones, la concentración de arginina es aproximadamente 0,1 M, aproximadamente 0,2 M, aproximadamente 0,3 M, aproximadamente 0,4 M, aproximadamente 0,5 M, aproximadamente 0,6 M, aproximadamente 0,7 M, aproximadamente 0,8 M, aproximadamente 0,9 M o aproximadamente 1 M.

En algunas realizaciones, al menos una de las soluciones de lavado comprende un detergente. En una realización, el detergente es óxido de laurildimetil amina (LDAO). En otra realización, el detergente es condensado de octilfenol y óxido de etileno (por ejemplo, TRITON™ X-100). En otras realizaciones, el detergente comprende un compuesto muy similar a TRITON™ X-100 (por ejemplo, CONCO™ NI, DOWFAX™ 9N, IGEAL™ CO, MAKON™, NEUTRONYX® 600's, NONIPOL™ NO, POLYTERGENT® B, RENEX™ 600's, SOLAR™ NO, STEROX™, SERFONIC™ N, T-DET-N™, TERGITOL™ NP y TRITON™ N).

En determinadas realizaciones, la elución del polipéptido durante la etapa de lavado de bajo pH para la inactivación vírica se reduce hasta menos de un 30 %. En determinadas realizaciones, la elución del polipéptido durante la etapa de lavado de bajo pH se reduce hasta menos de un 25 %, menos de un 20 %, menos de un 15 %, menos de un 10 % o menos de un 5 %.

Después de las etapas de lavado, el polipéptido de interés se eluye de la matriz de cromatografía con una solución de elución. En determinadas realizaciones, el pH de la solución de elución es menos de 4,5. En una realización, el pH de la solución de elución es aproximadamente 3,0. En otra realización, el pH de la solución de elución es aproximadamente 3,4.

En determinadas realizaciones, al menos aproximadamente un 70 % del polipéptido se recupera en la solución de elución. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % del polipéptido se recupera en la solución de elución.

Pueden realizarse etapas adicionales de inactivación vírica antes, o después, del método de inactivación vírica en columna divulgado en este documento.

El polipéptido de interés eluido puede someterse a etapas adicionales de purificación antes, o después, del método de purificación divulgado en este documento. Los métodos convencionales incluyen, aunque sin limitación, cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, afinidad, exclusión por tamaño e hidroxipatita), filtración en gel, centrifugación o solubilidad diferencial, precipitación en etanol o por cualquier otra técnica disponible para la purificación de proteínas (véase, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification Principles and Practice* 2.^a edición, Springer-Verlag, Nueva York, 1987; Higgins, S. J. y Hames, B. D. (eds.), *Protein Expression: A Practical Approach*, Oxford Univ Press, 1999; y Deutscher, M. P., Simon, M. I., Abelson, J. N. (eds.), *Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology* (Methods in Enzymology Series, Vol 182), Academic Press, 1997). Pueden añadirse inhibidores de proteasa tales como fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), leupeptina, pepstatina o aprotinina a alguna o todas las fases para reducir o eliminar la degradación del polipéptido o proteína durante el proceso de purificación. Los inhibidores de proteasa son particularmente deseados cuando las células deben lisarse para aislar y purificar el polipéptido o proteína expresada. Un experto en la materia apreciará que la técnica exacta de purificación variará dependiendo del carácter del polipéptido o proteína a purificar, el carácter de las células a partir de las que se expresa el polipéptido o proteína, y la composición del medio en que se cultivan las células.

El método de inactivación vírica de la presente invención puede usarse para ayudar a posibilitar procesos que utilizan múltiples columnas de cromatografía de afinidad como lecho móvil simulado o cromatografía en tándem que genera múltiples combinaciones de elución. En lugar de combinar las combinaciones de elución para realizar inactivación vírica a bajo pH, lo que puede provocar un largo mantenimiento a valores bajos de pH y una mayor pérdida de producto, o ir a través del tedioso y largo proceso de realizar inactivación vírica a bajo pH en las combinaciones individuales, la presente invención realiza inactivación vírica a bajo pH durante los ciclos individuales de cromatografía en tándem o en lecho móvil simulado, obviando, por tanto, la necesidad de inactivación vírica de las combinaciones de elución.

La descripción anterior tiene que entenderse como representativa solamente y no se pretende que sea limitante.

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que pertenece a las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2.^a Ed., Sambrook *et al.*, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, ed., Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1992); *DNA Cloning*, D. N. Glover ed., volúmenes I y II (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, M. J. Gait ed., (1984); Mullis *et al.* patente de Estados Unidos n.º: 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization*, B. D. Hames y S. J. Higgins eds. (1984); *Transcription And Translation*, B. D. Hames y S. J. Higgins eds. (1984); *Culture Of Animal Cells*, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., (1987); *Immobilized Cells And Enzymes*, IRL Press, (1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); el tratado, *Methods In Enzymology*, Academic Press, Inc., N.Y.; *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, J. H. Miller y M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); *Methods In Enzymology*, Vol. 154 y 155 (Wu *et al.* eds.); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology*, Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres (1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, volúmenes I-IV, D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., (1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

5 Ejemplo 1

Inactivación vírica en columna usando una solución de lavado

que contiene sulfato de amonio 2 M a pH 3,5

10 El objetivo de los experimentos mostrados en los ejemplos 1 a 10 es demostrar la viabilidad y aplicabilidad de una etapa de inactivación vírica a bajo pH usando ProA y un polipéptido diana. El polipéptido se unió a ProA en condiciones convencionales antes de aplicar una alta concentración salina a neutral pH a la columna. Después se aplicó un lavado posterior a alta salinidad y bajo pH para inactivar el virus mientras el polipéptido permanecía unido al adsorbente. Se realizó una serie de lavados antes de que se recuperara el polipéptido usando una solución de elución.

El objetivo del primer experimento fue determinar si podía realizarse inactivación vírica en columna con pérdida mínima de recuperación usando lavado con sulfato de amonio 2 M a pH 3,5.

20 En este experimento, en primer lugar se equilibró (EQ) una columna MABSELECT™ SuRe de 0,66 cm de diámetro (7,2 ml; 21 cm) con 4 volúmenes de columna (CV) de fosfato de sodio (fosfatoNa) 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. Entonces se cargaron 256 ml de líquido de cultivo celular recogido (HCCF) filtrado (a 0,22 µm) que contenía FIX-Fc producido de forma recombinante en la columna (25,5 mg de rFIXFc por ml de resina).

25 La carga fue seguida de siete etapas de lavado como se indica en la tabla 1 a continuación. El polipéptido diana posteriormente se eluyó con citrato 25 mM, NaCl 150 mM, pH 3,4. El caudal de la cromatografía fue constante a 300 cm/h o 1,7 ml/min, excepto en que se usó una tasa menor (100 cm/h) durante la etapa de lavado de bajo pH (lavado 4).

30 **Tabla 1.** Tampones individuales usados en el ejemplo 1.

Etapa	Componentes del tampón	pH	Vol.
EQ	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM	7,4	4 CVs
Carga	HCCF filtrado		256 ml
Lavado 1	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM	7,4	4,5 CVs
Lavado 2	FosfatoNa 10 mM, NaCl 900 mM	7,4	4 CVs
Lavado 3	Bis-Tris 100 mM, sulfato de amonio 2 M	7,0	4 CVs
Lavado 4	Bis-Tris 100 mM, sulfato de amonio 2 M	3,5	5 CVs
Lavado 5	Bis-Tris 100 mM, sulfato de amonio 2 M	7,0	4 CVs
Lavado 6	FosfatoNa 10 mM, NaCl 900 mM	7,4	4 CVs
Lavado 7	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM	7,4	3 CVs
Elución	Citrato 25 mM, NaCl 150 mM	3,4	3 CVs
Separación	FosfatoNa 10 mM, NaCl 900 mM	7,4	5 CVs
Regeneración	NaOH 0,1 N		3 CVs
HETP*	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM	7,4	4 CVs
Almacenamiento	Ácido acético 500 mM, alcohol bencílico al 1 %	3,2	5 CVs

* HETP significa altura de una placa de transferencia equivalente, que es una solución usada para medir la integridad de la columna.

35 La figura 1 es un cromatograma que muestra la concentración de proteína y el pH en cada fracción durante las etapas de cromatografía. La recuperación del polipéptido fue de un 84 % en el eluido, lo que es sorprendente dado el bajo pH del lavado 4 (pH = 3,5) porque dicho lavado de bajo pH habitualmente daría lugar a disociación del polipéptido de la columna y provocaría pérdida sustancial de producto. La eliminación vírica medida por PCR fue 4,96 log₁₀. La eliminación e inactivación combinada proporcionada por los lavados de columna fue mayor a > 6,39 log₁₀, lo que indica que el bajo pH puede proporcionar inactivación eficaz de los virus.

Se ensayaron muestras para virus infeccioso por ensayo de placas y para ácidos nucleicos víricos por ensayo de Q-PCR. La carga de la columna fue 25,5 mg de rFIXFc por ml de resina. las tablas 2 y 3 resumen los resultados de eliminación vírica de X-MLV medida por la infectividad y qPCR, respectivamente.

- 5 La carga se enriqueció con 8,79 log₁₀ de X-MLV (UFP) y se calculó una inactivación retrovítica > 6,39 log₁₀. Cuando se midió por qPCR, la carga se enriqueció con 8,77 log₁₀ de X-MLV (GC) y se calculó un factor de reducción de 4,96 log₁₀. Estos resultados muestran una eliminación retrovítica robusta por la columna MABSELECT™ SuRe a altas cargas y tampón adicional de bajo pH/alta salinidad. Los resultados de infectividad muestran la inactivación retrovítica total después de exponer la resina MABSELECT™ SuRe a una hora de tampón de bajo pH/alta salinidad.

10

Tabla 2. Datos de eliminación de X-MLV por etapa con MABSELECT™ SuRe por infectividad

Descripción de la muestra	Concentración vírica (UFP/ml)	Ajuste del volumen (ml)	Concentración vírica ajustada (UFP)	Concentración ajustada a log ₁₀ (UFP)	Reducción log ₁₀
Control de virus de reserva	4,67E+7	263,0	6,14E+8	8,79	0,00
Carga	2,33E+6	263,0	6,14E+8	8,79	0,00
Procesamiento de eluido 6	<5,99E+0	41,8	<2,50E+2	<2,40	>6,39
UFP = unidades formadoras de placas					

Tabla 3. Datos de eliminación de X-MLV por etapa con MABSELECT™ SuRe por Qpcr

Descripción de la muestra	Concentración vírica por qPCR (GC)	Ajuste del volumen (ml)	Concentración vírica ajustada (GC)	Concentración ajustada a log ₁₀ (GC)	Reducción log ₁₀
Control de virus de reserva	4,53E+7	263,0	5,96E+8	8,77	0,00
Carga	2,26E+6	263,0	5,94E+8	8,77	0,00
Procesamiento de eluido 6	1,53E+2	41,8	6,39E+3	3,81	4,96
GC = copias de genoma					

- 15 Por lo tanto, los resultados anteriores demuestran que una solución de lavado de bajo pH y alta salinidad puede inactivar de forma eficaz virus durante una proceso de purificación por cromatografía de proteína A sin retirar la mayoría del polipéptido diana de la columna.

Ejemplo 2

20

Inactivación vírica en columna usando una solución de lavado

que contiene arginina HCl 1 M a pH 4,7

- 25 El objetivo de este experimento fue comparar los efectos de la inactivación vírica en columna usando una solución de lavado que contenía arginina HCl 1 M a pH 4,7.

En este experimento, la columna de proteína A y el polipéptido diana fueron iguales que en el ejemplo 1. En primer lugar se equilibró una columna MabSelect SuRe de 7,0 ml (20,5 cm), y después se cargaron 157 ml de HCCF que contenía proteína de fusión a Fc en la columna. La tabla 4 a continuación resume las soluciones de tampón usadas en cada etapa. El polipéptido diana se unió a Pro A en condiciones convencionales. Después se aplicó un lavado 3 modificado posterior que contenía arginina para inactivar el virus mientras el polipéptido permanecía unido al adsorbente. El caudal de la cromatografía fue constante a 300 cm/h o 1,7 ml/min, excepto en que se usó una tasa menor (100 cm/h o 0,56 ml/min) durante la etapa de lavado con arginina (lavado 3).

35

Tabla 4. Tampones individuales usados en el ejemplo 2.

Etapas	Componentes del tampón	pH	Vol.
EQ	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM	7,4	4 CVs
Carga	HCCF filtrado		157 ml
Lavado 1	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM	7,4	4,5 CVs
Lavado 2	FosfatoNa 10 mM, NaCl 900 mM	7,4	4 CVs
Lavado 3	Arginina HCl 1 M	4,7	5 CVs
Lavado 4	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM	7,4	3 CVs
Elución	Citrato 25 mM, NaCl 150 mM	3,4	3 CVs
Separación	FosfatoNa 10 mM, NaCl 900 mM	7,4	5 CVs
Regeneración	NaOH 0,1 N		3 CVs
HETP	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM	7,4	4 CVs
Almacenamiento	Ácido acético 500 mM, alcohol bencílico al 1 %	3,2	5 CVs

La figura 2 es un cromatograma que muestra la concentración de proteína y el pH en cada fracción durante las etapas de cromatografía. La recuperación del polipéptido fue de un 83 % en el eluido, lo que es comparable al porcentaje de recuperación usando una solución de lavado de pH 3,5 y sulfato de amonio 2 M como se muestra en el ejemplo 1. La eliminación vírica medida por PCR fue $> 5,54 \log_{10}$, y la eliminación e inactivación combinada proporcionada por los lavados de columna fue mayor a $> 6,39 \log_{10}$. Ambos números son muy similares a los del ejemplo 1.

Estos resultados indican que las soluciones de lavado que contienen arginina 1 M a pH 4,7 o pH 3,5 con sulfato de amonio 2 M pueden proporcionar un nivel similar de inactivación vírica y recuperación de proteína.

Ejemplo 3

Inactivación vírica en columna usando una solución de lavado

que contiene óxido de laurildimetil amina (LDAO) CMC 4x

El objetivo de este experimento fue comparar los efectos de la inactivación vírica en columna usando una solución de lavado que contenía óxido de laurildimetil amina (LDAO) a una concentración micelar crítica (CMC) 4x.

En este experimento, la columna de proteína A y el polipéptido diana aún fueron iguales que en el ejemplo 1. Se equilibró una columna MABSELECT™ SuRe de 7,0 ml (20,5) y después se cargó con 256 ml de HCCF que contenía proteína de fusión a Fc. La tabla 5 a continuación resume las soluciones de tampón usadas en cada etapa. El polipéptido diana se unió a Pro A en condiciones convencionales. Después se aplicó un lavado 4 modificado posterior que contenía LDAO CMC 4x para inactivar el virus mientras el polipéptido permanecía unido al adsorbente. El caudal de la cromatografía fue constante a 300 cm/h o 1,7 ml/min, excepto en que se usó una tasa menor (100 cm/h o 0,56 ml/min) durante la etapa de lavado con detergente (lavado 4).

Tabla 5. Tampones individuales usados en el ejemplo 3.

Etapas	Componentes del tampón	pH	Vol.
EQ	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM	7,4	4 CVs
Carga	HCCF filtrado		256 ml
Lavado 1	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM	7,4	4,5 CVs
Lavado 2	FosfatoNa 10 mM, NaCl 900 mM	7,4	4 CVs
Lavado 3	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM		3 CVs
Lavado 4	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM, LDAO CMC 4x	7,4	5 CVs
Lavado 5	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM	7,4	3 CVs
Elución	Citrato 25 mM, NaCl 150 mM	3,4	3 CVs
Separación	FosfatoNa 10 mM, NaCl 900 mM	7,4	5 CVs
Regeneración	NaOH 0,1 N		3 CVs

Etapa	Componentes del tampón	pH	Vol.
HETP	FosfatoNa 10 mM, NaCl 140 mM	7,4	4 CVs
Almacenamiento	Ácido acético 500 mM, alcohol bencílico al 1 %	3,2	5 CVs

La figura 3 es un cromatograma que muestra la concentración de proteína y el pH en cada fracción durante las etapas de cromatografía. La recuperación del polipéptido fue de un 85 % en el eluido, lo que es comparable al porcentaje de recuperación usando una solución de lavado de pH 3,5 y sulfato de amonio 2 M. La eliminación vírica medida por PCR fue $5,11 \log_{10}$, y la eliminación e inactivación combinada proporcionada por los lavados de columna fue mayor a $> 6,40 \log_{10}$. Ambos números son similares a los del ejemplo 1.

Estos resultados indican que las soluciones de lavado que contienen LDAO CMC 4x o pH 3,5 con sulfato de amonio 2 M pueden proporcionar un nivel similar de inactivación vírica.

Ejemplo 4

Inactivación vírica en columna usando una solución de lavado

que contiene PEG al 20 % y NaCl 2 M a pH 3,0

Se usaron diversas soluciones de lavado de bajo pH en los ejemplos 4 a 10 para explorar adicionalmente la viabilidad y aplicabilidad de una etapa de inactivación vírica en columna. Se usó cromatografía de proteína A y un anticuerpo monoclonal en los siguientes experimentos. El anticuerpo monoclonal se unió a ProA en condiciones convencionales antes de aplicar una alta concentración salina a neutral pH a la columna. Después se aplicó un lavado posterior a alta salinidad y bajo pH (aproximadamente pH 3,0) para inactivar el virus mientras el anticuerpo permanecía unido al adsorbente. Se realizó una serie de lavados antes de que se recuperara el anticuerpo usando una solución de elución.

El objetivo de este experimento fue determinar si podía realizarse inactivación vírica en columna con pérdida mínima de recuperación usando un lavado de pH 3,0, NaCl 2 M, glicina 100 mM con PEG al 20 %.

En este experimento, en primer lugar se equilibró (EQ) una columna MABSELECT™ SuRe de 0,6 cm de diámetro con 5 volúmenes de columna (CV) de fosfato de sodio 75 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3. Después se cargaron 50 ml de HCCF filtrado (a $0,22 \mu\text{m}$) que contiene el polipéptido de interés en la columna hasta $\leq 35 \text{ g/l}_{\text{resina}}$. La columna se exploró con 3 CV de tampón de equilibrado.

La carga fue seguida de 5 CV de lavado con Bis-Tris 100 mM, NaCl 2 M, pH 7,0 (lavado 1), seguido de 5 CV de lavado de bajo pH con glicina 100 mM, PEG 3350 al 20 %, NaCl 2 M, pH 3,0 (lavado 2). La columna entonces se lavó con 5 CV de Bis-Tris 100 mM, NaCl 2 M, pH 7,0 (lavado 3), seguido de 5 CV de lavado con Bis-Tris 100 mM, pH 7,0 (lavado 4). El polipéptido diana se eluyó posteriormente con glicina 100 mM, pH 3,0 (elución).

La figura 4 es un cromatograma que muestra la concentración de proteína y el pH en cada fracción durante las etapas de cromatografía. La tabla 6 a continuación resume las condiciones usadas en cada etapa. El caudal de la cromatografía fue constante a 250 cm/h o 1,42 ml/min, excepto en que se usó una tasa menor (50 cm/h) durante la etapa de regeneración. La tabla 7 resume el porcentaje de recuperación calculado para cada etapa de cromatografía.

Tabla 6. Tampones individuales usados en el ejemplo 4.

Etapa	Componentes del tampón	pH	Vol.	Fracción
EQ	FosfatoNa 75 mM, NaCl 100 mM	7,3	5 CVs	
Carga	HCCF filtrado		50 ml	F2
Búsqueda	FosfatoNa 75 mM, NaCl 100 mM	7,3	3 CVs	F2
Lavado 1	Bis-Tris 100 mM, NaCl 2 M	7,0	5 CVs	F3
Lavado 2	Glicina 100 mM, PEG 3350 al 20 %, NaCl 2 M	3,0	5 CVs	F4
Lavado 3	Bis-Tris 100 mM, NaCl 2 M	7,0	5 CVs	F5
Lavado 4	Bis-Tris 100 mM	7,0	5 CVs	F6
Elución	Glicina 100 mM	3,0	3,5 CVs	F7
Regeneración	NaOH 0,3 N		5 CVs	F8
Purga	FosfatoNa 75 mM, NaCl 100 mM	7,3	2 CVs	Residuo

Etapa	Componentes del tampón	pH	Vol.	Fracción
Almacenamiento	AcetatoNa 500 mM, alcohol bencílico al 1 %	3,2	4 CVs	Residuo

Tabla 7. Porcentaje de recuperación en cada etapa de cromatografía usando una solución de lavado que contiene PEG al 20 % y NaCl 2 M a pH 3,0

Etapa	Volumen (ml)	Conc. (mg/ml)	Masa (mg)	% de recuperación (calculado a partir de la masa total recuperada)
Carga	50			
F3 lavado 1	33,15	0,2704	8,96	5,5
F4 lavado 2	33,15	0,9514	31,54	19,5
F5 lavado 3	33,15	0,0125	0,41	0,3
F6 lavado 4 + pre	41,44	0,0081	0,00	
F7 elución	23,205	5,1370	119,20	73,8
F8 regeneración	33,15	0,0435	1,44	0,9
Masa total recuperada (mg)			161,6	
Masa de elución de concentración recuperable/volumen de carga			3,23	
Carga de columna (mg/ml de resina)			24,5	

- 5 Como se muestra en la figura 4 y tabla 7, se observó pérdida de producto solamente mínima (19,5 % del polipéptido diana) durante el lavado de bajo pH (F4, lavado 2) con PEG al 20 % y NaCl 2 M a pH 3,0. La mayoría del producto (73,8 % del polipéptido diana) se recuperó en el tampón de elución (F7).

Ejemplo 5

Inactivación vírica en columna usando una solución de lavado

que contiene etanol al 2 % y NaCl 2 M a pH 3,0

- 15 El objetivo de este experimento fue determinar si podía realizarse inactivación vírica en columna con pérdida mínima de recuperación usando un lavado de pH 3,0, NaCl 2 M, glicina 100 mM con etanol al 2 %.

En este experimento, la columna de proteína A y el polipéptido diana fueron iguales que en el ejemplo 4. Todas las soluciones de tampón usadas en cada etapa también fueron iguales a las enumeradas en la tabla 6, excepto en que la solución de tampón de lavado de bajo pH (lavado 2) fue glicina 100 mM, etanol al 2 %, NaCl 2 M, pH 3,0. Todos los caudales fueron iguales que en el ejemplo 4.

La figura 5 es un cromatograma que muestra la concentración de proteína y el pH en cada fracción durante las etapas de cromatografía. La tabla 8 resume el porcentaje de recuperación calculado para cada etapa de cromatografía.

Tabla 8. Porcentaje de recuperación en cada etapa de cromatografía usando una solución de lavado que contiene etanol al 2 % y NaCl 2 M a pH 3,0.

Etapa	Volumen (ml)	Conc. (mg/ml)	Masa (mg)	% de recuperación (calculado a partir de la masa total recuperada)
Carga	50			
F3 lavado 1	33,15	0,4013	13,30	7,6
F4 lavado 2	33,15	0,9584	31,77	18,2
F5 lavado 3	33,15	0,1419	4,71	2,7
F6 lavado 4 + pre	41,44	0,0111	0,00	
F7 elución	23,205	5,3128	123,28	70,7
F8 regeneración	33,15	0,0420	1,39	0,8
Masa total recuperada (mg)			174,5	

Etapa	Volumen (ml)	Conc. (mg/ml)	Masa (mg)	% de recuperación (calculado a partir de la masa total recuperada)
Masa de elución de concentración recuperable/volumen de carga			3,49	
Carga de columna (mg/ml de resina)			26,4	

Como se muestra en la figura 5 y tabla 8, se observó pérdida de producto solamente mínima (18,2% del polipéptido diana) durante el lavado de bajo pH (F4, lavado 2) con PEG al 20 % y NaCl 2 M a pH 3,0. La mayoría del producto (70,7% del polipéptido diana) se recuperó en el tampón de elución (F7).

Ejemplo 6

Inactivación vírica en columna usando una solución de lavado

que contiene etanol al 2 % y sulfato de amonio 2 M a pH 3,0

El objetivo de este experimento fue determinar si podía realizarse inactivación vírica en columna con pérdida mínima de recuperación usando un lavado de pH 3,0, sulfato de amonio 2 M, glicina 100 mM con etanol al 2 %.

En este experimento, la columna de proteína A y el polipéptido diana fueron iguales que en el ejemplo 4. Todas las soluciones de tampón usadas en cada etapa también fueron iguales a las enumeradas en la tabla 6, excepto en que la solución de tampón de lavado de bajo pH (lavado 2) fue glicina 100 mM, etanol al 2 %, sulfato de amonio 2 M, pH 3,0 y sulfato de amonio 2 M reemplazando el NaCl 2 M en las soluciones de lavado 1 y lavado 3. Todos los caudales fueron iguales que en el ejemplo 4.

La figura 6 es un cromatograma que muestra la concentración de proteína y el pH en cada fracción durante las etapas de cromatografía. La tabla 9 resume el porcentaje de recuperación calculado para cada etapa de cromatografía.

Tabla 9. Porcentaje de recuperación en cada etapa de cromatografía usando una solución de lavado que contiene etanol al 2 % y sulfato de amonio 2 M a pH 3,0.

Etapa	Volumen (ml)	Conc. (mg/ml)	Masa (mg)	% de recuperación (calculado a partir de la masa total recuperada)
Carga	50			
F3 lavado 1	33,15	0,1630	5,40	3,1
F4 lavado 2	33,15	0,0100	0,33	0,2
F5 lavado 3	33,15	0,0016	0,05	0,0
F6 lavado 4 + pre	41,44	0,0339	0,00	
F7 elución	23,205	6,9053	160,24	92,3
F8 regeneración	33,15	0,2268	7,52	4,3
Masa total recuperada (mg)			173,5	
Masa de elución de concentración recuperable/volumen de carga			3,47	
Carga de columna (mg/ml de resina)			26,3	

Como se muestra en la figura 6 y tabla 9, se observó pérdida de producto solamente insignificante (0,2 % del polipéptido diana) durante el lavado de bajo pH (F4, lavado 2) con etanol al 2 % y sulfato de amonio 2 M a pH 3,0. La mayoría del producto (92,3% del polipéptido diana) se recuperó en el tampón de elución (F7).

Ejemplo 7

Inactivación vírica en columna usando una solución de lavado

que contiene acetona al 2 % y sulfato de amonio 2 M a pH 3,0

El objetivo de este experimento fue determinar si podía realizarse inactivación vírica en columna con pérdida mínima de recuperación usando un lavado de pH 3,0, sulfato de amonio 2 M, glicina 100 mM con acetona al 2 %.

En este experimento, la columna de proteína A y el polipéptido diana fueron iguales que en el ejemplo 4. Todas las soluciones de tampón usadas en cada etapa también fueron iguales a las enumeradas en la tabla 6, excepto en que la solución de tampón de lavado de bajo pH (lavado 2) fue glicina 100 mM, acetona al 2 %, sulfato de amonio 2 M, pH 3,0 y sulfato de amonio 2 M remplazando el NaCl 2 M en las soluciones de lavado 1 y lavado 3. Todos los caudales fueron iguales que en el ejemplo 4.

La figura 7 es un cromatograma que muestra la concentración de proteína y el pH en cada fracción durante las etapas de cromatografía. La tabla 10 resume el porcentaje de recuperación calculado para cada etapa de cromatografía.

Tabla 10. Porcentaje de recuperación en cada etapa de cromatografía usando una solución de lavado que contiene acetona al 2 % y sulfato de amonio 2 M a pH 3,0.

Etapa	Volumen (ml)	Conc. (mg/ml)	Masa (mg)	% de recuperación (calculado a partir de la masa total recuperada)
Carga	50			
F3 lavado 1	33,15	0,1495	4,96	2,8
F4 lavado 2	33,15	0,0100	0,33	0,2
F5 lavado 3	33,15	0,0016	0,05	0,0
F6 lavado 4 + pre	41,44	0,0339	0,00	
F7 elución	23,205	7,3562	170,70	96,3
F8 regeneración	33,15	0,0389	1,29	0,7
Masa total recuperada (mg)			177,3	
Masa de elución de concentración recuperable/volumen de carga			3,55	
Carga de columna (mg/ml de resina)			26,9	

Como se muestra en la figura 7 y tabla 10, se observó pérdida de producto solamente insignificante (0,2 % del polipéptido diana) durante el lavado de bajo pH (F4, lavado 2) con acetona al 2 % y sulfato de amonio 2 M a pH 3,0. La mayoría del producto (más de un 96,3 % del polipéptido diana) se recuperó en el tampón de elución (F7).

Ejemplo 8

Inactivación vírica en columna usando una solución de lavado que contiene sulfato de amonio 2 M a pH 3,0

El objetivo de este experimento fue determinar si podía realizarse inactivación vírica en columna con pérdida mínima de recuperación usando un lavado de pH 3,0, sulfato de amonio 2 M, glicina 100 mM sin ningún otro modificador

En este experimento, la columna de proteína A y el polipéptido diana aún fueron iguales que en el ejemplo 4. En primer lugar se equilibró una columna MABSELECT™ SuRe de 6,6 ml (19,4 cm) y después se cargó en 25,8 g/l de resina usando 50 ml de anticuerpo en HCCF. Se usó un caudal de 250 cm/h excepto durante la etapa de regeneración (50 cm/h). Todas las soluciones de tampón usadas en cada etapa también fueron iguales a las enumeradas en la tabla 6, excepto en que la solución de tampón de lavado de bajo pH (lavado 2) fue glicina 100 mM, sulfato de amonio 2 M, pH 3,0 y sulfato de amonio 2 M remplazando el NaCl 2 M en las soluciones de lavado 1 y lavado 3. Todos los caudales fueron iguales que en el ejemplo 4. El lavado de pH 3,0, sulfato de amonio 2 M, glicina 100 mM se usó para mantener el anticuerpo unido a la resina a bajo pH. El lavado de bajo pH, alto contenido de sulfato de amonio se intercaló con un tampón de lavado neutro, de alto contenido de sulfato de amonio (pH 7,0, sulfato de amonio 2 M) para garantizar que estaban presentes altos niveles de sulfato de amonio según se descendía el pH hasta 3,0 y también cuando se elevaba posteriormente hasta 7,0. Sin esto, se producía elución significativa del producto antes y después de la etapa de lavado. Se usó exceso de tampón de lavado en cada etapa para garantizar el intercambio de tampón adecuado. La figura 8 es un cromatograma que muestra la concentración de proteína y el pH en cada fracción durante las etapas de cromatografía. La tabla 11 resume el porcentaje de recuperación calculado para cada etapa de cromatografía.

Tabla 11. Porcentaje de recuperación en cada etapa de cromatografía usando una solución de lavado que contiene sulfato de amonio 2 M a pH 3,0.

Etapa	Volumen (ml)	Conc. (mg/ml)	Masa (mg)	% de recuperación (calculado a partir de la masa total recuperada)
Carga	50			
F3 lavado 1	33,15	0,1542	5,11	3,0
F4 lavado 2	33,15	0,0954	3,16	1,9
F5 lavado 3	33,15	0,0000	0,00	0,0
F6 lavado 4 + pre	41,44	0,0334	0,00	
F7 elución	23,205	6,9315	160,85	94,4
F8 regeneración	33,15	0,0362	1,20	0,7
Masa total recuperada (mg)			170,3	
Masa de elución de concentración recuperable/volumen de carga			3,41	
Carga de columna (mg/ml de resina)			25,8	

Como se muestra en la figura 8 y tabla 11, se observó pérdida de producto solamente muy mínima (1,9 % del polipéptido diana) durante el lavado de bajo pH (F4, lavado 2) con sulfato de amonio 2 M a pH 3,0. La mayoría del producto (94,4% del polipéptido diana) se recuperó en el tampón de elución (F7). El porcentaje del pico que era anticuerpo monomérico, un 96,0 %, no se alteró por el lavado de alto contenido de sulfato de amonio.

El tampón de lavado de alta salinidad, bajo pH no aumentó la eliminación de la proteína de la célula hospedadora (HCP) en la etapa de proteína A. Los niveles de HCP en el eluido fueron típicamente iguales o mayores a los conseguidos usando un lavado simple de pH neutro, de cloruro de sodio. Es probable que los altos niveles de sulfato de amonio en el lavado de bajo pH potenciara las interacciones entre HCP y los anticuerpos o HCP y la resina de proteína A. También es posible que el sulfato de amonio disminuyera la solubilidad de la HCP, reduciendo la eliminación.

Se realizó un experimento adicional en condiciones similares a las previas, pero con el cloruro de sodio sustituyendo el sulfato de amonio. La pérdida de rendimiento fue mayor usando una etapa de lavado con NaCl 2 M, pH 3,0 (17,0 %) en comparación con la etapa de lavado de sulfato de amonio 2 M pH 3,0 (1,9 %). Como el sulfato de amonio es un cosmotrópico más fuerte que el cloruro de sodio, se requiere menor concentración para evitar la elución del anticuerpo. Se cree que usar una concentración mayor de cloruro de sodio (3 M) evitaría la elución del anticuerpo y permitiría la inactivación vírica en columna.

Ejemplo 9

Inactivación vírica en columna usando una solución de lavado

que contiene TRITON™ X-100 al 2 % y NaCl 2 M a pH 3,0

El objetivo de este experimento fue determinar si podía realizarse inactivación vírica en columna con pérdida mínima de recuperación usando un lavado de pH 3,0, NaCl 2 M, glicina 100 mM con TRITON™ X-100 al 2 %.

En este experimento, la columna de proteína A y el polipéptido diana aún fueron iguales que en el ejemplo 4. Todas las soluciones de tampón usadas en cada etapa también fueron iguales a las enumeradas en la tabla 6, excepto en que la solución de tampón de lavado de bajo pH (lavado 2) fue glicina 100 mM, TRITON™ X-100 al 2 %, NaCl 2 M, pH 3,0. Todos los caudales fueron iguales que en el ejemplo 4.

La figura 9 es un cromatograma que muestra la concentración de proteína y el pH en cada fracción durante las etapas de cromatografía. La tabla 12 resume el porcentaje de recuperación calculado para cada etapa de cromatografía.

Tabla 12. Porcentaje de recuperación en cada etapa de cromatografía usando una solución de lavado que contiene TRITON™ X-100 al 2 % y NaCl 2 M a pH 3,0.

Etapas	Volumen (ml)	Conc. (mg/ml)	Masa (mg)	% de recuperación (calculado a partir de la masa total recuperada)
Carga	50			
F3 lavado 1	33,15	0,4350	14,42	10,3
F4 lavado 2	33,15	0,0954	3,16	2,3
F5 lavado 3	33,15	0,0000	0,00	0,0
F6 lavado 4 + pre	41,44	0,0440	0,00	
F7 elución	23,205	5,2009	120,69	86,2
F8 regeneración	33,15	0,0515	1,71	1,2
Masa total recuperada (mg)			140,0	
Masa de elución de concentración recuperable/volumen de carga			2,80	
Carga de columna (mg/ml de resina)			21,2	

Como se muestra en la figura 9 y tabla 12, se observó pérdida de producto solamente muy mínima (2,3 % del polipéptido diana) durante el lavado de bajo pH (F4, lavado 2) con TRITON™ X-100 al 2 % y NaCl 2 M a pH 3,0. La mayoría del producto (86,2% del polipéptido diana) se recuperó en el tampón de elución (F7).

Ejemplo 10

Inactivación vírica en columna usando una solución de lavado

que contiene NaCl 2 M a pH 3,0

El objetivo de este experimento fue determinar si podía realizarse inactivación vírica en columna con pérdida mínima de recuperación usando un lavado de pH 3,0, NaCl 2 M, glicina 100 mM sin ningún otro modificador

En este experimento, la columna de proteína A y el polipéptido diana aún fueron iguales que en el ejemplo 4. Todas las soluciones de tampón usadas en cada etapa también fueron iguales a las enumeradas en la tabla 6, excepto en que la solución de tampón de lavado de bajo pH (lavado 2) fue glicina 100 mM, NaCl 2 M, pH 3,0. Todos los caudales fueron iguales que en el ejemplo 4.

La figura 10 es un cromatograma que muestra la concentración de proteína y el pH en cada fracción durante las etapas de cromatografía. La tabla 13 resume el porcentaje de recuperación calculado para cada etapa de cromatografía.

Tabla 13. Porcentaje de recuperación en cada etapa de cromatografía usando una solución de lavado que contiene NaCl 2 M a pH 3,0.

Etapas	Volumen (ml)	Conc. (mg/ml)	Masa (mg)	% de recuperación (calculado a partir de la masa total recuperada)
Carga	50			
F3 lavado 1	33,15	0,4540	15,05	8,2
F4 lavado 2	33,15	0,9881	32,75	17,9
F5 lavado 3	33,15	0,1212	4,02	2,2
F6 lavado 4 + pre	41,44	0,0099	0,00	
F7 elución	23,205	5,6518	131,15	71,6
F8 regeneración	33,15	0,0086	0,29	0,2
Masa total recuperada (mg)			183,3	
Masa de elución de concentración recuperable/volumen de carga			3,67	
Carga de columna (mg/ml de resina)			27,8	

Como se muestra en la figura 10 y tabla 13, se observó pérdida de producto solamente mínima (17,9 % del polipéptido diana) durante el lavado de bajo pH (F4, lavado 2) con NaCl 2 M a pH 3,0. La mayoría del producto (71,6% del polipéptido diana) se recuperó en el tampón de elución (F7).

- 5 Tomados conjuntamente, los resultados de los ejemplos 1 a 10 demuestran que la inactivación vírica en columna usando una solución de lavado de bajo pH y alta salinidad podía realizarse de forma eficaz con pérdida mínima de recuperación.

10 Ejemplo 11

Inactivación vírica en columna en

una columna de cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto

15 usando una solución de lavado de bajo pH que contiene sulfato de amonio 2 M

El objetivo del siguiente experimento es demostrar la posible viabilidad y aplicabilidad de una etapa de inactivación vírica en columna usando una solución de lavado de bajo pH y alta salinidad con otros tipos de cromatografía tal como una cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto.

20 En este experimento, se cargaron 6 ml de combinación de producto filtrado a 0,22 micrómetros que contenía un anticuerpo monoclonal de una etapa de purificación de intercambio aniónico a 10 mg/ml de mAb cargado en una columna de 1,7 ml que contenía resina CAPTO™ Adhere a pH 8,0. Se aplicó un tampón de lavado de alta salinidad a pH 8,0 a la columna (lavado 1). Después se aplicó un lavado modificado posterior (lavado 2-4) para mantener la condición de alta salinidad, pero bajar el pH hasta donde sea adecuado para inactivación vírica, mientras el anticuerpo permanecía unido al absorbente.

La tabla 14 a continuación muestra las condiciones usadas en cada etapa. El caudal de la cromatografía fue constante a 100 cm/h.

Tabla 14. Tampones individuales usados en el ejemplo 11.

Etapa	Componentes del tampón	pH	Vol.
EQ	Tris 50 mM	8,0	15 CVs
Carga	HCCF filtrado y concentrado		6 ml
Lavado 1	Tris 50 mM, sulfato de amonio 2 M	8,0	15 CVs
Lavado 2	Acetato 50 mM, sulfato de amonio 2 M	5,0	15 CVs
Lavado 3	Citrato 50 mM, sulfato de amonio 2 M	4,0	15 CVs
Lavado 4	Citrato 100 mM, sulfato de amonio 2 M	3,5	15 CVs
Elución	Citrato 100 mM	3,4	15 CVs
Regeneración	NaOH 1 N		15 CVs
Almacenamiento	100 ml/l de alcohol bencílico, 30,3 g/l de ácido acético, 0,64 g/l de NaOH, 965 ml de RO/DI		10 CVs

La figura 11 es un cromatograma que muestra la concentración de proteína y el pH en cada fracción durante las etapas de cromatografía.

Las soluciones de lavado usadas en este experimento provocaron eliminación mínima del polipéptido diana (20,6 %) a estos bajos pH (3,5 y 4,0). La recuperación global fue de un 77,4 % en este experimento.

Se realizó un experimento similar en una columna de cromatografía de intercambio aniónico convencional (no de modo mixto) usando las mismas soluciones de lavado de bajo pH y alta salinidad. En contraste, la recuperación global del polipéptido fue solamente de un 49,8 % en este experimento, lo que indica que se eluyó una cantidad significativa del polipéptido durante el lavado de bajo pH. Este experimento indica que la inactivación vírica de bajo pH no puede realizarse mientras el producto está unido a una resina de intercambio aniónico convencional usando alta salinidad en el tampón.

Tomados conjuntamente, estos resultados indican que la inactivación vírica en columna usando una solución de lavado de bajo pH y alta salinidad podría realizarse de forma eficaz con pérdida mínima de recuperación en determinados métodos de cromatografía, tal como cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto.

Ejemplo 12**Inactivación de virus**

El bajo pH puede dañar los anticuerpos. Se inactivó una proteína de fusión a Fc mediante los tiempos y valores de pH requeridos para inactivación vírica. Se desarrolló un método novedoso de inactivación vírica a bajo pH en columna. Se produjo el mAb de IgG1 humanizada en células de ovario de hámster chino (CHO) recombinantes cultivadas en medio sin suero. Como se describe en este ejemplo, los anticuerpos se retuvieron en proteína A y CAPTO ADHERE® a pH 3,0 usando sulfato de amonio 2 M para aumentar las interacciones hidrófobas. Se demostró la inactivación de xMuLV en columna en proteína A con sulfato de amonio 2 M pH 3-3,5, arginina 1 M y el detergente LDAO. La inactivación en columna ayuda a minimizar la exposición a bajo pH, elimina la conductividad añadida durante la acidificación de la combinación y automatiza las etapas de inactivación de bajo pH. La inactivación en columna proporciona beneficio para cromatografía semicontinua en múltiples columnas, que genera muchas combinaciones de inactivación de bajo pH. Como se describe en este ejemplo, los anticuerpos se retuvieron en CAPTO MMC® a pH 8,0 usando sulfato de amonio 2 M para aumentar las interacciones hidrófobas.

La proteína de fusión a Fc se produjo en células HEK293 cultivadas en medio sin suero. Se midió el virus de leucemia murina xenotrópico (X-MLV) con ensayos basados en PCR e infectividad. La tabla 15 muestra la inactivación vírica y eliminación de xMuLV proporcionadas por tampones de lavado de proteína A con una proteína de fusión a Fc.

Tabla 15. Inactivación vírica y eliminación de xMuLV proporcionadas por tampones de lavado de proteína A con una proteína de fusión a Fc.

Tampón de lavado de proteína A	Eliminación del virus por PCR	Eliminación e inactivación combinadas por infectividad
Bajo pH (pH 3,5, sulfato de amonio 2 M)	4,96	>6,39
Arginina (arginina 1 M pH 4,8)	>5,54	>6,39
Detergente (LDAO CMC 4x)	5,11	>6,39

El ligando de proteína A se une a los dominios CH2 y CH3 de un Fc de anticuerpo a través de interacciones hidrófobas, iónicas y de enlace de hidrógeno. En una parte de este ejemplo, se cargó una columna MABSELECT™ SuRe de 6,6 ml (19,4 cm) con 50 ml de HCCF con 2,2 mg/ml de anticuerpo. La columna se lavó con tampón BisTris 100 mM con sulfato de amonio 2000 mM a pH 6,6. Después se aplicó un tampón de lavado de bajo pH con sulfato de amonio (citrato de sodio 100 mM, sulfato de amonio 2000 mM a pH 3,0). La concentración de sulfato de amonio entonces se redujo hasta cero sobre un gradiente de 9 CV. El caudal para todas las etapas fue 250 cm/h.

Como se muestra en la figura 12, el anticuerpo empezó a desorber a aproximadamente 1700 mM y se eluyó completamente a aproximadamente 200 mM de sulfato de amonio. La figura 12 muestra que se requiere al menos 1700 mM de sulfato de amonio para mantener el anticuerpo unido a proteína A a pH 3,0. Como se requería al menos 1700 mM de sulfato de amonio para mantener el anticuerpo unido a la resina a bajo pH, la solubilidad del anticuerpo se midió como una función del pH, de la concentración del anticuerpo y el sulfato de amonio. Se descubrió que el anticuerpo era soluble en sulfato de amonio 1000 mM, pero no en sulfato de amonio 1500 mM. La precipitación se observó con sulfato de amonio 1500 mM a valores de pH entre 3,5 y 8,0 y con concentraciones de anticuerpo entre 10 y 30 mg/ml.

En una parte de este ejemplo, en primer lugar se equilibró una columna MabSelect SuRe de 6,6 ml (19,4 cm) y después se cargó en 25,8 g/l de resina usando 50 ml de anticuerpo en HCCF. Se usó un caudal de 250 cm/h excepto durante la etapa de regeneración (50 cm/h).

Un lavado de pH 3,0, sulfato de amonio 2 M, glicina 100 mM se usó para mantener el anticuerpo unido a la resina a bajo pH. El lavado de bajo pH, alto contenido de sulfato de amonio se intercaló con un tampón de lavado neutro, de alto contenido de sulfato de amonio (pH 7,0, sulfato de amonio 2 M) para garantizar que estaban presentes altos niveles de sulfato de amonio según se descendía el pH hasta 3,0 y también cuando se elevaba posteriormente hasta 7,0. Sin esto, se producía elución significativa del producto antes y después de la etapa de lavado. Se usó exceso de tampón de lavado en cada etapa para garantizar el intercambio de tampón adecuado. La secuencia de etapas y los tampones usados son idénticos a los usados en el ejemplo 8. La concentración de proteína, la conductividad y pH en cada etapa se muestran en la figura 8. La figura 13 indica que lavado con sulfato de amonio 2 M mantiene el anticuerpo unido a proteína A a pH 3,0.

En una parte de este ejemplo, en primer lugar se equilibró una columna CAPTO ADHERE® de 1,7 ml (5,0 cm) y después se cargó con 6 ml de 11,4 g/l de anticuerpo en tampón Tris 50 mM pH 8,0. Posteriormente, se aplicó un tampón de lavado de alta salinidad de pH 8,0 y después un tampón de lavado de alta salinidad de pH 3,5 a la resina.

Se usó exceso de tampón de lavado en cada etapa para garantizar el intercambio de tampón adecuado. Todas las etapas se realizaron a 100 cm/h. Véase la tabla 16.

Tabla 16. Secuencia de etapas y tampones usados para producir la figura 14 del ejemplo 12.

Etapa	Tampón	pH	Volumen (CV o ml)
Equilibrado	Tris 50 mM	8,0	15
Carga	Tris 50 mM	8,0	6 mL
Lavado 1	Tris 50 mM, sulfato de amonio 2 M	8,0	15
Lavado 2	Citrato 100 mM, sulfato de amonio 2 M	3,5	15
Lavado 3	Tris 50 mM, sulfato de amonio 2 M	8,0	15
Lavado 4	Tris 50 mM	8,0	15
Elución	Citrato 100 mM	3,4	15
Regeneración	NaOH 1,0 N		15

La figura 14 muestra que lavado con sulfato de amonio 2 M mantiene el anticuerpo unido a CAPTO ADHERE® a pH 3,5. Como se muestra en la figura 14, se observó pérdida mínima de producto durante el lavado con sulfato de amonio 2 M, pH 3,5, lo que es sorprendente porque a este pH tanto el producto como la resina tienen una carga positiva. Es probable que el producto permanezca unido a la resina debido a las interacciones hidrófobas potenciadas en este tampón de alta salinidad. La mayoría del producto (79,0 %) se recuperó en la combinación de elución. El porcentaje del pico que era anticuerpo monomérico (98,4 %) no se alteró por el lavado de alto contenido de sulfato de amonio.

En una parte de este ejemplo, se cargó una columna de 1,7 ml (5,1 cm) con resina de modo mixto CAPTO MMC® con 6 ml de 12,4 mg/ml de anticuerpo en un tampón citrato 50 mM, pH 4,5. Posteriormente se aplicó un lavado de alta salinidad de pH 4,5 y después un lavado de alta salinidad de pH 8,0. Se usó exceso de tampón de lavado en cada etapa para garantizar el intercambio de tampón adecuado. La concentración de proteína, la conductividad y pH en cada etapa se muestran en la figura 15. Los tampones usados en cada etapa se muestran en la tabla 17. Todas las etapas se realizaron a 100 cm/h.

Tabla 17. Secuencia de etapas y tampones usados para producir la figura 15 del ejemplo 12.

Etapa	Tampón	pH	Volumen (CV o ml)
Equilibrado	Citrato 50 mM	4,5	15
Carga	Citrato 50 mM	4,5	6 mL
Lavado 1	Citrato 50 mM, sulfato de amonio 2 M	4,5	15
Lavado 2	Tris 50 mM, sulfato de amonio 2 M	8,0	15
Elución	Tris 50 mM	8,0	15
Regeneración	NaOH 0,1 N		15

La figura 15 muestra que lavado con sulfato de amonio 2 M mantiene el anticuerpo unido a CAPTO MMC® a pH 8,0. Como se muestra en la figura 15, se observó pérdida mínima de producto durante el lavado con sulfato de amonio 2 M, pH 8,0, lo que es sorprendente porque a este pH tanto el producto como la resina tienen una carga positiva y se esperaría que se produjera elución del anticuerpo. El porcentaje de recuperación en la combinación de eluido fue de un 94,1 %. Es probable que el producto permanezca unido a la resina debido a las interacciones hidrófobas potenciadas en este tampón de alta salinidad.

Se realizó un experimento similar usando resina TMAE HiCap. La resina TMAE HiCap es una resina de intercambio aniónico que carece de las propiedades de interacción hidrófoba de la resina CAPTO ADHERE™. Se produjo pérdida significativa de producto durante los lavados de bajo pH y la recuperación global fue de un 49,8 %. El producto que eluyó durante el lavado de bajo pH precipitó en la columna y en los instrumentos. El experimento de resina TMAE HiCap indica que las sales cosmotropas no podían conservar la adsorción del mAb en la resina de intercambio aniónico a bajo pH.

El método de inactivación vírica de bajo pH en columna muestra que los anticuerpos se retenían en proteína A y CAPTO ADHERE® a pH 3,0 usando sulfato de amonio 2 M para aumentar las interacciones hidrófobas. Se demostró la inactivación de xMuLV en columna en proteína A con sulfato de amonio 2 M pH 3-3,5, arginina 1 M y el detergente LDAO.

Estos datos muestran que la inactivación en columna ayuda a minimizar la exposición al bajo pH, elimina la conductividad añadida durante la acidificación de la combinación, automatiza la etapa de inactivación de bajo pH y ayuda a posibilidad la cromatografía semicontinua en múltiples columnas.

- 5 La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/882.488, presentada el 25 de septiembre de 2014 y la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 62/028.657, presentada el 24 de julio de 2014.

TABLA DE SECUENCIAS

10

Tabla 15. Secuencias polinucleotídicas de FVIII

A. FVIII-Fc con el dominio B eliminado	
(i) Secuencia de ADN de la cadena de FVIII-Fc con el dominio B eliminado (péptido señal de FVIII subrayado, región de Fc en negrita) (SEQ ID NO:1, que codifica la SEQ ID NO:2)	
1	<u>atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg</u>
51	<u>cttttagtgcc</u> accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg
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 ctgtcagtct
351	tcattgctgtt ggtgtatcct actggaaaagc ttctgagggg gctgaatatg
401	atgatcagac cagtcaaagg gagaaagaag atgataaagt cttccctggt
451	ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg aaagagaatg gtccaatggc
501	ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat gtggacctgg
551	taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa
601	gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact
651	ttttgctgta ttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact
701	ccttgatgca ggatagggat gctgcactctg ctcgggcctg gcctaaaatg
751	cacacagtca atggttatgt aaacaggtct ctgccaggtc tgattggatg
801	ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgtgat tggaatgggc accactcctg
851	aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacat
901	cgccaggcgt ccttggaat ctgcgaata actttcctta ctgctcaaac
951	actcttgatg gaccttgga agtttctact gttttgtcat atctcttccc
1001	accaacatga tggcatggaa gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag

A. FVIII-Fc con el dominio B eliminado

```

1051 gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa gaagcggaag actatgatga
1101 tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat gatgacaact
1151 ctcccttcctt tatccaaatt cgcctcagttg ccaagaagca tcttaaaact
1201 tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt
1251 agtccctgcc ccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg
1301 gccctcagcg gattggtagg aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac
1351 acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct attcagcatg aatcaggaat
1401 cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg ttgattatat
1451 ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca oggaatcact
1501 gatgtccgtc ctttgtatcc aaggagatta ccaaaagggt taaaacattt
1551 gaaggatttt ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag
1601 tgactgtaga agatgggcca actaaatcag atcctcgggtg octgaccgcg
1651 tattactcta gtttcgttaa tatggagaga gatctagctt caggactcat
1701 tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa agaggaaacc
1751 agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag
1801 aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttcc tccccaatcc
1851 agctggagtg cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc
1901 acagcatcaa tggctatggt ttgtagagtt tgcagttgtc agtttggttg
1951 catgaggtgg catactggta cattctaagc attggagcac agactgactt
2001 cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa atgggtctatg
2051 aagacacact caacctatto ccattctcag gagaaaactgt cttcatgtcg
2101 atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg
2151 gaacagaggg atgaccgct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca
2201 ctggtgatta ttacgaggac agttatgaag atatttcagc ataactgctg
2251 agtaaaaaca atgccattga accaagaagc ttctctcaaa aaccaccagt
2301 cttgaaacgc catcaacggg aaataactcg tactactctt cagtcagatc
2351 aagaggaaat tgactatgat gataccatat cagtgaaat gaagaaggaa

```

A. FVIII-Fc con el dominio B eliminado

2401 gatttttgaca tttatgatga g gatgaaaat cagagocccc gcagctttca
 2451 aaagaaaaca cgacactatt ttattgctgc agtggagagg ctctgggatt
 2501 atgggatgag tagctcccca catgtttctaa gaaacagggc tcagagtggc
 2551 agtgtccctc agttcaagaa agttgttttc caggaattta ctgatggctc
 2601 ctttactcag cccttatacc gtggagaact aaatgaacat ttgggactcc
 2651 tggggccata tataagagca gaagttgaag ataatatcat ggtaaactttc
 2701 agaaatcagg cctctcgtcc ctattccttc tattctagcc ttattttctta
 2751 tgaggaagat cagaggcaag gagcagaacc tagaaaaaac ttigtcaagc
 2801 ctaatgaaac caaaacttac ttttggaag tgcaacatca tatggcaccc
 2851 actaaagatg agtttgactg caaagcctgg gottattttct ctgatgttga
 2901 cctggaaaaa gatgtgcact caggcctgat tggacccctt ctggtctgcc
 2951 acactaacac actgaaccct gctcatggga gacaagtga agtacaggaa
 3001 tttgctctgt ttttcaccat ctttgatgag accaaaagct ggtaacttca
 3051 tgaaaatatg gaaagaaact gcagggctcc ctgcaatata cagatggaag
 3101 atcccacttt taaagagaat tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata
 3151 atggatacac tacctggctt agtaatggct caggatcaaa ggattcgatg
 3201 gtatctgctc agcatgggca gcaatgaaaa catccattct attcatttca
 3251 gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaaag aggagtataa aatggcactg
 3301 tacaatctct atccaggtgt ttttgagaca gtggaaatgt taccatocaa
 3351 agctggaatt tggcgggtgg aatgccttat tggcgagcat ctacatgctg
 3401 ggatgagcac actttttctg gtgtacagca ataagtgtca gaactccctg
 3451 ggaatggctt ctggacacat tagagatttt cagattacag cttcaggaca
 3501 atatggacag tgggccccaa agctggccag acttcattat tccggatcaa
 3551 tcaatgcctg gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg
 3601 ttggcaccac tgattattca cggcatcaag acccaggggtg cccgtcagaa
 3651 gttctccagc ctctacatct ctcagtttat catcatgtat agtcttgatg
 3701 ggaagaagtg gcagacttat cgaggaaatt ccactggaac cttaatggctc

A. FVIII-Fc con el dominio B eliminado

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 caaaagagt ggctgcaagt ggacttcag aagacaatga aagtcacagg
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 acccccagag ttgggtgcac cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc
4351 tgcgaggcac aggaccteta **cgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc**
4401 **agctccagaa ctctggggcg gaccgtcagt ctctctcttc ccccaaaac**
4451 **ccaaggacac cctcatgatc tccoggaccc ctgaggtcac atgogtggtg**
4501 **gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga**
4551 **cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gaggagtaca**
4601 **acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctca ccgtcctgca ccaggactgg**
4651 **ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc**
4701 **ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac**
4751 **aggtgtacac cctgccccca tccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc**
4801 **agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat ccagcgcaca tcgccgtgga**
4851 **gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccc**
4901 **tgttggactc cgacggctcc ttcttctctt acagcaagct caccgtggac**
4951 **aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga**
5001 **ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta**
5051 **aa**

(ii) Secuencia de ADN de Fc (péptido señal de Igk de ratón subrayado) (SEQ ID NO:3, que codifica la SEQ ID NO:4)

A. FVIII-Fc con el dominio B eliminado

1 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg
51 ttccactggg gacaaaactc acacatgccc accgtgcca gcacctgaac
101 tcttgggagg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc
151 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgctggtgg tggacgtgag
201 ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg
251 tgcataatgc caagacaaag ccgogggagg agcagtacaa cagcacgtac
301 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa
351 ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga
401 aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc
451 ctgcccccat ccgcgatga gctgaccaag aaccaggta gcctgacctg
501 cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag tgggagagca
551 atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gttggactcc
601 gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg
651 gcagcagggg aacgtcttct catgctcgt gatgcatgag gctctgcaca
701 accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a

B. FVIII-Fc de longitud completa

(i) Secuencia de ADN de FVIII-Fc de longitud completa (péptido señal de FVIII subrayado, región de Fc en **negrita**) (SEQ ID NO:5, que codifica la SEQ ID NO:6)

1 atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg
51 ctttagtggc accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg
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 ctgtcagtct

B. FVIII-Fc de longitud completa

351 tcatgctggt ggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg
 401 atgatcagac cagtcaaagg gagaaagaag atgataaagt cttccctggt
 451 ggaagccata catatgtctg gcaggctctg aaagagaatg gtccaatggc
 501 ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat gtggacctgg
 551 taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa
 601 gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact
 651 ttttgctgta tttgatgaag ggaaaagttg gcaactcagaa acaaagaact
 701 ccttgatgca ggatagggat gctgcatctg ctggggcctg gcctaaaatg
 751 cacacagtca atggttatgt aaacaggctc ctgccaggtc tgattggatg
 801 ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc accactcctg
 851 aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca cattttcttg gaggaacct
 901 cgccaggcgt ccttggaat ctgccata actttcctta ctgctcaaac
 951 actcttgatg gacctggac agtttctact gttttgtcat atctctccc
 1001 accaakatga tggcatggaa gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag
 1051 gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa gaagcggaag actatgatga
 1101 tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat gatgacaact
 1151 ctccctcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tccataaact
 1201 tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt
 1251 agtcctcgcc ccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg
 1301 gccctcagcg gattggtagg aagtacaaaa aagtcgatt tatggcatac
 1351 acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct attcagcatg aatcaggaat
 1401 ottgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg ttgattatat
 1451 ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcaat
 1501 gatgtccgtc ctttgatttc aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt
 1551 gaaggatttt ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag
 1601 tgactgtaga agatgggcca actaaatcag atcctcggtg cctgacccgc
 1651 tattactcta gtttcgttaa tatggagaga gatctagctt caggactcat

B. FVIII-Fc de longitud completa

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 tggctatggt tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg
 1951 catgaggtgg catactggta cattctaagc attggagcac agactgactt
 2001 cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa atggtctatg
 2051 aagacacact caccctatcc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg
 2101 atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg
 2151 gaacagaggg atgaccgct tactgaagggt ttctagttgt gacaagaaca
 2201 ctggtgatta ttacgaggac agttatgaag atatttcagc atacttgctg
 2251 agtaaaaaca atgccattga accaagaagc ttctcccaga attcaagaca
 2301 ccctagcact aggcaaaagc aatttaatgc caccacaatt ccagaaaatg
 2351 acatagagaa gactgacct tggtttgac acagaacacc tatgectaaa
 2401 atacaaaatg tctcctctag tgatttggtg atgctcttgc gacagagtcc
 2451 tactccacat gggctatcct tatctgatct ccaagaagcc aaatatgaga
 2501 ctttttctga tgatccatca cctggagcaa tagacagtaa taacagcctg
 2551 tctgaaatga cacacttcag gccacagctc catcacagtg gggacatggg
 2601 atttaccctt gagtcaggcc tccaattaag attaaatgag aaactgggga
 2651 caactgcagc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttctagtaca
 2701 tcaaataatc tgatttcaac aattccatca gacaatttgg cagcaggtag
 2751 tgataataca agttccttag gacccccaag tatgccagtt cattatgata
 2801 gtcaattaga taccactcta tttggcaaaa agtcatctcc ccttactgag
 2851 tctggtggac ctctgagctt gagtgaagaa aataatgatt caaagttggt
 2901 agaatcaggt ttaatgaata gccaaagaaag ttcattgggga aaaaatgtat
 2951 cgtcaacaga gagtggtagg ttatttaaag ggaaaagagc tcatggacct
 3001 gctttgttga ctaaagataa tgccttattc aaagtttagca tctctttggt

B. FVIII-Fc de longitud completa

3051 aaagacaaac aaaacttcca ataattcagc aactaataga aagaactcaca
3101 ttgatggccc atcattatta attgagaata gtccatcagt ctggcaaaat
3151 atattagaaa gtgacaotga gtttaaaaaa gtgacacctt tgattcatga
3201 cagaatgctt atggacaaaa atgctacagc tttgaggota aatcatatgt
3251 caaataaaaac tactttcatca aaaaacatgg aaatggcca acagaaaaaa
3301 gagggcccca ttccaccaga tgcacaaaat ccagatatgt cgttctttaa
3351 gatgctatct ttgccagaat cagcaagggtg gatacaaagg actcatggaa
3401 agaactctct gaactctggg caaggcccca gtccaaagca attagtatcc
3451 ttaggaccag aaaaatctgt ggaaggtcag aatttcttgt ctgagaaaaa
3501 caaagtggta gtaggaaagg gtgaatttac aaaggacgta ggactcaaag
3551 agatggtttt tccaagcagc agaaacctat ttcttactaa cttggataat
3601 ttacatgaaa ataatacaca caatcaagaa aaaaaaattc aggaagaaat
3651 agaaaagaag gaaacattaa tccaagagaa tgtagttttg cctcagatac
3701 atacagtgac tggcaactaag aatttcatga agaacctttt cttactgagc
3751 actaggcaaa atgtagaagg ttcatatgac ggggcatatg ctccagtact
3801 tcaagatttt aggtcattaa atgattcaac aaatagaaca aagaaacaca
3851 cagctcattt ctcaaaaaaa ggggaggaag aaaacttga aggcttggga
3901 aatcaaacca agcaaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatata
3951 tctaataca agccagcaga attttgtcac gcaacgtagt aagagagctt
4001 tgaaacaatt cagactccca ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata
4051 attgtggatg acacctcaac ccagtgggac aaaaacatga aacatttgac
4101 cccgagcacc ctcaacacaga tagactaaa tgagaaggag aaaggggcca
4151 ttactcagtc tcccttatca gattgcctta cgaggagtca tagcatccct
4201 caagcaaata gatctccatt acccattgca aaggtatcat catttccatc
4251 tattagacct atatatotga ccagggtcct attccaagac aactottctc
4301 atottccagc agcatcttat agaaagaaag attotggggt ccaagaaagc
4351 agtcatttct tacaaggagc caaaaaaat aacctttctt tagccattct

B. FVIII-Fc de longitud completa

4401 aacottggag atgactggtg atcaaagaga ggttggtcc ctggggacaa
4451 gtgccacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctcccg
4501 aaaccagact tgcccaaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaaagt
4551 tcacatttat cagaaggacc tattccctac ggaaactagc aatgggtctc
4601 ctggccatct ggatctcgtg gaagggagcc ttcttcaggg aacagaggga
4651 gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct ggaaaagttc cttttctgag
4701 agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta ttggtcctc
4751 ttgcttgga taaccactat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa
4801 tccaagaga agtcaccaga aaaaacagct tttaagaaaa aggataccat
4851 tttgtccctg aacgcttggtg aaagcaatca tgcaatagca gcaataaatg
4901 agggacaaaa taagcccgaa atagaagtca cctgggcaaa gcaaggtagg
4951 actgaaaggc tgtgctctca aaaccoacca gtcttgaaac gccatcaacg
5001 ggaaataact cgtactactc ttcagtcaga tcaagaggaa attgactatg
5051 atgataccat atcagttgaa atgaagaagg aagattttga catttatgat
5101 gaggatgaaa atcagagccc ccgcagcttt caaaagaaaa caccacacta
5151 ttttattgot gcagtgagga ggctctggga ttatgggatg agtagctccc
5201 cacatgttct aagaaacagg gctcagagtg gcagtgtccc tcagttcaag
5251 aaagttggtt tccaggaatt tactgatggc tcttttactc agcccttata
5301 ccgtggagaa ctaaatgaac atttgggact cctggggcca tatataagag
5351 cagaagttga agataatct atggtaactt tcagaaatca ggcctctcgt
5401 ccctattcct tctattctag cttattttct tatgaggaag atcagaggca
5451 aggagcagaa ctagaaaaa actttgtcaa gctaatgaa accaaaaactt
5501 acttttgga agtgcaacat catatggcac ccaactaaaga tgagtttgac
5551 tgcaaagcct gggcttattt ctctgatgtt gacctggaaa aagatgtgca
5601 ctcaggcctg attggacccc ttctggtctg coacactaac aactgaacc
5651 ctgctcatgg gagacaagtg acagtacagg aatttgctct gtttttcacc
5701 atctttgatg agacaaaaag ctggtacttc actgaaaata tggaaagaaa

B. FVIII-Fc de longitud completa

5751 ctgcagggct cctgcaata tccagatgga agatcccact tttaaagaga
5801 attatcgctt ccatgcaatc aatggctaca taatggatac actacctggc
5851 ttagtaatgg ctgaggatca aaggattcga tggatatctgc tcagcatggg
5901 cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat gtgttcactg
5951 tacgaaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccaggt
6001 gtttttgaga cagtggaaat gttaccatcc aaagctggaa tttggcgggt
6051 ggaatgcctt attggcgagc atctacatgc tgggatgagc acactttttc
6101 tgggtgtacag caataagtgt cagactcccc tgggaatggc ttctggacac
6151 attagagatt ttcagattac agcttcagga caatatggac agtgggcccc
6201 aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc tggagcacca
6251 aggagccctt ttcttggatc aaggtggatc tgttggcacc aatgattatt
6301 cacggcatca agaccaggg tgcccgtcag aagttctcca gectctacat
6351 ctctcagttt atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt
6401 atcgaggaaa ttccactgga accttaatgg tcttctttgg caatgtggat
6451 tcatctggga taaaacacaa tatttttaac cctccaatta ttgctcgata
6501 catccgtttg caccacaactc attatagcat tcgcagcaact cttcgcatgg
6551 agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaaatggag
6601 agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcacact actttaccaa
6651 tatgtttgcc acctggtctc cttcaaaagc tcgacttcac ctccaaggga
6701 ggagtaatgc ctggagacct caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa
6751 gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca ggagtaacta ctcagggagt
6801 aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagtlcctc atctccagca
6851 gtcaagatgg ccatcagtgg actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag
6901 gtttttcagg gaaatcaaga ctcttcaca cctgtggtga actctctaga
6951 cccaccgtta ctgactcgtc accttcgaat tcacccccag agttgggtgc
7001 accagattgc cctgaggatg gaggttctgg gctgcgaggc acaggacctc
7051 **tacgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagctccag aactcctggg**

B. FVIII-Fc de longitud completa

7101 **cggacogtca gtcttctctt** tccccccaaa acccaaggac accctcatga
7151 **tctcccgga cctgaggtc** acatgogtg tggtggacgt gagccacgaa
7201 **gaccctgagg tcaagttcaa** ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa
7251 **tgccaagaca aagccgcggg** aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg
7301 **tcagogtctt caccgtctg** caccaggact ggctgaatgg caaggagtac
7351 **aagtgaagg tctccaacaa** agccctccca gccccatcg agaaaacat
7401 **ctccaaagcc aaagggcagc** cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc
7451 **catcccgga tgagctgacc** aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc
7501 **aaaggcttct atcccagcga** catgcogtg gagtgggaga gcaatgggca
7551 **gccggagaac aactacaaga** ccacgcctcc cgtgttgga tccgacggct
7601 **ccttcttctt ctacagcaag** ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag
7651 **gggaacgtct tctcatgtc** cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta
7701 **cacgcagaag agcctctccc** tgtctccggg taaa

C. Híbrido de heterodímero de FVIII-Fc

(i) Secuencia de ADN de la cadena pesada de FVIII (HC)-Fc (sin conector entre HC y Fc) (péptido señal subrayado, región de Fc en **negrita**) (SEQ ID NO:7, que codifica la SEQ ID NO:8)

1 atgcaaatag agctctccac **ctgtctcttt** ctgtgccttt tgcgattctg
51 ctttagtgcc accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg
101 actatatgca aagtgatctc ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttctt
151 cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac acctcagtcg tgtacaaaaa
201 gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc gctaagccaa
251 ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat
301 gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagctt
351 tcatgtgttt ggtgtatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg
401 atgatcagac cagtcaaagg gagaaagaag atgataaagt cttccctggt

C. Híbrido de heterodímero de FVIII-Fc

451 ggaagccata catatgtctg gcaggtoctg aaagagaatg gtocaatggc
 501 ctctgaccca ctgtgacctt cctactcata tctttctcat gtggacctgg
 551 taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa
 601 gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact
 651 ttttctgtga tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact
 701 ccttgatgca ggatagggat gctgcactctg ctggggcctg gcctaaaatg
 751 cacacagtca atggttatgt aaacaggtct ctgccaggtc tgattggatg
 801 ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgtgat tggaatgggc accactcctg
 851 aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct
 901 cgccaggcgt ccttggaat ctgcccaata actttcctta ctgctcaaac
 951 actcttgatg gaccttgagc agttttctact gttttgtoat atctcttccc
 1001 accaaccatga tggcatggaa gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag
 1051 gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa gaagcggag actatgatga
 1101 tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt cagggttgat gatgacaact
 1151 ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tctctaaact
 1201 tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt
 1251 agtcctcgcc ccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg
 1301 gcctcagcg gattggtagg aagtacaaaa aagtcgatt tatggcatac
 1351 acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct attcagcatg aatcaggaat
 1401 cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg ttgattatat
 1451 ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctacctca cggaatcact
 1501 gatgtccgtc ctttgtatto aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt
 1551 gaaggattttt ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag
 1601 tgactgtaga agatgggcca actaaatcag atcctcgggtg cctgaccgcg
 1651 tattaactcta gtttcgttaa tatggagaga gatctagctt caggactcat
 1701 tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa agaggaaacc
 1751 agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag

C. Híbrido de heterodímero de FVIII-Fc

```

1801 aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc
1851 agctggagtg cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc
1901 acagcatcaa tggctatggt ttgatagtt tgagttgtc agtttgtttg
1951 catgaggtgg catactggta cattctaagc attggagcac agactgactt
2001 cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa atgggtctatg
2051 aagacacact caccctatto ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg
2101 atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg
2151 gaacagaggc atgaccgctt tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca
2201 ctggtgatta ttacgaggac agttatgaag atatttcagc atacttgctg
2251 agtaaaaaca atgccattga accaagagac aaaactcaca catgcccacc
2301 gtgcccagct ccagaactcc tgggcggacc gtcagtcttc ctcttcccc
2351 caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc
2401 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta
2451 cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc
2501 agtacaacag cacgtaacct gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag
2551 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct
2601 cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag
2651 aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac
2701 caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc
2751 cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc
2801 ctcccgtgtt ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc
2851 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gtcctgtgat
2901 gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc
2951 cgggtaaa

```

(ii) Secuencia de ADN de la cadena pesada de FVIII (HC)-Fc (conector de 5 aminoácidos entre HC y Fc) (péptido señal subrayado, región de Fc en negrita, el conector de 5 aminoácidos está subrayado dos veces) (SEQ ID NO:9, que codifica la SEQ ID NO:10)

C. Híbrido de heterodímero de FVIII-Fc

1 atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg
 51 cttttagtgcc accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg
 101 actatatgca aagtgatctc ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct
 151 cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac acctcagtgc tgtacaaaaa
 201 gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc gctaagccaa
 251 ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat
 301 gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct
 351 tcatgctggt 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 ctcatggag cctactagt atgtagagaa
 601 gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact
 651 ttttctgtga ttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact
 701 ccttgatgca ggatagggat gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg
 751 cacacagtca atggttatgt aaacaggctc ctgccaggtc tgattggatg
 801 ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc accactcctg
 851 aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat
 901 cgccaggcgt ccttggaat ctgcgaata actttcctta ctgctcaaac
 951 actcttgatg gaccttgac agtttctact gttttgtcat atctcttccc
 1001 accaacaatga tggcatggaa gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag
 1051 gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa gaagcggag actatgatga
 1101 tgatcttact gattctgaaa tggatgtggc caggtttgat gatgacaact
 1151 ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact

C. Híbrido de heterodímero de FVIII-Fc

1201 tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt
 1251 agtcctcgcc cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg
 1301 gccctcagcg gattggtagg aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac
 1351 acagatgaaa cttttaagac tcgtgaagct attcagcatg aatcaggaat
 1401 cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg ttgattatat
 1451 ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact
 1501 gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt
 1551 gaaggattttt ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag
 1601 tgactgtaga agatgggcca actaaatcag atcctcgggtg cctgacccgc
 1651 tattactcta gtttcgtaa 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 tggctatggt tttgataggt tgcagttgtc agtttgtttg
 1951 catgaggtgg catactggta cattctaagc attggagcac agactgactt
 2001 cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa atggtctatg
 2051 aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg
 2101 atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg
 2151 gaacagaggc atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca
 2201 ctggtgatta ttacgaggac agttatgaag atatttcagc atacttgctg
 2251 agtaaaaaca atgccattga accaagaagc ttctcccaga atgacaaaac
 2301 **tcacacatgc ccaccgtgcc cagctccaga actcctgggc ggaccgtcag**
 2351 **tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc**
 2401 **cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt**
 2451 **caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa**
 2501 **agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc**

C. Híbrido de heterodímero de FVIII-Fc

2551 **accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaagg**
 2601 **ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca**
 2651 **aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atccgggat**
 2701 **gagctgacca agaaccagg** **cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta**
 2751 **tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag cgggagaaca**
 2801 **actacaagac cagcctccc gtgttggtact ccgacggctc cttcttctc**
 2851 **tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt**
 2901 **ctcatgctcc gtgatgcatt aggctctgca caaccactac acgcagaaga**
 2951 **gcctctccct gtctccgggt aaa**

(iii) Secuencia de ADN de la cadena ligera de FVIII (LC)-Fc (péptido señal subrayado, región de Fc en negrita) (SEQ ID NO:11, que codifica la SEQ ID NO:12)

1 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg
 51 ttccactggg gaaataactc gtactactct tcagtcagat caagaggaaa
 101 ttgactatga tgataccata tcagttgaaa tgaagaagga agattttgac
 151 atttatgatg aggatgaaaa tcagagcccc cgcagctttc aaaagaaaac
 201 acgacactat tttattgctg cagtggagag gctctgggat tatgggatga
 251 gtagctcccc acatgttcta agaaacaggg ctcagagtgg cagtgtccct
 301 cagttcaaga aagttgtttt ccaggaattt actgatggct cctttactca
 351 gcccttatac cgtggagaac taaatgaaca tttgggactc ctggggccat
 401 atataagagc agaagttgaa gataatatca tggtaacttt cagaaatcag
 451 gcctctcgtc cctattcctt ctattctagc cttatttctt atgaggaaga
 501 tcagaggcaa ggagcagaac ctgaaaaaaa ctttgtcaag cctaataaaa
 551 ccaaaactta cttttggaaa gtgcaacatc atatggcacc cactaaagat
 601 gagtttgact gcaaagcctg ggcttatttc tctgatgttg acctggaaaa
 651 agatgtgcac tcaggcctga ttggaccctt tctggtctgc cacactaaca
 701 cactgaaccc tgctcatggg agacaagtga cagtacagga atttgctctg

C. Híbrido de heterodímero de FVIII-Fc

751 tttttcacca tttttgatga gacccaaaagc tggtaacttca ctgaaaatat
 801 ggaaagaaac tgcagggctc cctgcaatat ccagatggaa gatcccactt
 851 ttaaagagaa ttatcgcttc catgcaatca atggctacat aatggataca
 901 ctacctggct tagtaatggc tcaggatcaa aggattcgat ggtatctgct
 951 cagcatgggc agcaatgaaa acatccattc ttttcatttc agtggacatg
 1001 tgttcaactgt acgaaaaaaaa gaggagtata aaatggcact gtacaatctc
 1051 tatccagggtg tttttgagac agtggaaatg ttaccatcca aagctggaat
 1101 ttgggggggtg gaatgcotta ttggcgagca totacatgct gggatgagca
 1151 cactttttct ggtgtacagc aataagtgtc agactccctt gggaatggct
 1201 tctggacaca ttagagattt tcagattaca gcttcaggac aatatggaca
 1251 gtggggcccca aagctggcca gacttcatta ttccggatca atcaatgcct
 1301 ggagcaccaa ggagcccttt tcttggatca aggtggatct gttggcacca
 1351 atgattattc acggcatcaa gaccagggc gcccgtcaga agttctccag
 1401 cctctacatc tctcagttta tcctcatgta tagtcttgat gggaagaagt
 1451 ggcagactta tcgaggaaat tccactggaa ccttaatggc cttctttggc
 1501 aatgtggatt catctgggat aaaacacaat atttttaacc ctccaattat
 1551 tgctcgatac atccgtttgc acccaactca ttatagcatt cgcagcactc
 1601 ttccgatgga gttgatgggc tgtgatttaa atagttgcag catgccattg
 1651 ggaatggaga gtaaagcaat atcagatgca cagattactg cttcatccta
 1701 ctttaccaat atgtttgcca cctggtctcc ttcaaaagct cgacttcacc
 1751 tccaagggag gagtaatgcc tggagacctc aggtgaataa tccaaaagag
 1801 tggtgcaag tggacttcca gaagacaatg aaagtcacag gagtaactac
 1851 tcaggagta aaatctctgc ttaccagcat gtatgtgaag gagttcctca
 1901 tctccagcag tcaagatggc catcagtgga ctctcttttt tcagaatggc
 1951 aaagtaaagg tttttcaggg aaatcaagac tccttcacac ctgtggtgaa
 2001 ctctctagac ccacogttac tgactcgcta ccttcgaatt cccccaga
 2051 gttgggtgca ccagattgcc ctgaggatgg aggttctggg ctgcgaggca

C. Híbrido de heterodímero de FVIII-Fc	
2101	caggacctct acgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagctccaga
2151	actcctgggc ggaccgtcag tcttctcttt ccccccaaaa cccaaggaca
2201	ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg
2251	agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga
2301	ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt
2351	accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc
2401	aaggagtaca agtgaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga
2451	gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca
2501	ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc
2551	tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag
2601	caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgttgact
2651	ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg
2701	tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca
2751	caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa

Tabla 16: Secuencias polipeptídicas de FVIII

A. Híbrido de monómero de FVIII-Fc con el dominio B eliminado (monómero-dímero de BDD FVIII-Fc): creado coexpresando cadenas de BDD FVIII-Fc y Fc.	
Construcción = fusión de HC-LC-Fc Un casete de expresión de Fc se cotransfecta con BDDFVIII-Fc para generar el monómero de BDD FVIII-Fc. Para la cadena de BDD FVIII-Fc, la secuencia de Fc se muestra en negrita , la secuencia de HC se muestra con un subrayado doble y el resto de la secuencia del dominio B se muestra en <i>cursiva</i> . Los péptidos señal están subrayados.	
i) cadena de FVIII-Fc con el dominio B eliminado (secuencia señal de 19 aminoácidos subrayada) (SEQ ID NO:2)	
1	<u><i>MQIELSTCFE</i></u> <u><i>LCLLRFCFSA</i></u> <u><i>TRRYYLGA</i></u> <u><i>VE</i></u> <u><i>LSWDYMQSDL</i></u> <u><i>GELPVDARFP</i></u>
51	<u><i>PRVPKSF</i></u> <u><i>PFN</i></u> <u><i>TSVVYK</i></u> <u><i>TLF</i></u> <u><i>VEFTDHLFNI</i></u> <u><i>AKPRPPWMGL</i></u> <u><i>LGPTIQAEVY</i></u>
101	<u><i>DTVVITLKNM</i></u> <u><i>ASHPVSLHAV</i></u> <u><i>GVS</i></u> <u><i>YWKASEG</i></u> <u><i>AEYDDQTSQR</i></u> <u><i>EKEDDKVFPG</i></u>
151	<u><i>GSHTYVWQVL</i></u> <u><i>KENGPMASDP</i></u> <u><i>LCLTYSYLSH</i></u> <u><i>VDLVKDLNSG</i></u> <u><i>LIGALLVCRE</i></u>
201	<u><i>GSLAKEKTQT</i></u> <u><i>LHKFILLFAV</i></u> <u><i>FDEGKSWHSE</i></u> <u><i>TKNSLMQDRD</i></u> <u><i>AASARAWPKM</i></u>

251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPEVHSIFL EGHTFLVRNH
 301 ROASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLECH 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 NRSWYL TENI QRELNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEYEDTLTLF PFSGETVFMS
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 751 SKNNAIEPRS FSQNPVVLKR HQREITRRTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
 801 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRNAQSG
 851 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 901 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP
 951 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNLNP AHGRQVTVQE
 1001 FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1051 MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAI
 1101 YNLYPGVFET VEMLPKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTP
 1151 GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1201 LAPMIIHGKI TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1251 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
 1301 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1351 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
 1401 QNGKVKVFQ NQDSFTPVVN SLDPPLTRY LRIHPQSWH QIALRMEVLG
 1451 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1501 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 1551 LNGKEYKCKV SNKALPAIE KTISKAKGP REPQVYTLPP SRDELTKNQV

1601 **SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD**
 1651 **KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK**

ii) cadena de Fc (péptido señal heterólogo de 20 aminoácidos de la cadena de Igk de ratón subrayado) (SEQ ID NO:4)

```

1  METDTLLLVV LYLWVPGSTG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT
51  LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKENWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
151 LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

```

B. Híbrido de monómero de FVIII_{FC} de longitud completa (monómero-dímero de FVIII_{FC} de longitud completa): creado coexpresando cadenas de FVIII_{FC} y Fc.

Construcción = fusión de HC-B-LC-Fc. Un casete de expresión de Fc se cotransfecta con FVIII_{FC} de longitud completa para generar el monómero de FVIII_{FC} de longitud completa. Para la cadena de FVIII_{FC}, la secuencia de Fc se muestra en **negrita**, la secuencia de HC se muestra con un subrayado doble y la secuencia del dominio B se muestra en cursiva. Los péptidos señal están subrayados.

i) Cadena de FVIII_{FC} de longitud completa (péptido señal de FVIII subrayado) (SEQ ID NO:6)

```

1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRYYLGAVE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51  PRVPKSFEPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLECH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILGP ILYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDO RGNQIMSDKR NVILFSVFDE

```

601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF PFSGETVFM
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 751 SKNNALIEPRS FSQNSRHPST RQKQFNATTI PENDIEKTD PFAHRTMPK
 801 IQNVSSDLL MLLRQSPTPH GLSLSDLQEA KYETFSDDPS PGAIDSNNSL
 851 SEMTHFRPQL HHSGDMVFTP ESGQLRLNE KLGTTAATEL KKLDKVSST
 901 SNNLISTIPS DNLAAGTDNT SSLGPPSMPV HYDSQLDTTL FGKSSPLTE
 951 SGGPLSLSEE NNDKLLSESG LMNSQESSWG KNVSTESGR LFKGKRAHGP
 1001 ALLTKDNALF KVSISLLKTN KTSNNSATNR KTHIDGPSLL IENSPSVWQ
 1051 ILESDETFKK VTPLIHDRML MDKNATALRL NHMSNKTSS KNMEMVQKK
 1101 EGPIPPDAQN PDMSFFKMLF LPESARWIQR THGKNSLNSG QGPSKQLVS
 1151 LGPEKSVEGQ NFLSEKNKV VVGKGETKDV GLKEMVFPSS RNLFLTNLDN
 1201 LHENNTHNQE KKIQEIEKK ETLIQENVVL PQIHTVTGK NFMKNLFLS
 1251 TRQNVESYD GAYAPVLQDF RSLNDSTNRT KKHTAHFSKK GEEENLEGLG
 1301 NQTKQIVEKY ACTTRISPNT SQQNEVTQRS KRALKQFRLP LEETELKRI
 1351 IVDDTSTQWS KMKHLTPST LTQIDYNEKE KGAITQSPLS DCLTRSHSIP
 1401 QANRSPPIA KVSSFPSIRP IYLTRVLFQD NSSHLPAASY RKKDSGVQES
 1451 SHFLQGAKN NLSLAILTLE MTGDQREVG LGTSATNSVT YKKVENTVLP
 1501 KPDLPKTSKG VELLPKVHIY QKDLFPTETS NGSPGHLDLV EGSLQGTG
 1551 AIKWNEANRP GKVPLRVAT ESSAKTPSKL LDPLAWDNHY GTQIPKEEWK
 1601 SQEKSPEKTA FKKKDTILSL NACESNHAIA AINEGQNKPE IEVTWAKQGR
 1651 TERLCSQNP VLKRHQREIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
 1701 EDENQSPRSE QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVQFK
 1751 KVVFEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
 1801 PYSFYSSLIS YEEDQRQGA PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
 1851 CKAWAYFSUV DLEKDVHSG IGPLLCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
 1901 IFDETKSWYF TENMERNCR PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
 1951 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
 2001 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
 2051 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII

2101 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
 2151 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
 2201 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
 2251 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
 2301 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
 2351 **YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLEPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE**
 2401 **DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY**
 2451 **KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV**
 2501 **KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ**
 2551 **GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK**

C. Híbrido de heterodímero de FVIII-Fc

Este se prepara cotransfectando construcciones de HC-Fc y LC-Fc. Se han preparado dos construcciones de HC-Fc. Una no tiene conector entre HC y Fc (HC-Fc) mientras que la otra tiene un conector de 5 aminoácidos entre HC y Fc (HC+5-Fc). El péptido señal de FVIII se utilizó para las construcciones de HC-Fc, mientras que la secuencia señal de Igk se utilizó para la construcción de LC-Fc.

(i) HC-Fc (la secuencia de Fc se muestra en negrita y el péptido señal subrayado) (SEQ ID NO:8)

1 MQIELSTCFE **LCLLRFCFSA** TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
 51 PRVPKSEFPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 151 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 401 WWHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
 501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PFLPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 551 YYSSEFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FESGYTFKHK MVEDTLTLF PFSGETVFMS

701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 751 SKNNAIEPRD **KTHTCPPCPA** **PELIGGPSVF** **LFPPKPKDTL** **MISRTPEVTC**
 801 **VVVDVSHEDP** **EVKFNWYVDG** **VEVHNAKTKP** **REEQYNSTYR** **VVSVLTVLHQ**
 851 **DWLNGKEYKC** **KVSNKALPAP** **IEKTISKAKG** **QPREPQVYTL** **PPSRDELTKN**
 901 **QVSLTCLVKG** **FYPSDIAVEW** **ESNGQPENNY** **KTPPVLDSD** **GSFFLYSKLT**
 951 **VDKSRWQQGN** **VFSCSVMHEA** **LHNHYTQKSL** **SLSPGK**

(ii) HC+5-Fc (la secuencia de Fc se muestra en negrita, la secuencia del conector de 5 aminoácidos (del dominio B de FVIII) se muestra en cursiva y el péptido señal subrayado) (SEQ ID NO:10)

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDI GELPVDARFP
 51 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 151 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRN LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPEVHSIFL EGHTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 401 WWHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 451 TDETFTKREA IQHESGILGP LLYGEVGDIT LIIFKNQASR PNYIYPHGIT
 501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYLTEI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEYEDTLTLE PFSGETVFMS
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 751 SKNNAIEPRS *FSQMDKTHTC* **PPCPAPPELLG** **GPSVFLFPPK** **PKDTLMISRT**
 801 **PEVTCVVVDV** **SHEDPEVKFN** **WYVDGVEVHN** **AKTKPREEQY** **NSTYRVVSVL**
 851 **TVLHQDWLNG** **KEYKCKVSNK** **ALPAPIEKTI** **SKAKGQPREP** **QVYTLPPSRD**
 901 **ELTKNQVSLT** **CLVKGFYPSD** **IAVEWESNGQ** **PENNYKTPP** **VLDSDGSFFL**
 951 **YSKLTVDKSR** **WQQGNVFSCS** **VMHEALHNHY** **TQKSLSLSPG** **K**

(iii) LC-Fc6His (la secuencia de Fc se muestra en negrita y el péptido señal subrayado) (SEQ ID NO: 12)

```

1  METDTLLLLWV LLLWVPGSTG EITRTTLQSD Q&EIDYDDTI SVEMKKEDFD
51  IYDEDENQSP RSFQKKTRHY FIAAVERLWD YGMSSSPHVL RNRAQSGSVP
101 QFKKVVQEF TDGSFTQPLY RGELNEHLGL LGPYIRAEVE DNIMVTFRNQ
151 ASRPYSFYSS LISYEEDQRQ GAEPRKNFVK PNETKTYFWK VQHMAPTKD
201 EFDCKAWAYF SDVDLEKDVH SGLIGPLLVC HTNTLNPAHG RQVTVQEFAL
251 FFTIFDETKS WYFTENMERN CRAPCNIQME DPTFKENYRF HAINGYIMDT
301 LPGLVMAQDQ RIRWYLLSMG SNENIHSIHF SGHVFTVRKK EEEKMALYNL
351 YPGVFETVEM LPSKAGIWRV ECLIGEHLHA GMSTLFLVYS NKCQTPLGMA
401 SGHIRDFQIT ASGQYQWAP KLARLHYSGS INAWSTKEPF SWIKVDLLAP
451 MIIHGIKTQG ARQKFSSLYI SQFIIMYSLD GKKWQTYRGN STGTLMVFFG
501 NVDSSGIKHN IFNPPIIARY IRLHPTHYSI RSTLRMELMG CDLNSCSMPL
551 GMESKAISDA QITASSYFTN MFATWSPSKA RLHLQGRSNA WRPQVNNPKE
601 WLQVDFQKIM KVTGVTTQGV KSLLTSMYVK EFLISSQDG HQWTLFFQNG
651 KVKVFQGNQD SFTPVVNSLD PPLLTRYLRI HPQSWVHQIA LRMEVLGCEA
701 QDLYDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV
751 SHEDPEVKEN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG
801 KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT
851 CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR
901 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

```

Tabla 17: Secuencias polinucleotídicas de FIX

Secuencia de ADN de la cadena de FIX-Fc (péptido señal de FIX subrayado, secuencia de FIX con subrayado doble, región de Fc en negrita) (SEQ ID NO:13, que codifica la SEQ ID NO:14)
Secuencia nucleotídica de pSYN-FIX-030 (nt 1 a 7583):
Exón 1 de FIX (péptido señal, propéptido del 1. ^{er} aminoácido); nt 690-777
Mini intrón de FIX: nt 778-1076
Secuencia de FIX: nt 1077-2371
Fc: nt 2372-3052

1 gcgcgcgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg
 51 gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac
 101 ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt
 151 caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga
 201 cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gccacttgg cagtacatca
 251 agtgtatcat atgccaagta cgcacctat tgacgtcaat gacggtaaat
 301 gggccgctg gcattatgcc cagtacatga ctttatggga ctttctact
 351 tggcagtaca tctacgtatt agtcacgct attaccatgg tgatgcggtt
 401 ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc
 451 caagtctcca cccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcacaaaat
 501 caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat
 551 gggcggtagg cgtgtacggt gggaggctta tataagcaga gctctctggc
 601 taactagaga acccactgct tactggctta tcgaaattaa tacgactcac
 651 tatagggaga cccaagcttc gcgacgtacg gcgcaccca tgacgcgct
 701 gaacatgac atggcagaat caccaggcct catcaccac tgccttttag
 751 gatatctact cagtgtgaa ttacaggtt tgtttcttt tttaaaatac
 801 attgagtatg cttgcctttt agatatagaa atatctgatg ctgtcttctt
 851 cactaaattt tgattacatg atttgacagc aatattgaag agtctaacag
 901 ccagcacgca ggttggttaag tactgtggga acatcacaga ttttggtccc
 951 atgcctctaa gagaaattgg ctttcagatt atttggtatta aaaacaaaga
 1001 cttttottaag agatgtaaaa ttttcattgat gttttctttt ttgctaaaac
 1051 taaagaatta ttcttttaca tttcagtttt tcttgatcat gaaaacgcca
 1101 acaaaattct caatcgcca aagaggtata attcagata attgaaaga
 1151 tttgttcaag ggaatctaga gagaatct atgaaagaa agtctagttt
 1201 tgaaagca cgagaattt ttgaaaacac tgaagaaaca actgaattt
 1251 ggaagcagta tcttgatga catcagttg agtccaatcc atgtttaaat
 1301 ggcgcagtt gcaaggatga cattaattcc tatgaattt ggtgtccctt
 1351 tggatttgaa ggaagaaact gtgaattaga tgaacatgt aacattaaga
 1401 atggcagatg ggaagattt ttaaaaaata gtgctgataa caaggtctt

1451 tcttcctgta ctgaggata tgcacttca gaaaaccaga agtcctctga
 1501 accagcactg ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta
 1551 agctcaccog tgcagagact gtttttcctg atgtggaata tataaattct
 1601 actgaagctg aaaccatttt ggataacatc actcaaaaca ccaatcatt
 1651 taatgacttc actcggttg ttgttgaga aatgccaaa ccaagtcatt
 1701 tcccttgaca gttgttttg aatgtaaa ttgatccatt ctgtgagc
 1751 tctatcgtta atgaaaaatg cattgtaact gctgccact gtgtgaaac
 1801 tgtgtttaa attacagtg tgcaggtga acataatatt gagagacag
 1851 aacatacaga gcaaaagcga aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac
 1901 tacaatgag ctattaataa gtacaaccat gacattgcc ttctggaact
 1951 ggacgaacc ttactgtaa acagctacgt tacacctatt tgcattgctg
 2001 acaaggaata caggaacatc ttctcaaat ttgatctgg ctatgtaagt
 2051 gctggggaa gactcttcca caaaggaga tcagctttag ttcttcagta
 2101 ccttagagtt ccacttggtg accgagccac atgtcttga tctacaaagt
 2151 tcaccatcta taacaacatg ttctgtgtg gcttccatga aggaggtaga
 2201 gattcatgtc aaggagatag tggggaccc catgttactg aagtgaagg
 2251 gaccatttc ttaactgaa ttattagctg ggtgaagag tgtcaatga
 2301 aagcgaata tgaatatat accaaggtct cccgttatct caactgatt
 2351 aagcaaaaaa caaagctcac tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc
 2401 agctcoggaa ctctgggcg gaccgtcagt ctctctctc ccccaaaac
 2451 ccaaggacac cctcatgac tcccggaacc ctgaggtcac atgcgtggtg
 2501 gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttoaact ggtacgtgga
 2551 cgcggtggag gtgcataatg ccaagacaaa gcgcggggag gagcagtaca
 2601 acagcacgta cgtgtggtc agcgtctca ccgtctgca ccaggactgg
 2651 ctgaatggca aggagtaca gtgcaaggtc tccaacaaag cctcccagc
 2701 ccccatcgag aaaaccatct ccaaagcaa agggcagccc cgagaaccac
 2751 aggtgtacac cctgccccca tccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc
 2801 agcctgacct gcctggtcaa aggttttat cccagcgaca tgcctgtga
 2851 gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg

2901 **tg**ttggactc **cg**acggctcc **tt**cttctctt **ac**agcaagct **ca**ccgtggac
 2951 **aa**gagcaggt **gg**cagcaggg **ga**acgtcttc **tc**atgctccg **tg**atgcatga
 3001 **gg**ctctgcac **aa**ccactaca **cg**cagaagag **cc**tctccctg **tt**ccgggta
 3051 **aa**tgagaatt cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac
 3101 aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta
 3151 ttgcttttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt tgggggtggc
 3201 **ga**agaactcc agcatgagat **cc**ccgcgctg **ga**ggatcatc **ca**gccggcgt
 3251 **cc**cggaaac gattccgaag **cc**caaccttt catagaaggc **gg**cggtgga
 3301 **tc**gaaatctc **gt**agcacgtg **tc**agtcctgc **tc**ctcggcca **cg**aagtgcac
 3351 **gc**agttgccg **gc**cggtcgc **gc**agggcgaa **ct**cccgcccc **ca**cggctgct
 3401 **cg**ccgatctc **gg**tcatggcc **gg**cccgagg **cg**tcocggaa **gt**tcgtggac
 3451 **ac**gacctccg **ac**cactcggc **gt**acagctcg **tc**caggccgc **gc**accacac
 3501 **cc**aggccagg **gt**gttgctcg **gc**accacctg **gt**cctggacc **gc**gctgatga
 3551 **ac**agggtcac **gt**gttcccg **ac**cacaccgg **cg**aagtcgtc **ct**ccacgaag
 3601 **tc**ccgggaga **ac**ccgagccg **gt**cggtcacg **aa**ctcgaccg **ct**ccggcgac
 3651 **gt**cgcgcgcg **gt**gagcaccg **ga**acggcact **gg**tcaacttg **gc**catggttt
 3701 **ag**ttcctcac **ct**tgtcgtat **ta**tactatgc **cg**atatacta **tg**ccgatgat
 3751 **ta**attgtcaa **ca**cgtgctga **tc**agatccga **aa**atggatat **ac**aagctccc
 3801 **gg**gagctttt **tg**caaaagcc **ta**ggcctcca **aa**aaagcctc **ct**cactactt
 3851 **ct**ggaatagc **tc**agaggcag **ag**gcggcctc **gg**cctctgca **taa**ataaaaa
 3901 **aa**attagtca **gc**catggggc **gg**agaatggg **cg**gaactggg **cg**gagttagg
 3951 **gg**cgggatgg **gc**ggagttag **gg**cggggact **at**ggttgctg **ac**taattgag
 4001 **at**gcatgctt **tg**catacttc **tg**cctgctgg **gg**agcctggg **ga**ctttccac
 4051 **ac**ctggttgc **tg**actaattg **ag**atgcatgc **tt**tgcatact **tt**gcctgct
 4101 **gg**ggagcctg **gg**gaactttc **ac**accctcgt **cg**agctaget **tc**gtgaggct
 4151 **cc**ggtgcccg **tc**agtgggca **ga**gcgcacat **cg**cccacagt **cc**ccgagaag
 4201 **tt**ggggggag **gg**gtcggcaa **tt**gaaccggg **gc**ctagagaa **gg**tggcgcg
 4251 **gg**taaactgg **gaa**agtgatg **tc**gtgtactg **gc**tccgcctt **tt**tcccgagg
 4301 **gt**gggggaga **ac**cgtatata **ag**tgcagtag **tc**gcctgaa **cg**ttctttt
 4351 **cg**caacgggt **tt**gccgccag **aa**cacaggta **ag**tgccgtgt **gt**ggttccc

4401 cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc ttgcgtgcct tgaattactt
 4451 ccacctggct ccagtacgtg attcttgatc ccgagctgga gccaggggag
 4501 ggccttgccg tttaggagcc ccttcgctc gtgcttgagt tgaggcctgg
 4551 cctggggcgt ggggcccgcg cgtgcgaatc tggtaggcacc ttgcgcctg
 4601 tctcgtgct ttogataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacctg
 4651 ctgcgacgt ttttttctgg caagatagtc ttgtaatgc gggccaggat
 4701 ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc gcgggaggcg acggggcccg
 4751 tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac
 4801 cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgctt
 4851 ggctcgcgc cgcctgtat cggcccgccc tgggcggcaa ggctggcccg
 4901 gtcggcacca gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctc
 4951 cagggggctc aaaatggagg acgcggcgtc cgggagagcg ggcgggtgag
 5001 tcaccacac aaaggaaagg ggcctttccg tctcagccg tcgcttcatg
 5051 tgactccacg gagtaccggg cgcctccag gcacctgat tagttctgga
 5101 gcttttgag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg
 5151 gagtttccc aactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttgga
 5201 ctgatgtaa ttctccttg aatttgccct ttttgagttt ggatcttgg
 5251 tcattctcaa gcctcagaca gtggttcaaa gttttttct tccatttcag
 5301 gtgtcgtgaa cacgtggtcg cggccgcgc gccaccatgg agacagacac
 5351 actcctgcta tgggtaactg tgcctggtt tccaggttc actggtgaca
 5401 aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggaggaccg
 5451 tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctccc
 5501 gaccctgag gtcacatcg tggtagtgga cgtgagccac gaagacctg
 5551 aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag
 5601 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtagcgt
 5651 cctcaccgtc ctgcaccagg actggtgaa tggcaaggag tacaagtga
 5701 aggtctcaa caaagccctc ccagcccca togagaaaac catctccaa
 5751 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc cccatccc
 5801 cgatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct

5851 tctatoccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag
 5901 aacaactaca agaccacgcc tcccggtgtg gactccgacg gtccttctt
 5951 cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg
 6001 tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag
 6051 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataga ctcgagagat ctggccggct
 6101 gggcccgttt cgaaggtaag cctatcccta accctctcct cggctctgat
 6151 tctaagcgta ccggtcatca tcaccatcac cattgagttt aaaccocgtg
 6201 atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt gtttgccct
 6251 ccccggtgcc ttcttgacc ctggaagggt ccactccac tgcctttcc
 6301 taataaaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtaggt gtcattctat
 6351 tctggggggt ggggtgggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca
 6401 atagcaggca tgctgggat gcggtgggt ctatggcttc tgaggcggaa
 6451 agaaccagtg gcgtaatac ggttatccac agaatacagg gataacgcag
 6501 gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag
 6551 gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cggcccccctg acgagcatca
 6601 caaaaatoga cgctcaagtc agagggtggg aaaccocgaca ggactataaa
 6651 gataaccaggc gtttcccctc agaagctccc tcgtgcgtc tctgttccg
 6701 accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt
 6751 ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg
 6801 ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc
 6851 tgcgcccttat ccgtaacta togtcttgag tccaaccocg taagacacga
 6901 cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt
 6951 atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac
 7001 actagaagaa cagtatttgg tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt
 7051 cggaaaaaga gttggtagct cttgatccg caaacaacc accgctggta
 7101 gcggtggttt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaggga
 7151 tctcaagaag atcctttgat cttttctaog ggtctgacg ctcagtggaa
 7201 cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gacattaacc tataaaaata
 7251 ggcgtatcac gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa
 7301 aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc

```

7351 ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg
7401 ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga
7451 gtgcaccata tatgcgggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa
7501 taccgcatca ggccgcatto gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg
7551 gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg cca

```

Tabla 18: Secuencias polipeptídicas de FIX

Híbrido de monómero de FIX-Fc: creado coexpresando cadenas de FIX-Fc y Fc.				
A. Cadena de FIX-Fc (secuencia señal de 46 aminoácidos subrayada) (SEQ ID NO: 14)				
La lisina C-terminal no está presente en ninguna subunidad; este procesamiento se suele observar en proteínas recombinantes producidas en un cultivo celular de mamífero, así como también en proteínas derivadas del plasma.				
Subunidad FIX-Fc-SC (la parte Fc de FIX-Fc está en negrita):				
1	<u>MQRVN</u> MIMAE	<u>SPSLITICLL</u>	<u>GYLLSA</u> ECTV	<u>FLDHEN</u> ANKI
51	<u>KLEEFV</u> QGNL	<u>ERECME</u> EKCS	<u>FEEARE</u> VFEN	<u>TERTTE</u> FWKQ
101	<u>PCLNGG</u> SKCD	<u>DINSYEC</u> WCP	<u>FGFEGK</u> NCEL	<u>DVTCNI</u> KNGR
151	<u>NKVVC</u> SCTEG	<u>YRLAEN</u> QKSC	<u>EPAVPF</u> PCGR	<u>VSVSQT</u> SKLT
201	<u>YVNSTE</u> AETI	<u>LDNITQ</u> STQS	<u>FNDFTR</u> VVGG	<u>EDAKPG</u> QFPW
251	<u>FCGGS</u> IVNEK	<u>WIVTAA</u> HCVE	<u>TGVKIT</u> VVAG	<u>EHNIEE</u> TEHT
301	<u>PHHNY</u> NAAIN	<u>KYNHDI</u> ALLE	<u>LDEPLV</u> LNSY	<u>VTPICI</u> ADKE
351	<u>GYVSG</u> WGRVF	<u>HKGRSA</u> LVLO	<u>YLRVPL</u> VDRA	<u>TCLRST</u> KFTI
401	<u>EGGRD</u> SCQGD	<u>SGGPHV</u> TEVE	<u>GTSFLT</u> GIIS	<u>WGEECA</u> MKGK
451	<u>VNWIKE</u> TKL	<u>TDKTH</u> TCPPC	<u>PAPELL</u> GGPS	<u>VFLFPP</u> KPKD
501	<u>TCVVVD</u> VSHE	<u>DPEVK</u> ENWYV	<u>DGVEVH</u> NAKT	<u>KPREEQ</u> YNST
551	<u>HQDWLN</u> GKEY	<u>KCKVSN</u> KALP	<u>APIEKT</u> ISKA	<u>KGQPRE</u> PQVY
601	<u>KNQVSL</u> TCLV	<u>KGFYPS</u> DIIV	<u>EWESNG</u> QPEN	<u>NYKTTP</u> PVLD
651	<u>LTVDK</u> SRWQQ	<u>GNVFS</u> CSVMH	<u>EALHNH</u> YTQK	<u>SLSLSP</u> GK

Tabla 19: Secuencias polinucleotídicas de FVII

A. FVII-Fc de longitud completa	
Secuencia de ADN de FVII-Fc de longitud completa (péptido señal de FVII subrayado, región de Fc en negrita) (SEQ ID NO: 15, que codifica la SEQ ID NO: 16)	
1	<u>atggtctccc</u> <u>argccctcag</u> <u>ctcctctcgc</u> <u>cttctgcttg</u> <u>cgcttcaggg</u>
51	<u>ctcctcgtct</u> <u>gcagccgggg</u> <u>tcctctaaggc</u> <u>ctcagaggga</u> <u>aaaacacggg</u>
101	<u>acatgccctg</u> <u>gaagccgggg</u> <u>cctcacagag</u> <u>tcttcgtaac</u> <u>ccaaggaggaa</u>
151	<u>gcccacggcg</u> <u>tcctgcaccg</u> <u>gcgcggggcg</u> <u>gccaacgcgt</u> <u>tcctggaggaa</u>
201	<u>gctgcggccg</u> <u>ggctccctgg</u> <u>agagggagtg</u> <u>caaggaggag</u> <u>cagtgtctct</u>
251	<u>tcgaggaggc</u> <u>ccgggagatc</u> <u>ttcaaggacg</u> <u>cggagaggac</u> <u>gaagctgttc</u>
301	<u>tggattttctt</u> <u>acagtgatgg</u> <u>ggaccagtgt</u> <u>gcctcaagtc</u> <u>catgccagaa</u>

```

351 tgggggctcc tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc
401 ctgccttcga gggccggaac tgtgagacgc acaaggatga ccagctgac
451 tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag tactgcagtg accacacggg
501 caccaagcgc tcctgtcggt gccacgaggg gtactctctg ctggcagacg
551 ggggtgcctg cacacccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt
601 ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa
651 ggtgtgcccc aaaggggagt gtccatggca ggctcgttg ttggtgaatg
701 gagctcagtt gtgtgggggg accctgatca acaccatctg ggtggtctcc
751 gcggcccaact gtttcgacaa aatcaagaac tggaggaaac tgatcgcggt
801 gctgggagag cagcacctca gcgagcacga cggggatgag cagagccggc
851 ggggtggcga ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac
901 cagcacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca
951 tgtgtgcccc ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg
1001 ccttcgtgag cttctcattg gtcagcggct ggggccaagt gctggaccgt
1051 ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc aacgtgcccc ggtgatgac
1101 ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc ccaaataatca
1151 cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggaactctgc
1201 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta
1251 cctgacgggc atcgtcagct ggggccaagg ctgcgcaacc gtgggccaact
1301 ttgggggtga caccagggtc tccagtagta tcgagtggct gcaaaagctc
1351 atgcgctcag agccacgccc aggagtctc ctgcgagccc catttcctta
1401 ggacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agctccagaa ctctgggcg
1451 gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgac
1501 tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga
1551 ccctgagggtc aagtccaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg
1601 ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc
1651 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa
1701 gtgcaaaggtc tccaacaaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct
1751 ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca
1801 tcccgggag agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa
1851 aggcctctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc
1901 cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgttggactc cgacggctcc
1951 ttcttctctc acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcagg
2001 gaacgtcttc tcatgtctcg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca
2051 cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa

```

Tabla 20: Secuencias polipeptídicas de FVII

Híbrido de monómero de FVII-Fc: creado coexpresando cadenas de FVII-Fc y Fc.

A. Subunidad FVII-Fc-Sc de la cadena de FVII-Fc (secuencia señal subrayada, región de Fc en negrita) (SEQ ID NO:16):

```

1 MVSQLRLLC LLGLQGCLA AGVAKASGG ETRDMPWKPG PHRVFVTQEE
51 AHGVLHRRRR ANAFLEELRP GSLERECKEE QCSFEEAREI FKDAERTKLF
101 WISYSDGDQC ASSPCQNGGS CKDQLQSYIC FCLPAFEGRN CETHKDDQLI
151 CVNENGGCEQ YCS DHTGTR SCRCHGYSL LADGV SCTPT VEYPCGKIPI
201 LEKRNASKPQ GRIVGGKVCP KGECPWQVLL LVNGAQLCGG TLINTIWVVS
251 AAHCFDKIKN WRNLI AVLGE HDLSEHDGDE QSRRAQVII PSTYVPGTTN
301 HDIALRLRHQ PVVLTDHVP LCLPERTFSE RTLAFVRFSL VSGWGQLLDR
351 GATALELMVL NVPRLMQDC LQQRKVGDS PNITEYM FCA GYSDGSKDSC
401 KDSGGPHAT HYRGTWYLTG IVSWGQGCAT VGHFGVYTRV SQIEWLQKL
451 MRSEPRPGVL LRAPFPDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
501 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS

```

```

551 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
601 RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQFENNYKTT PFVLDS DGSF
651 FLYSKLTVDK SRWQQGNVES CSVMHEALHN HYTQKSLSL FGK

```

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> BIOGEN IDEC MA, INC. BOLTON, GLEN SELVITELLI, KEITH <120> Métodos de inactivación vírica en columna <130> 2159.425PC02/EKS/C-K/E-H <140> A asignar	
10	<141> adjunto a la presente <150> 61/882,488 <151> 2013-09-25 <150> 62/028,657 <151> 2014-07-24	
15	<160> 23 <170> PatentIn versión 3.5 <210> 1 <211> 5052 <212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial <220> <223> Cadena de FVIII-Fc con el dominio B eliminado <220> <221> péptido señal	
25	<222> (1)..(57) <223> Péptido señal de FVIII <220> <221> característica miscelánea <222> (4372)..(5053)	
30	<223> Región Fc <400> 1 atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60 accagaagat actacctggg tgcagtgga ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120 ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180 acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240 gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat 300 gatacagtg tcatcact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagctc tcatgctgtt 360 ggtgtatcct actggaaagc ttctgagga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420 gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg 480 aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540 gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa 600	

ES 2 900 425 T3

gggagtcttg	ccaaggaaaa	gacacagacc	ttgcacaaat	ttatactact	ttttgctgta	660
tttgatgaag	ggaaaagttg	gcactcagaa	acaaagaact	ccttgatgca	ggatagggat	720
gctgcatctg	ctcgggcctg	gcctaaaatg	cacacagtca	atggttatgt	aaacaggctc	780
ctgccaggtc	tgattggatg	ccacaggaaa	tcagtctatt	ggcatgtgat	tggaatgggc	840
accactcctg	aagtgcactc	aatattcctc	gaaggtcaca	catttcttgt	gaggaaccat	900
cgccaggcgt	ccttgaaaat	ctcgccaata	actttcctta	ctgctcaaac	actccttgatg	960
gacettggac	agtttctact	gttttgtcat	atctcttccc	accaacatga	tggcatggaa	1020
gcttatgtca	aagtagacag	ctgtccagag	gaaccccaac	tacgaatgaa	aaataatgaa	1080
gaagcggaa	actatgatga	tgatcttact	gattctgaaa	tggatgtgg	caggtttgat	1140
gatgacaact	ctccttcctt	tatccaaatt	cgctcagttg	ccaagaagca	tcctaaaact	1200
tgggtacatt	acattgctgc	tgaagaggag	gactgggact	atgctccctt	agtcctcgcc	1260
cccgatgaca	gaagttataa	aagtcaatat	ttgaacaatg	gccctcagcg	gattggtagg	1320
aagtacaaaa	aagtccgatt	tatggcatac	acagatgaaa	cctttaagac	tcgtgaagct	1380
attcagcatg	aatcaggaat	cttgggacct	ttactttatg	gggaagttgg	agacacactg	1440
ttgattatat	ttaagaatca	agcaagcaga	ccatataaca	tctaccctca	cggaatcact	1500
gatgtccgtc	ctttgtattc	aaggagatta	ccaaaagggtg	taaaacattt	gaaggatttt	1560
ccaattctgc	caggagaaat	attcaaatat	aaatggacag	tgactgtaga	agatgggcca	1620
actaaatcag	atcctcggtg	cctgaccgcg	tattactcta	gtttcgtaa	tatggagaga	1680
gatctagctt	caggactcat	tggccctctc	ctcatctgct	acaaagaatc	tgtagatcaa	1740
agaggaaacc	agataatgtc	agacaagagg	aatgtcatcc	tgttttctgt	atttgatgag	1800
aaccgaagct	ggtacctcac	agagaatata	caacgctttc	tccccaatcc	agctggagtg	1860
cagcttgagg	atccagagtt	ccaagcctcc	aacatcatgc	acagcatcaa	tggctatggt	1920
tttgatagtt	tgcagttgtc	agtttgtttg	catgaggtgg	catactggta	cattctaagc	1980
attggagcac	agactgactt	cctttctgtc	ttcttctctg	gatatacctt	caaacacaaa	2040
atggtctatg	aagacacact	caccctattc	ccattctcag	gagaaactgt	cttcatgtcg	2100
atggaaaacc	caggctctatg	gattctgggg	tgccacaact	cagactttcg	gaacagaggc	2160
atgaccgcct	tactgaaggt	ttctagtgtg	gacaagaaca	ctggtgatta	ttacgaggac	2220
agttatgaag	atatttcagc	atacttgctg	agtaaaaaaca	atgccattga	accaagaagc	2280
ttctctcaaa	accaccagct	cttgaaacgc	catcaacggg	aaataactcg	tactactctt	2340
cagtcagatc	aagaggaaat	tgactatgat	gataccatat	cagttgaaat	gaagaaggaa	2400
gattttgaca	tttatgatga	ggatgaaaat	cagagccccc	gcagctttca	aaagaaaaca	2460
cgacactatt	ttattgctgc	agtggagagg	ctctgggatt	atgggatgag	tagctcccca	2520

ES 2 900 425 T3

catgttctaa gaaacagggc tcagagtggc agtgtccctc agttcaagaa agttgttttc	2580
caggaattta ctgatggctc ctttactcag cccttatacc gtggagaact aaatgaacat	2640
ttgggactcc tggggccata tataagagca gaagttgaag ataatatcat ggtaactttc	2700
agaaatcagg cctctcgtcc ctattccttc tattctagcc ttattttctta tgaggaagat	2760
cagaggcaag gaggagaacc tagaaaaaac tttgtcaagc ctaatgaaac caaaacttac	2820
ttttggaag tgcaacatca tatggcacc ctaaaagatg agtttgactg caaagcctgg	2880
gcttattttct ctgatgttga cctggaaaa gatgtgcact caggcctgat tggaccctt	2940
ctggtctgcc aactaacac actgaaccct gctcatggga gacaagtgc agtacaggaa	3000
tttgctctgt ttttcaccat ctttgatgag accaaaagct ggtacttcac tgaaaatatg	3060
gaaagaaact gcagggctcc ctgcaatata cagatggaag atcccacttt taaagagaat	3120
tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct	3180
caggatcaaa ggattcgatg gtatctgctc agcatgggca gcaatgaaaa catccattct	3240
attcatttca gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaag aggagtataa aatggcactg	3300
tacaatctct atccagggtg ttttgagaca gtggaaatgt taccatccaa agctggaatt	3360
tggcgggtgg aatgccttat tggcgagcat ctacatgctg ggatgagcac actttttctg	3420
gtgtacagca ataagtgtca gactccctg ggaatggctt ctggacacat tagagatttt	3480
cagattacag cttcaggaca atatggacag tgggccccaa agctggccag acttcattat	3540
tccggatcaa tcaatgcctg gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg	3600
ttggcaccaa tgattattca cggcatcaag acccaggtg cccgtcagaa gttctccagc	3660
ctctacatct ctacagtttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtg gcagacttat	3720
cgaggaaatt ccaactggaac cttaatggtc ttctttggca atgtggattc atctgggata	3780
aaacacaata tttttaacct tccaattatt gctcgataca tccgtttgca cccaactcat	3840
tatagcattc gcagcactct tcgcatggag ttgatgggct gtgatttaaa tagttgcagc	3900
atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcacctac	3960
tttaccaata tgtttgccac ctggtctcct tcaaaagctc gacttcacct ccaagggagg	4020
agtaatgcct ggagacctca ggtgaataat ccaaaagagt ggctgcaagt ggacttccag	4080
aagacaatga aagtcacagg agtaactact caggagtaa aatctctgct taccagcatg	4140
tatgtgaagg agttcctcat ctccagcagt caagatggcc atcagtggac tctctttttt	4200
cagaatggca aagtaaaggt ttttcaggga aatcaagact ccttcacacc tgtggtgaac	4260
tctctagacc caccgttact gactcgctac cttcgaattc acccccagag ttgggtgcac	4320
cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac aggacctcta cgacaaaact	4380

ES 2 900 425 T3

	cacacatgcc caccgtgccc agctccagaa ctcttgggcg gaccgtcagt cttcctcttc	4440
	cccccaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcggtgtg	4500
	gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag	4560
	gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta cctgtgtgtc	4620
	agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc	4680
	tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc	4740
	cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc	4800
	agcctgacct gcctgggtcaa aggccttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc	4860
	aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgttggactc cgacggctcc	4920
	ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc	4980
	tcatgtctcg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg	5040
	tctccgggta aa	5052
	<210> 2	
	<211> 1684	
	<212> PRT	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cadena de FVIII-Fc con el dominio B eliminado	
	<220>	
	<221> SEÑAL	
10	<222> (1)..(19)	
	<223> Secuencia señal	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (20)..(759)	
15	<223> Secuencia de HC	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (760)..(773)	
	<223> Secuencia restante del dominio B	
20	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (1458)..(1684)	
	<223> Secuencia de Fc	
	<400> 2	
	Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe	
	1 5 10 15	
25	Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser	
	20 25 30	

ES 2 900 425 T3

Trp	Asp	Tyr	Met	Gln	Ser	Asp	Leu	Gly	Glu	Leu	Pro	Val	Asp	Ala	Arg		
		35					40					45					
Phe	Pro	Pro	Arg	Val	Pro	Lys	Ser	Phe	Pro	Phe	Asn	Thr	Ser	Val	Val		
	50					55					60						
Tyr	Lys	Lys	Thr	Leu	Phe	Val	Glu	Phe	Thr	Asp	His	Leu	Phe	Asn	Ile		
65					70					75					80		
Ala	Lys	Pro	Arg	Pro	Pro	Trp	Met	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Thr	Ile	Gln		
				85					90					95			
Ala	Glu	Val	Tyr	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Ala	Ser		
			100					105					110				
His	Pro	Val	Ser	Leu	His	Ala	Val	Gly	Val	Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Ser		
		115					120					125					
Glu	Gly	Ala	Glu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp		
	130					135					140						
Asp	Lys	Val	Phe	Pro	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Tyr	Val	Trp	Gln	Val	Leu		
145					150					155					160		
Lys	Glu	Asn	Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Cys	Leu	Thr	Tyr	Ser		
				165					170					175			
Tyr	Leu	Ser	His	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Ile		
			180					185					190				
Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Cys	Arg	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr		
		195					200					205					
Gln	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Gly		
	210					215					220						
Lys	Ser	Trp	His	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser	Leu	Met	Gln	Asp	Arg	Asp		
225					230					235					240		
Ala	Ala	Ser	Ala	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys	Met	His	Thr	Val	Asn	Gly	Tyr		
				245					250					255			
Val	Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Cys	His	Arg	Lys	Ser	Val		
			260					265					270				
Tyr	Trp	His	Val	Ile	Gly	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	Val	His	Ser	Ile		
		275					280					285					

ES 2 900 425 T3

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300
 Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320
 Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335
 Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350
 Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365
 Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380
 Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430
 Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp

ES 2 900 425 T3

530						535										540
Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	
545					550					555				560		
Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	
				565					570					575		
Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	
			580					585					590			
Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	
		595					600					605				
Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	
610						615					620					
Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	
625					630				635						640	
Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	
				645					650					655		
Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	
			660					665					670			
Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	
		675					680					685				
Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	
690						695					700					
Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	
705					710					715				720		
Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	
				725					730					735		
Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	
			740					745					750			
Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Leu	
		755					760					765				
Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	
770						775					780					

ES 2 900 425 T3

Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu
 785 790 795 800
 Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe
 805 810 815
 Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp
 820 825 830
 Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln
 835 840 845
 Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
 850 855 860
 Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His
 865 870 875 880
 Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile
 885 890 895
 Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
 900 905 910
 Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
 915 920 925
 Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
 930 935 940
 Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp
 945 950 955 960
 Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu
 965 970 975
 Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His
 980 985 990
 Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe
 995 1000 1005
 Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn
 1010 1015 1020
 Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
 1025 1030 1035

ES 2 900 425 T3

Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr
1040						1045					1050			
Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr
1055						1060					1065			
Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe
1070						1075					1080			
Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met
1085						1090					1095			
Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met
1100						1105					1110			
Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly
1115						1120					1125			
Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser
1130						1135					1140			
Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg
1145						1150					1155			
Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro
1160						1165					1170			
Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser
1175						1180					1185			
Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro
1190						1195					1200			
Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile	Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe
1205						1210					1215			
Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp
1220						1225					1230			
Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu
1235						1240					1245			
Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn
1250						1255					1260			
Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro
1265						1270					1275			

ES 2 900 425 T3

Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly
1280						1285					1290			
Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys
1295						1300					1305			
Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn
1310						1315					1320			
Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln
1325						1330					1335			
Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu
1340						1345					1350			
Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val
1355						1360					1365			
Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys
1370						1375					1380			
Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu
1385						1390					1395			
Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp
1400						1405					1410			
Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr
1415						1420					1425			
Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala
1430						1435					1440			
Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp
1445						1450					1455			
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
1460						1465					1470			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
1475						1480					1485			
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
1490						1495					1500			
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly

ES 2 900 425 T3

1505		1510		1515
Val Glu	Val His Asn Ala Lys	Thr Lys Pro Arg Glu	Glu Gln Tyr	
1520	1525	1530		
Asn Ser	Thr Tyr Arg Val Val	Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln	
1535	1540	1545		
Asp Trp	Leu Asn Gly Lys Glu	Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys	
1550	1555	1560		
Ala Leu	Pro Ala Pro Ile Glu	Lys Thr Ile Ser Lys	Ala Lys Gly	
1565	1570	1575		
Gln Pro	Arg Glu Pro Gln Val	Tyr Thr Leu Pro Pro	Ser Arg Asp	
1580	1585	1590		
Glu Leu	Thr Lys Asn Gln Val	Ser Leu Thr Cys Leu	Val Lys Gly	
1595	1600	1605		
Phe Tyr	Pro Ser Asp Ile Ala	Val Glu Trp Glu Ser	Asn Gly Gln	
1610	1615	1620		
Pro Glu	Asn Asn Tyr Lys Thr	Thr Pro Pro Val Leu	Asp Ser Asp	
1625	1630	1635		
Gly Ser	Phe Phe Leu Tyr Ser	Lys Leu Thr Val Asp	Lys Ser Arg	
1640	1645	1650		
Trp Gln	Gln Gly Asn Val Phe	Ser Cys Ser Val Met	His Glu Ala	
1655	1660	1665		
Leu His	Asn His Tyr Thr Gln	Lys Ser Leu Ser Leu	Ser Pro Gly	
1670	1675	1680		

Lys

<210> 3

<211> 741

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de Fc

<220>

<221> péptido señal

<222> (1)..(60)

<223> Péptido señal de kappa de Ig de ratón

<400> 3

ES 2 900 425 T3

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tcctggggagg accgtcagtc      120
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca      180
tgcgtaggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac      240
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac      300
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag      360
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      420
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgcgatga gctgaccaag      480
aaccagggtc gcctgacctg cctgggtcaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag      540
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc      600
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg      660
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      720
ctctccctgt ctccgggtaa a                                              741

```

<210> 4

<211> 247

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena de FVIII-Fc con el dominio B eliminado

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

<223> Péptido señal de kappa de Ig de ratón

<400> 4

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1          5          10          15

```

```

Gly Ser Thr Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
          20          25          30

```

```

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
          35          40          45

```

```

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
          50          55          60

```

```

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

```

ES 2 900 425 T3

65		70		75		80									
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
				85					90					95	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
			100					105					110		
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
		115					120					125			
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
	130					135					140				
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
145					150					155					160
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
				165					170					175	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
			180					185						190	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
		195					200					205			
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
	210					215					220				
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
225					230					235					240
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
				245											

<210> 5

<211> 7734

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de FVIII-Fc de longitud completa

<220>

<221> péptido señal

10 <222> (1)..(57)

<223> Péptido señal de FVIII

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (7054)..(7734)

15 <223> Región Fc

ES 2 900 425 T3

<400> 5
atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat 300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctgtt 360
ggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggctctg 480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa 600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat 720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct 780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc 840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catctcttgt gaggaacct 900
cgccaggcgt ccttggaat ctgcgaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960
gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctctccc accaactga tggcatggaa 1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat 1140
gatgacaact ctccctcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca toctaaaact 1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc 1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg 1320
aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg 1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt gaaggatttt 1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620
actaaatcag atcctcgggtg cctgacccgc tattactcta gtttcgttaa tatggagaga 1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800

ES 2 900 425 T3

aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg	1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt	1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc	1980
attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa	2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc	2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac	2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc	2280
ttctcccaga attcaagaca ccctagcact aggcaaaagc aatttaatgc caccacaatt	2340
ccagaaaatg acatagagaa gactgaccct tggtttgcac acagaacacc tatgcctaaa	2400
atacaaaatg tctcctctag tgatttggtg atgctcttgc gacagagtcc tactccacat	2460
gggctatcct tatctgatct ccaagaagcc aaatatgaga ctttttctga tgatccatca	2520
cctggagcaa tagacagtaa taacagcctg tctgaaatga cacacttcag gccacagctc	2580
catcacagtg gggacatggt atttaccctt gagtcaggcc tccaattaag attaaatgag	2640
aaactgggga caactgcagc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttctagtaca	2700
tcaaataatc tgatttcaac aattccatca gacaatttgg cagcaggtag tgataataca	2760
agttccttag gacccccaaag tatgccagtt cattatgata gtcaattaga taccactcta	2820
tttggcacaa agtcatctcc ccttactgag tctggtggac ctctgagctt gagtgaagaa	2880
aataatgatt caaagttggt agaatcaggt ttaatgaata gccaaagaaag ttcattgggga	2940
aaaaatgtat cgtcaacaga gagtggtagg ttattttaaag ggaaaagagc tcatggacct	3000
gctttgttga ctaaagataa tgccttattc aaagtttagca tctctttggt aaagacaaac	3060
aaaacttcca ataattcagc aactaataga aagactcaca ttgatggccc atcattatta	3120
attgagaata gtccatcagt ctggcaaaat atattagaaa gtgacactga gtttaaaaaa	3180
gtgacacctt tgattcatga cagaatgctt atggacaaaa atgctacagc tttgaggcta	3240
aatcatatgt caaataaaac tacttcatca aaaaacatgg aaatgggtcca acagaaaaaa	3300
gagggcccca ttccaccaga tgcacaaaat ccagatatgt cgttctttaa gatgctattc	3360
ttgccagaat cagcaagtg gatacaaagg actcatggaa agaactctct gaactctggg	3420
caaggcccca gtccaaagca attagtatcc ttaggaccag aaaaatctgt ggaaggtcag	3480
aatttcttgt ctgagaaaaa caaagtggta gtaggaaagg gtgaatttac aaaggacgta	3540
ggactcaaag agatgggttt tccaagcagc agaaacctat ttcttactaa cttggataat	3600
ttacatgaaa ataatacaca caatcaagaa aaaaaattc aggaagaaat agaaaagaag	3660

ES 2 900 425 T3

gaaacattaa	tccaagagaa	tgtagttttg	cctcagatac	atacagtac	tggcactaag	3720
aatttcatga	agaacctttt	cttactgagc	actaggcaaa	atgtagaagg	ttcatatgac	3780
ggggcatatg	ctccagtact	tcaagatttt	aggtcattaa	atgattcaac	aaatagaaca	3840
aagaaacaca	cagctcattt	ctcaaaaaaa	ggggaggaag	aaaacttgga	aggcttgga	3900
aatcaaacca	agcaaattgt	agagaaatat	gcatgcacca	caaggatata	tcctaataca	3960
agccagcaga	attttgtcac	gcaacgtagt	aagagagctt	tgaacaatt	cagactccca	4020
ctagaagaaa	cagaacttga	aaaaaggata	attgtggatg	acacctcaac	ccagtgggtcc	4080
aaaaacatga	aacatttgac	cccgagcacc	ctcacacaga	tagactacaa	tgagaaggag	4140
aaaggggcca	ttactcagtc	tcccttatca	gattgcctta	cgaggagtca	tagcatccct	4200
caagcaaata	gatctccatt	acccattgca	aaggatatcat	catttccatc	tattagacct	4260
atatatctga	ccagggtcct	attccaagac	aactcttctc	atcttccagc	agcatcttat	4320
agaaagaaag	attctggggt	ccaagaaagc	agtcatttct	tacaaggagc	caaaaaaat	4380
aacctttctt	tagccattct	aaccttggag	atgactggtg	atcaaagaga	ggttggctcc	4440
ctggggacaa	gtgccacaaa	ttcagtcaca	tacaagaaag	ttgagaacac	tgttctcccg	4500
aaaccagact	tgcccaaaac	atctggcaaa	gttgaattgc	ttccaaaagt	tcacatttat	4560
cagaaggacc	tattccctac	ggaaactagc	aatgggtctc	ctggccatct	ggatctcgtg	4620
gaagggagcc	ttcttcaggg	aacagaggga	gcgattaagt	ggaatgaagc	aaacagacct	4680
ggaaaagttc	cctttctgag	agtagcaaca	gaaagctctg	caaagactcc	ctccaagcta	4740
ttggatcctc	ttgcttggga	taaccactat	ggtactcaga	taccaaaga	agagtggaaa	4800
tccaagaga	agtcaccaga	aaaaacagct	tttaagaaaa	aggataccat	tttgtccctg	4860
aacgcttgtg	aaagcaatca	tgcaatagca	gcaataaatg	agggacaaaa	taagcccga	4920
atagaagtca	cctggggcaaa	gcaaggtagg	actgaaaggc	tgtgctctca	aaaccaccca	4980
gtcttgaaac	gccatcaacg	ggaaataact	cgtactactc	ttcagtcaga	tcaagaggaa	5040
attgactatg	atgataccat	atcagttgaa	atgaagaagg	aagattttga	catttatgat	5100
gaggatgaaa	atcagagccc	ccgcagcttt	caaaagaaaa	cacgacacta	ttttattgct	5160
gcagtggaga	ggctctggga	ttatgggatg	agtagctccc	cacatgttct	aagaaacagg	5220
gctcagagtg	gcagtgtccc	tcagttcaag	aaagttgttt	tccaggaatt	tactgatggc	5280
tcctttactc	agcccttata	ccgtggagaa	ctaaatgaac	atttgggact	cctggggcca	5340
tatataagag	cagaagttga	agataatatc	atggtaactt	tcagaaatca	ggcctctcgt	5400
ccctattcct	tctattctag	ccttatttct	tatgaggaag	atcagaggca	aggagcagaa	5460
cctagaaaaa	actttgtcaa	gcctaataga	accaaaactt	acttttgga	agtgcaacat	5520
catatggcac	ccactaaaga	tgagtttgac	tgcaaagcct	gggcttattt	ctctgatgtt	5580

ES 2 900 425 T3

gacctggaaa aagatgtgca ctcaggcctg attggacccc ttctgggtctg ccacactaac 5640
 aactgaacc ctgctcatgg gagacaagtg acagtacagg aatttgctct gtttttcacc 5700
 atctttgatg agacaaaaag ctggtacttc actgaaaata tggaaagaaa ctgcagggct 5760
 ccctgcaata tccagatgga agatcccact tttaaagaga attatcgctt ccatgcaatc 5820
 aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctcaggatca aaggattcga 5880
 tggatatctgc tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat 5940
 gtgttcactg tacgaaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccagg 6000
 gtttttgaga cagtggaaat gttaccatcc aaagctggaa tttggcgggt ggaatgcctt 6060
 attggcgagc atctacatgc tgggatgagc acactttttc tgggtgtacag caataagtgt 6120
 cagactcccc tgggaatggc ttctggacac attagagatt ttcagattac agcttcagga 6180
 caatatggac agtgggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc 6240
 tggagcacca aggagccctt ttcttggatc aaggtggatc tgttggcacc aatgattatt 6300
 cacggcatca agaccaggg tgcccgtcag aagttctcca gcctctacat ctctcagttt 6360
 atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt atcgaggaaa ttccactgga 6420
 accttaatgg tcttcttttg caatgtggat tcatctggga taaaacacaa tatttttaac 6480
 cctccaatta ttgctcgata catccgtttg caccacaactc attatagcat tcgcagcact 6540
 cttcgcgatg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaatggag 6600
 agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcaccc cttttaccaa tatgtttgcc 6660
 acctggtctc cttcaaaaagc tcgacttcac ctccaaggga ggagtaatgc ctggagacct 6720
 caggatgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca 6780
 ggagtaacta ctcaggaggat aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttcctc 6840
 atctccagca gtcaagatgg ccatcagtg actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag 6900
 gtttttcagg gaaatcaaga ctctctcaca cctgtgtgga actctctaga cccaccgtta 6960
 ctgactcgct accttcgaat tcacccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg 7020
 gaggttctgg gctgcgaggc acaggacctc tacgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 7080
 ccagctccag aactcctggg cggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac 7140
 accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa 7200
 gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 7260
 aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 7320
 caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 7380
 gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 7440
 accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 7500
 aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 7560
 aactacaaga ccacgcctcc cgtgttggac tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag 7620
 ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcac 7680
 gaggtctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 7734
 <210> 6

<211> 2578
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cadena de FVIII_{FC} de longitud completa
 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(19)
 <223> Péptido señal de FVIII
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(759)
 <223> Secuencia de HC
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (760)..(1667)
 <223> Secuencia del dominio B
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (2351)..(2578)
 <223> Secuencia de Fc
 <400> 6
 Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
 1 5 10 15

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

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

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

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

 Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln

ES 2 900 425 T3

85										90					95				
Ala	Glu	Val	Tyr	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Ala	Ser				
			100				105						110						
His	Pro	Val	Ser	Leu	His	Ala	Val	Gly	Val	Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Ser				
			115				120				125								
Glu	Gly	Ala	Glu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp				
			130				135				140								
Asp	Lys	Val	Phe	Pro	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Tyr	Val	Trp	Gln	Val	Leu				
145				150						155			160						
Lys	Glu	Asn	Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Cys	Leu	Thr	Tyr	Ser				
				165				170						175					
Tyr	Leu	Ser	His	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Ile				
			180				185						190						
Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Cys	Arg	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr				
			195				200				205								
Gln	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Gly				
			210				215				220								
Lys	Ser	Trp	His	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser	Leu	Met	Gln	Asp	Arg	Asp				
225				230						235			240						
Ala	Ala	Ser	Ala	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys	Met	His	Thr	Val	Asn	Gly	Tyr				
				245				250						255					
Val	Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Cys	His	Arg	Lys	Ser	Val				
			260				265						270						
Tyr	Trp	His	Val	Ile	Gly	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	Val	His	Ser	Ile				
			275				280				285								
Phe	Leu	Glu	Gly	His	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Asn	His	Arg	Gln	Ala	Ser				
			290				295				300								
Leu	Glu	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu	Met				
305				310						315			320						
Asp	Leu	Gly	Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His				
				325				330						335					

ES 2 900 425 T3

Asp	Gly	Met	Glu	Ala	Tyr	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro	340	345	350
Gln	Leu	Arg	Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp	355	360	365
Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser	370	375	380
Pro	Ser	Phe	Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	385	390	400
Trp	Val	His	Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	405	410	415
Leu	Val	Leu	Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	420	425	430
Asn	Gly	Pro	Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met	435	440	445
Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	450	455	460
Ser	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	465	470	475
Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	485	490	495
His	Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys	500	505	510
Gly	Val	Lys	His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe	515	520	525
Lys	Tyr	Lys	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	530	535	540
Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	545	550	555
Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	565	570	575
Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	580	585	590

ES 2 900 425 T3

Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	
595						600					605					
Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	
610						615					620					
Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	
625					630					635					640	
Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	
				645				650						655		
Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	
		660						665				670				
Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	
		675				680						685				
Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	
690						695				700						
Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	
705				710						715				720		
Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	
				725				730						735		
Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	
		740						745				750				
Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro	
755						760						765				
Ser	Thr	Arg	Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Glu	Asn	Asp	
770						775				780						
Ile	Glu	Lys	Thr	Asp	Pro	Trp	Phe	Ala	His	Arg	Thr	Pro	Met	Pro	Lys	
785				790						795				800		
Ile	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Gln	Ser	
				805				810						815		
Pro	Thr	Pro	His	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Tyr	
		820						825				830				
Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Ile	Asp	Ser	Asn	Asn	
835						840						845				

ES 2 900 425 T3

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

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

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

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

Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
 915 920 925

Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
 930 935 940

Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu
 945 950 955 960

Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu
 965 970 975

Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe
 980 985 990

Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala
 995 1000 1005

Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser
 1010 1015 1020

Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser
 1025 1030 1035

Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu
 1040 1045 1050

Ser Asp Thr Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg
 1055 1060 1065

Met Leu Met Asp Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met
 1070 1075 1080

Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln

ES 2 900 425 T3

1085		1090		1095
Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met	1100	1105	1110	
Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile	1115	1120	1125	
Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro	1130	1135	1140	
Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu	1145	1150	1155	
Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys	1160	1165	1170	
Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro	1175	1180	1185	
Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu	1190	1195	1200	
Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu	1205	1210	1215	
Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile	1220	1225	1230	
His Thr Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu	1235	1240	1245	
Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr	1250	1255	1260	
Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn	1265	1270	1275	
Arg Thr Lys Lys His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu	1280	1285	1290	
Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu	1295	1300	1305	
Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln	1310	1315	1320	

ES 2 900 425 T3

Asn Phe	Val Thr Gln Arg	Ser	Lys Arg Ala Leu	Lys	Gln Phe Arg
1325		1330		1335	
Leu Pro	Leu Glu Glu Thr	Glu	Leu Glu Lys Arg	Ile	Ile Val Asp
1340		1345		1350	
Asp Thr	Ser Thr Gln Trp	Ser	Lys Asn Met Lys	His	Leu Thr Pro
1355		1360		1365	
Ser Thr	Leu Thr Gln Ile	Asp	Tyr Asn Glu Lys	Glu	Lys Gly Ala
1370		1375		1380	
Ile Thr	Gln Ser Pro Leu	Ser	Asp Cys Leu Thr	Arg	Ser His Ser
1385		1390		1395	
Ile Pro	Gln Ala Asn Arg	Ser	Pro Leu Pro Ile	Ala	Lys Val Ser
1400		1405		1410	
Ser Phe	Pro Ser Ile Arg	Pro	Ile Tyr Leu Thr	Arg	Val Leu Phe
1415		1420		1425	
Gln Asp	Asn Ser Ser His	Leu	Pro Ala Ala Ser	Tyr	Arg Lys Lys
1430		1435		1440	
Asp Ser	Gly Val Gln Glu	Ser	Ser His Phe Leu	Gln	Gly Ala Lys
1445		1450		1455	
Lys Asn	Asn Leu Ser Leu	Ala	Ile Leu Thr Leu	Glu	Met Thr Gly
1460		1465		1470	
Asp Gln	Arg Glu Val Gly	Ser	Leu Gly Thr Ser	Ala	Thr Asn Ser
1475		1480		1485	
Val Thr	Tyr Lys Lys Val	Glu	Asn Thr Val Leu	Pro	Lys Pro Asp
1490		1495		1500	
Leu Pro	Lys Thr Ser Gly	Lys	Val Glu Leu Leu	Pro	Lys Val His
1505		1510		1515	
Ile Tyr	Gln Lys Asp Leu	Phe	Pro Thr Glu Thr	Ser	Asn Gly Ser
1520		1525		1530	
Pro Gly	His Leu Asp Leu	Val	Glu Gly Ser Leu	Leu	Gln Gly Thr
1535		1540		1545	
Glu Gly	Ala Ile Lys Trp	Asn	Glu Ala Asn Arg	Pro	Gly Lys Val
1550		1555		1560	

ES 2 900 425 T3

Pro	Phe	Leu	Arg	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Pro	Ser
1565						1570					1575			
Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	His	Tyr	Gly	Thr	Gln
1580						1585					1590			
Ile	Pro	Lys	Glu	Glu	Trp	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Lys
1595						1600					1605			
Thr	Ala	Phe	Lys	Lys	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys
1610						1615					1620			
Glu	Ser	Asn	His	Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys
1625						1630					1635			
Pro	Glu	Ile	Glu	Val	Thr	Trp	Ala	Lys	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Arg
1640						1645					1650			
Leu	Cys	Ser	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu
1655						1660					1665			
Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr
1670						1675					1680			
Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile
1685						1690					1695			
Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys
1700						1705					1710			
Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr
1715						1720					1725			
Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser
1730						1735					1740			
Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr
1745						1750					1755			
Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu
1760						1765					1770			
His	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp
1775						1780					1785			
Asn	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser
1790						1795					1800			

ES 2 900 425 T3

Phe	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly
1805						1810					1815			
Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr
1820						1825					1830			
Tyr	Phe	Trp	Lys	Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu
1835						1840					1845			
Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu
1850						1855					1860			
Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His
1865						1870					1875			
Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln
1880						1885					1890			
Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp
1895						1900					1905			
Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn
1910						1915					1920			
Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His
1925						1930					1935			
Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met
1940						1945					1950			
Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser
1955						1960					1965			
Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr
1970						1975					1980			
Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr
1985						1990					1995			
Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly
2000						2005					2010			
Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly
2015						2020					2025			
Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro

ES 2 900 425 T3

2030	2035	2040
Leu Gly 2045	Met Ala Ser Gly His 2050	Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala 2055
Ser Gly 2060	Gln Tyr Gly Gln Trp 2065	Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His 2070
Tyr Ser 2075	Gly Ser Ile Asn Ala 2080	Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser 2085
Trp Ile 2090	Lys Val Asp Leu Leu 2095	Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile 2100
Lys Thr 2105	Gln Gly Ala Arg Gln 2110	Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser 2115
Gln Phe 2120	Ile Ile Met Tyr Ser 2125	Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr 2130
Tyr Arg 2135	Gly Asn Ser Thr Gly 2140	Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn 2145
Val Asp 2150	Ser Ser Gly Ile Lys 2155	His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile 2160
Ile Ala 2165	Arg Tyr Ile Arg Leu 2170	His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg 2175
Ser Thr 2180	Leu Arg Met Glu Leu 2185	Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys 2190
Ser Met 2195	Pro Leu Gly Met Glu 2200	Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln 2205
Ile Thr 2210	Ala Ser Ser Tyr Phe 2215	Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser 2220
Pro Ser 2225	Lys Ala Arg Leu His 2230	Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp 2235
Arg Pro 2240	Gln Val Asn Asn Pro 2245	Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe 2250
Gln Lys 2255	Thr Met Lys Val Thr 2260	Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys 2265

ES 2 900 425 T3

Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser
2270						2275					2280			
Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys
2285						2290					2295			
Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val
2300						2305					2310			
Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His
2315						2320					2325			
Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu
2330						2335					2340			
Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
2345						2350					2355			
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
2360						2365					2370			
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
2375						2380					2385			
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
2390						2395					2400			
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
2405						2410					2415			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
2420						2425					2430			
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
2435						2440					2445			
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
2450						2455					2460			
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
2465						2470					2475			
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln
2480						2485					2490			
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
2495						2500					2505			

ES 2 900 425 T3

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
2510 2515 2520

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
2525 2530 2535

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
2540 2545 2550

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
2555 2560 2565

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
2570 2575

<210> 7

<211> 2958

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de la cadena pesada de FVIII (HC)-Fc (sin conector entre HC y Fc)

<220>

10 <221> péptido señal

<222> (1)..(57)

<223> péptido señal

<220>

<221> característica miscelánea

15 <222> (2278)..(2958)

<223> Región Fc

<400> 7

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60

accagaagat actacctggg tgcagtgga ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120

ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180

acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240

gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgagggttat 300

gatacagtcg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtc tcatgctgtt 360

ggtgtatcct actggaaagc ttctgagga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420

gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg 480

aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540

gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa 600

gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660

ES 2 900 425 T3

tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct	780
ctgccaggctc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct	900
cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa	1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
gaagcgaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggc caggtttgat	1140
gatgacaact ctcccttctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact	1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320
aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct	1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg ggggaagttg agacacactg	1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
actaaatcag atcctcggtg cctgacccgc tattactcta gtttcgttaa tatggagaga	1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa	1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag	1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttcc tccccaatcc agctggagtg	1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt	1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgttt catgaggtgg catactggta cattctaagc	1980
attggagcac agactgactt ctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa	2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc	2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac	2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagagac	2280
aaaactcaca catgccacc gtgcccagct ccagaactcc tgggcggacc gtcagtcttc	2340
ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggacctctga ggtcacatgc	2400
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	2460
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	2520

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 2580
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 2640
cagcccccag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 2700
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 2760
gagagcaatg ggagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgtt ggactccgac 2820
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 2880
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 2940
tcctgtctc cgggtaaa 2958
<210> 8
<211> 986
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> HC-Fc
<220>
<221> SEÑAL
10 <222> (1)..(19)
<223> péptido señal
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (760)..(986)
15 <223> Secuencia de Fc
<400> 8
Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15
Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30
Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45
Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60
Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80
Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95
Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser

ES 2 900 425 T3

100	105	110
His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser		
115	120	125
Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp		
130	135	140
Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu		
145	150	155
Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser		
165	170	175
Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile		
180	185	190
Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr		
195	200	205
Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly		
210	215	220
Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp		
225	230	235
Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr		
245	250	255
Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val		
260	265	270
Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile		
275	280	285
Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser		
290	295	300
Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met		
305	310	315
Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His		
325	330	335
Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro		
340	345	350

ES 2 900 425 T3

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365
 Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380
 Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430
 Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605

ES 2 900 425 T3

Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	610	615	620
Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	625	630	635
Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	645	650	655
Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	660	665	670
Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	675	680	685
Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	690	695	700
Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	705	710	715
Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	725	730	735
Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	740	745	750
Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	755	760	765
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	770	775	780
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	785	790	795
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	805	810	815
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	820	825	830
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	835	840	845
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	850	855	860

ES 2 900 425 T3

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
865 870 875 880

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
885 890 895

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
900 905 910

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
915 920 925

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
930 935 940

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
945 950 955 960

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
965 970 975

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
980 985

<210> 9

<211> 2973

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de la cadena pesada de FVIII (HC)-Fc (conector de 5 aminoácidos entre HC y Fc)

<220>

10 <221> péptido señal

<222> (1)..(58)

<223> péptido señal

<220>

<221> característica miscelánea

15 <222> (2278)..(2292)

<223> Conector de 5 aminoácidos

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (2293)..(2973)

20 <223> Región Fc

<400> 9

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60

accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120

ES 2 900 425 T3

ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat	300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctgtt	360
ggtgtatcct actggaaagc ttctgagga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg	420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggctctg	480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgacca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat	540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcattggag ccctactagt atgtagagaa	600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta	660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct	780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat	900
cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa	1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggg caggtttgat	1140
gatgacaact ctcccttctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact	1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320
aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct	1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg ggggaagttg agacacactg	1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
actaaatcag atcctcgggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgttaa tatggagaga	1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa	1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag	1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg	1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt	1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc	1980

ES 2 900 425 T3

```

attggagcac agactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacaggagc 2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc 2280
ttctcccaga atgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagctccaga actcctgggc 2340
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 2400
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 2460
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac 2520
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 2580
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 2640
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 2700
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtc aaggcttcta tcccagcgac 2760
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 2820
gtgttgact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 2880
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 2940
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 2973

```

<210> 10

<211> 991

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC+5-Fc

<220>

<221> SEÑAL

10 <222> (1)..(19)

<223> Secuencia señal

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (760)..(764)

15 <223> Secuencia del conector de 5 aminoácidos del domino B de FVIII

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (765)..(991)

<223> Secuencia de Fc

20 <400> 10

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe

1

5

10

15

ES 2 900 425 T3

Cys	Phe	Ser	Ala	Thr	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Glu	Leu	Ser	20	25	30
Trp	Asp	Tyr	Met	Gln	Ser	Asp	Leu	Gly	Glu	Leu	Pro	Val	Asp	Ala	Arg	35	40	45
Phe	Pro	Pro	Arg	Val	Pro	Lys	Ser	Phe	Pro	Phe	Asn	Thr	Ser	Val	Val	50	55	60
Tyr	Lys	Lys	Thr	Leu	Phe	Val	Glu	Phe	Thr	Asp	His	Leu	Phe	Asn	Ile	65	70	75
Ala	Lys	Pro	Arg	Pro	Pro	Trp	Met	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Thr	Ile	Gln	85	90	95
Ala	Glu	Val	Tyr	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Ala	Ser	100	105	110
His	Pro	Val	Ser	Leu	His	Ala	Val	Gly	Val	Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Ser	115	120	125
Glu	Gly	Ala	Glu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp	130	135	140
Asp	Lys	Val	Phe	Pro	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Tyr	Val	Trp	Gln	Val	Leu	145	150	155
Lys	Glu	Asn	Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Cys	Leu	Thr	Tyr	Ser	165	170	175
Tyr	Leu	Ser	His	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Ile	180	185	190
Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Cys	Arg	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	195	200	205
Gln	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Gly	210	215	220
Lys	Ser	Trp	His	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser	Leu	Met	Gln	Asp	Arg	Asp	225	230	235
Ala	Ala	Ser	Ala	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys	Met	His	Thr	Val	Asn	Gly	Tyr	245	250	255
Val	Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Cys	His	Arg	Lys	Ser	Val			

ES 2 900 425 T3

260							265					270				
Tyr	Trp	His	Val	Ile	Gly	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	Val	His	Ser	Ile	
		275					280					285				
Phe	Leu	Glu	Gly	His	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Asn	His	Arg	Gln	Ala	Ser	
	290					295					300					
Leu	Glu	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu	Met	
305					310					315					320	
Asp	Leu	Gly	Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His	
				325					330					335		
Asp	Gly	Met	Glu	Ala	Tyr	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro	
			340					345					350			
Gln	Leu	Arg	Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp	
		355					360					365				
Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser	
	370					375					380					
Pro	Ser	Phe	Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	
385					390					395					400	
Trp	Val	His	Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	
				405					410					415		
Leu	Val	Leu	Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	
			420					425					430			
Asn	Gly	Pro	Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met	
		435					440					445				
Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	
	450					455					460					
Ser	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	
465					470					475					480	
Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	
				485					490					495		
His	Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys	
			500					505					510			

ES 2 900 425 T3

Gly	Val	Lys	His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe
515						520				525					
Lys	Tyr	Lys	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp
530						535				540					
Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg
545				550						555		560			
Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu
				565				570						575	
Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val
		580						585				590			
Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu
		595				600						605			
Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp
610						615				620					
Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val
625				630						635		640			
Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp
				645				650						655	
Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe
		660						665				670			
Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr
675						680				685					
Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro
690						695				700					
Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly
705				710						715		720			
Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp
		725						730				735			
Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys
		740						745				750			
Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Asp	Lys	Thr	His
755						760				765					

ES 2 900 425 T3

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 770 775 780
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 785 790 795 800
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 805 810 815
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 820 825 830
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 835 840 845
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 850 855 860
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 865 870 875 880
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 885 890 895
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 900 905 910
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 915 920 925
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 930 935 940
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 945 950 955 960
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 965 970 975
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 980 985 990

<210> 11

<211> 2793

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de la cadena ligera de FVIII (LC)-Fc

<220>

<221> péptido señal

<222> (1)..(60)

<223> péptido señal

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (2113)..(2793)

<223> Región Fc

<400> 11

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt	60
gaaataactc gtactactct tcagtcagat caagaggaaa ttgactatga tgataccata	120
tcagttgaaa tgaagaagga agattttgac atttatgatg aggatgaaaa tcagagcccc	180
cgcagctttc aaaagaaaac acgacactat tttattgctg cagtggagag gctctgggat	240
tatgggatga gtactctccc acatgttcta agaaacaggg ctgagagtgg cagtgtccct	300
cagttcaaga aagttgtttt ccaggaattt actgatggct cctttactca gcccttatac	360
cgtggagaac taaatgaaca tttgggactc ctggggccat atataagagc agaagttgaa	420
gataatatca tggttaacttt cagaaatcag gcctctcgtc cctattcctt ctattctagc	480
cttatttctt atgaggaaga tcagaggcaa ggagcagaac ctagaaaaaa ctttgtcaag	540
cctaataaaa ccaaaactta cttttggaaa gtgcaacatc atatggcacc cactaaagat	600
gagtttgact gcaaagcctg ggcttatttc tctgatgttg acctggaaaa agatgtgcac	660
tcaggcctga ttggaccctt tctggtctgc cacactaaca cactgaaccc tgctcatggg	720
agacaagtga cagtacagga atttgctctg tttttcacca tctttgatga gaccaaagc	780
tggtacttca ctgaaaatat ggaaagaaac tgcagggtc cctgcaatat ccagatggaa	840
gatcccactt ttaaagagaa ttatcgcttc catgcaatca atggctacat aatggataca	900
ctacctggct tagtaatggc tcaggatcaa aggattcgat ggtatctgct cagcatgggc	960
agcaatgaaa acatccattc tattcatttc agtggacatg tgttcaactgt acgaaaaaa	1020
gaggagtata aaatggcact gtacaatctc tatccaggtg tttttgagac agtggaatg	1080
ttaccatcca aagctggaat ttggcgggtg gaatgcctta ttggcgagca tctacatgct	1140
gggatgagca cactttttct ggtgtacagc aataagtgtc agactcccct gggaatggct	1200
tctggacaca ttagagattt tcagattaca gcttcaggac aatatggaca gtgggcccc	1260
aagctggcca gacttcatta ttccgatca atcaatgcct ggagcaccaa ggagcccttt	1320
tcttgatca agtggtatct gttggcacca atgattattc acggcatcaa gaccagggt	1380
gccgctcaga agttctccag cctctacatc tctcagttta tcatcatgta tagtcttgat	1440
gggaagaagt ggcagactta tcgaggaaat tccactggaa ccttaatggt cttctttggc	1500

ES 2 900 425 T3

```

aatgtggatt catctgggat aaaacacaat atttttaacc ctccaattat tgctcgatac 1560
atccgtttgc acccaactca ttatagcatt cgcagcactc ttcgcatgga gttgatgggc 1620
tgtgatttaa atagttgcag catgccattg ggaatggaga gtaaagcaat atcagatgca 1680
cagattactg cttcatccta ctttaccaat atgtttgcc cctggtctcc ttcaaaagct 1740
cgacttcacc tccaagggag gagtaatgcc tggagacctc aggtgaataa tccaaaagag 1800
tggctgcaag tggacttcca gaagacaatg aaagtcacag gagtaactac tcagggagta 1860
aaatctctgc ttaccagcat gtatgtgaag gagttcctca tctccagcag tcaagatggc 1920
catcagtgga ctctcttttt tcagaatggc aaagtaaagg tttttcaggg aaatcaagac 1980
tccttcacac ctgtggtgaa ctctctagac ccaccgttac tgactcgcta ccttcgaatt 2040
cacccccaga gttgggtgca ccagattgcc ctgaggatgg aggttctggg ctgagaggca 2100
caggacctct acgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagctccaga actcctgggc 2160
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 2220
cctgaggtea catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 2280
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac 2340
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 2400
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 2460
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 2520
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 2580
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 2640
gtgttggtgact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 2700
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac 2760
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 2793

```

<210> 12

<211> 931

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC-Fc6His

<220>

<221> SEÑAL

10 <222> (1)..(20)

<223> péptido señal

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (705)..(931)

15 <223> Secuencia de Fc

<400> 12

ES 2 900 425 T3

Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	1	5	10	15
Gly	Ser	Thr	Gly	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	20	25	30	
Glu	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	35	40	45	
Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	50	55	60	
Lys	Lys	Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	65	70	75	80
Tyr	Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser	85	90	95	
Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr	Asp	100	105	110	
Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu	His	Leu	115	120	125	
Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp	Asn	Ile	Met	130	135	140	
Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser	145	150	155	160
Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	165	170	175	
Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Trp	Lys	Val	Gln	180	185	190	
His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala	195	200	205	
Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile	210	215	220	
Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly	225	230	235	240

ES 2 900 425 T3

Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	
				245					250					255		
Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	
			260					265					270			
Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	
		275					280					285				
Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	
	290					295					300					
Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	
305					310					315					320	
Ser	Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	
				325					330					335		
Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	
			340					345					350			
Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	
		355					360					365				
Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	
	370					375					380					
Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	
385					390				395						400	
Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	
				405					410					415		
Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	
			420					425					430			
Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	
		435					440					445				
Ala	Pro	Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile	Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	
	450					455					460					
Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	
465					470					475					480	
Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu	Met	
				485					490					495		

ES 2 900 425 T3

Val	Phe	Phe	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn	Ile	Phe	500	505	510
Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr	515	520	525
Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly	Cys	Asp	Leu	Asn	530	535	540
Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	545	550	555
Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn	Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser	565	570	575
Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	580	585	590
Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	595	600	605
Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	610	615	620
Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	625	630	635
His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Phe	Gln	645	650	655
Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	660	665	670
Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	675	680	685
Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	690	695	700
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	705	710	715
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	725	730	735
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His			

ES 2 900 425 T3

740	745	750
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
755	760	765
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
770	775	780
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
785	790	800
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
805	810	815
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
820	825	830
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
835	840	845
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
850	855	860
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
865	870	880
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
885	890	895
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
900	905	910
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
915	920	925

Pro Gly Lys
930

<210> 13

<211> 7583

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de la cadena de FIX-Fc

<220>

<221> péptido señal

<222> (690)..(777)

<223> Péptido señal de FIX

<220>

<221> Intrón

<222> (778)..(1076)

<223> Miniintrón de FIX

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (1077)..(2371)

<223> Secuencia de FIX

<220>

5

<221> característica miscelánea

<222> (2372)..(3050)

<223> Región Fc

<400> 13

gcgcgcggttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag	60
ttcatagccc atatattggag ttccgcggtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct	120
gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc	180
caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gccacttgg	240
cagtacatca agtgtatcat atgccaaagta cggcccctat tgacgtcaat gacggtaaat	300
ggcccgcttg gcattatgcc cagtacatga ctttatggga ctttctact tggcagtaca	360
tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc	420
gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga	480
gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat	540
tgacgcaaat gggcggttag cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga gctctctggc	600
taactagaga acccactgct tactggctta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga	660
cccaagcttc gcgacgtacg gccgccacca tgcagcgcggt gaacatgatc atggcagaat	720
caccaggcct catcaccatc tgccttttag gatattctact cagtgtgaa tgtacaggtt	780
tgtttccttt tttaaaatac attgagtatg cttgcctttt agatatagaa atatctgatg	840
ctgtcttctt cactaaattt tgattacatg atttgacagc aatattgaag agtctaacag	900
ccagcacgca ggttggttaag tactgtggga acatcacaga ttttggctcc atgccctaaa	960
gagaaattgg ctttcagatt atttggatta aaaacaaaga ctttcttaag agatgtaaaa	1020
ttttcatgat gttttctttt ttgctaaaac taaagaatta ttcttttaca tttcagtttt	1080
tcttgatcat gaaaaagcca acaaaattct gaatcgcca aagaggtata attcaggtaa	1140
attggaagag tttgttcaag ggaatctaga gagagaatgt atggaagaaa agttagttt	1200
tgaagaagca cgagaagttt ttgaaaacac tgaaagaaca actgaatttt ggaagcagta	1260
tgttgatgga gatcagtgtg agtccaatcc atgtttaaat ggcggcagtt gcaaggatga	1320
cattaattcc tatgaatggt ggtgtccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga	1380

10

ES 2 900 425 T3

tgtaacatgt aacattaaga atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa	1440
caaggtgggt tgctcctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga	1500
accagcagtg ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agctcaccog	1560
tgctgagact gtttttcctg atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccatttt	1620
ggataacatc actcaaagca cccaatcatt taatgacttc actcgggttg ttggtggaga	1680
agatgccaaa ccaggtcaat tcccttggca ggttgttttg aatggtaaag ttgatgcatt	1740
ctgtggaggc tctatcgta atgaaaaatg gattgtaact gctgccact gtgttgaaac	1800
tggtgttaaa attacagttg tcgcaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga	1860
gcaaaagcga aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa	1920
gtacaaccat gacattgccc ttctggaact ggacgaaccc ttagtgctaa acagctacgt	1980
tacacctatt tgcattgctg acaaggaata cacgaacatc ttcctcaaat ttggatctgg	2040
ctatgtaagt ggctggggaa gagtcttcca caaagggaga tcagctttag ttcttcagta	2100
ccttagagtt ccacttggtg accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta	2160
taacaacatg ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag	2220
tgggggaccc catgttactg aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg	2280
gggtgaagag tgtgcaatga aaggcaaata tggaatatat accaaggtgt cccggtatgt	2340
caactggatt aaggaaaaaa caaagctcac tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc	2400
agctccggaa ctcttgggcg gaccgtcagt cttcctcttc ccccaaaaac ccaaggacac	2460
cctcatgatc tcccggaacc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga	2520
ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa	2580
gccgcgggag gagcagtaca acagcacgtg ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca	2640
ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc	2700
ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac	2760
cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtaa	2820
aggcttctat ccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa	2880
ctacaagacc acgcctcccg tggtggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct	2940
caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga	3000
ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgagaatt	3060
cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa	3120
aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca	3180
ataaacaagt tggggtgggc gaagaactcc agcatgagat ccccgcgctg gaggatcatc	3240

ES 2 900 425 T3

cagccggcgt	cccggaaaac	gattccgaag	cccaaccttt	catagaaggc	ggcggtgga	3300
tcgaaatctc	gtagcacgtg	tcagtcctgc	tcctcggcca	cgaagtgcac	gcagttgccg	3360
gccgggtcgc	gcagggcgaa	ctcccgcccc	cacgggtgct	cgcgatctc	ggtcgatggcc	3420
ggcccgagg	cgtcccgaa	gttcgtggac	acgacctccg	accactcggc	gtacagctcg	3480
tccaggccgc	gcacccacac	ccaggccagg	gtgttgctcg	gcaccacctg	gtcctggacc	3540
gcgctgatga	acagggtcac	gtcgtcccgg	accacaccgg	cgaagtgcgc	ctccacgaag	3600
tcccgggaga	acccgagccg	gtcgggtccg	aaactcgaccg	ctccggcgac	gtcgcgcgcg	3660
gtgagcaccg	gaacggcact	ggtcaacttg	gccatggttt	agttcctcac	cttgtcgtat	3720
tatactatgc	cgatatacta	tgccgatgat	taattgtcaa	cacgtgctga	tcagatccga	3780
aatggatat	acaagctccc	gggagctttt	tgcaaaagcc	taggcctcca	aaaaagcctc	3840
ctcactactt	ctggaatagc	tcaggagcag	aggcggcctc	ggcctctgca	taaataaaaa	3900
aaattagtca	gccatggggc	ggagaatggg	cggaaactggg	cggagttagg	ggcgggatgg	3960
gcggagttag	gggcgggact	atggttgctg	actaattgag	atgcatgctt	tgcatacttc	4020
tgctgctgg	ggagcctggg	gactttccac	acctggttgc	tgactaattg	agatgcatgc	4080
tttgcatact	tctgcctgct	ggggagcctg	gggactttcc	acacctcgt	cagctagct	4140
tcgtgaggct	ccggtgcccg	tcagtgggca	gagcgcacat	cgcacacagt	ccccgagaag	4200
ttggggggag	gggtcgga	ttgaaccggt	gcctagagaa	ggtggcgcg	ggtaaactgg	4260
gaaagtgatg	tcgtgtactg	gctccgcctt	tttcccagg	gtgggggaga	accgtatata	4320
agtgcagtag	tcgccgtgaa	cgttcttttt	cgcaacgggt	ttgccgccag	aacacaggt	4380
agtgcggtg	gtggttcccg	cgggcctggc	ctctttacgg	gttatggccc	ttgcgtgcct	4440
tgaattactt	ccacctggct	ccagtacgtg	attcttgatc	ccgagctgga	gccaggggcg	4500
ggccttgccg	tttaggagcc	ccttcgcctc	gtgcttgagt	tgaggcctgg	cctgggcgct	4560
ggggccgcgc	cgtgcgaatc	tgggtgcacc	ttcgcgcctg	tctcgtgct	ttcgataagt	4620
ctctagccat	ttaaaatttt	tgatgacctg	ctgcgacgct	ttttttctgg	caagatagtc	4680
ttgtaaatgc	gggccaggat	ctgcacactg	gtatttcggt	ttttggggcc	gcgggcggcg	4740
acggggcccg	tgcgctcccag	cgcacatgtt	cggcgaggcg	gggcctgcga	gcgcggccac	4800
cagagaatcgg	acgggggtag	tctcaagctg	gcgggcctgc	tctggtgcct	ggcctcgcgc	4860
cgcggtgat	cgcgccgccc	tgggcggcaa	ggctggcccg	gtcggcacca	gttgcgtag	4920
cggaaagatg	gccgcttccc	ggcctgctc	cagggggctc	aaaatggagg	acgcggcgct	4980
cgggagagcg	ggcgggtgag	tcacccacac	aaaggaaagg	ggcctttccg	tcctcagccg	5040
tcgcttcag	tgactccacg	gagtaccggg	cgcgctccag	gcacctcgat	tagttctgga	5100
gcttttgag	tacgtcgtct	ttaggttggg	gggaggggtt	ttatgcgatg	gagtttcccc	5160

ES 2 900 425 T3

acactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca cttgatgtaa ttctccttgg 5220
 aatttgccct ttttgagttt ggatcttggg tcattctcaa gcctcagaca gtggttcaaa 5280
 gtttttttct tccatttcag gtgtcgtgaa cacgtggtcg cggccgcgcc gccacatgg 5340
 agacagacac actcctgcta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc actggtgaca 5400
 aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggaggaccg tcagtcttcc 5460
 tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg 5520
 tgggtggtga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg 5580
 tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg 5640
 tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca 5700
 aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc 5760
 agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg cgatgagctg accaagaacc 5820
 aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg 5880
 agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgttg gactccgacg 5940
 gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg 6000
 tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct 6060
 ccctgtctcc gggtaaata ctcgagagat ctggccggct gggcccgttt cgaaggtaa 6120
 cctatcccta accctctcct cggctctgat tctacgcgta ccggtcatca tcaccatcac 6180
 cattgagttt aaaccgcctg atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt 6240
 gtttgccctt ccccgctgcc ttcttgacc ctggaagggt ccactccac tgtccttcc 6300
 taataaaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt 6360
 ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat 6420
 gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa agaaccagtg gcgtaatac ggttatccac 6480
 agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 6540
 ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cggccccctg acgagcatca 6600
 caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc 6660
 gtttccccct agaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata 6720
 cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta 6780
 tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccgctca 6840
 gcccgaccgc tgcgccttat ccggttaacta tcgtcttgag tccaaccccg taagacacga 6900
 cttatcgcca ctggcagcag cactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg 6960
 tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg 7020

tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg 7080
 caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 7140
 aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa 7200
 cgaaaactca cgtaagga ttttgggtcat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac 7260
 gagggccttt cgtctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct 7320
 cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg 7380
 cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat 7440
 tgtactgaga gtgcaccata tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa 7500
 taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcgggtg 7560
 cgggcctctt cgctattacg cca 7583

<210> 14

<211> 688

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena de FIX-Fc

<220>

<221> SEÑAL

10 <222> (1)..(46)

<223> Secuencia señal de aminoácidos

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (462)..(688)

15 <223> Parte Fc de FIX-Fc

<400> 14

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Ser Leu Ile Thr
 1 5 10 15

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

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
 35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
 50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
 65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln

ES 2 900 425 T3

85										90					95				
Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile				
			100					105					110						
Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys				
		115					120					125							
Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe				
	130					135					140								
Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly				
145					150					155					160				
Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	Pro	Phe				
				165					170					175					
Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala				
			180					185					190						
Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu				
		195					200					205							
Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe				
	210					215					220								
Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp				
225				230						235					240				
Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile				
				245					250					255					
Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Thr	Gly				
			260					265					270						
Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu				
		275					280					285							
His	Thr	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His	His	Asn				
	290					295					300								
Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Asn	Lys	Tyr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Glu				
305					310					315					320				
Leu	Asp	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	Asn	Ser	Tyr	Val	Thr	Pro	Ile	Cys	Ile				
				325					330					335					

ES 2 900 425 T3

Ala	Asp	Lys	Glu	Tyr	Thr	Asn	Ile	Phe	Leu	Lys	Phe	Gly	Ser	Gly	Tyr
			340				345						350		
Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Val	Phe	His	Lys	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Val
			355				360						365		
Leu	Gln	Tyr	Leu	Arg	Val	Pro	Leu	Val	Asp	Arg	Ala	Thr	Cys	Leu	Arg
			370				375						380		
Ser	Thr	Lys	Phe	Thr	Ile	Tyr	Asn	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Phe	His
			385				390						395		
Glu	Gly	Gly	Arg	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Val
						405						410			
Thr	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Ser	Phe	Leu	Thr	Gly	Ile	Ile	Ser	Trp	Gly
						420						425			
Glu	Glu	Cys	Ala	Met	Lys	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys	Val	Ser
						435						440			
Arg	Tyr	Val	Asn	Trp	Ile	Lys	Glu	Lys	Thr	Lys	Leu	Thr	Asp	Lys	Thr
						450						455			
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
						465						470			
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
						485						490			
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
						500						505			
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
						515						520			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
						530						535			
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
						545						550			
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
						565						570			
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
						580						585			

ES 2 900 425 T3

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
595 600 605

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
610 615 620

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
625 630 635 640

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
645 650 655

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
660 665 670

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675 680 685

<210> 15

<211> 2082

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de FVII-Fc de longitud completa

<220>

<221> péptido señal

10 <222> (1)..(180)

<223> Péptido señal de FVIII

<220>

<221> péptido señal

<222> (1)..(180)

15 <223> Péptido señal de FVII

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (1402)..(2082)

<223> Región Fc

<400> 15

atggtctccc aggccctcag gtcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcaggcgggg tcgctaaggc ctcaggagga gaaacacggg acatgccgtg gaagccgggg 120

cctcacagag tcttcgtaac ccaggaggaa gccacacggc tcctgcaccg gcgccggcgc 180

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggccg ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 240

cagtgtcct tcgaggaggc ccgggagatc ttcaaggacg cggagaggac gaagctgttc 300

tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 360

20 tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac 420

tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatac tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 480
tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 540
ctggcagacg ggggtgcctg cacaccaca gttgaatatc catgtggaaa aatacctatt 600
ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 660
aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 720
accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 780
tggaggaacc tgatcgcggt gctgggcgag cagcacctca gcgagcacga cggggatgag 840
cagagccggc ggggtggcga ggtcatcatc ccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 900
cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tctactgacca tgtggtgccc 960
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg 1020
gtcagcggtt ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggctctc 1080
aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaagggt gggagactcc 1140
ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1200
aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1260
atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttgggggtga caccagggtc 1320
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc 1380
ctgcgagccc catttcctta ggacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agctccagaa 1440
ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgac 1500
tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1560
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1620
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1680
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctccagc ccccatcgag 1740
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1800
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 1860
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1920
acgcctcccg tgttggaact cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1980
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctcgg tgatgcatga ggctctgcac 2040
aaccactaca cgagaagag cctctccctg tctccgggta aa 2082

<210> 16

<211> 693

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena de FVII-Fc

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(60)

<223> Secuencia señal

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (467)..(693)

<223> Región Fc

<400> 16

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
 20 25 30

Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
 35 40 45

Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
 50 55 60

Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
 65 70 75 80

Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
 85 90 95

Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
 100 105 110

Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
 115 120 125

Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
 130 135 140

Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
 145 150 155 160

Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
 165 170 175

Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
 180 185 190

ES 2 900 425 T3

Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	195	200	205
Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	210	215	220
Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	225	230	235
Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	245	250	255
Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	260	265	270
Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	275	280	285
Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	290	295	300
Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro	305	310	315
Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	325	330	335
Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	340	345	350
Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	355	360	365
Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	370	375	380
Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys	385	390	395
Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp	405	410	415
Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly	420	425	430
His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln	435	440	445

ES 2 900 425 T3

Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
 450 455 460
 Phe Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 465 470 475 480
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 485 490 495
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 500 505 510
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 515 520 525
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 530 535 540
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 545 550 555 560
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 565 570 575
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 580 585 590
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 595 600 605
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 610 615 620
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 625 630 635 640
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 645 650 655
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 660 665 670
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 675 680 685

Leu Ser Pro Gly Lys

690

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de PAS

<400> 17
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15

 Ser Ala Pro Ala
 20
 <210> 18
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de PAS
 <400> 18
 Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15

 Ala Ala Pro Ser
 20
 10 <210> 19
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de PAS
 <400> 19
 Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala
 1 5 10 15

 Ser Pro Ser Ser
 20
 20 <210> 20
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de PAS
 25 <400> 20
 Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala
 1 5 10 15

 Ser Pro Ser
 <210> 21
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de PAS
 <400> 21
 Ser Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ala Ser Pro Ser Pro
 1 5 10 15

 Ser Ser Pro Ala
 20
 35 <210> 22

<211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Secuencia de PAS
 <400> 22
 Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro
 1 5 10 15

 Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala
 20
 <210> 23
 <211> 20
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de PAS
 <400> 23
 Ala Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Pro
 1 5 10 15

 15 Ser Ala Ala Ala

REIVINDICACIONES

1. Un método de inactivación de virus presente durante la producción de un polipéptido de interés, que comprende:
 - (a) unir el polipéptido a una matriz de cromatografía de afinidad o una matriz de cromatografía de modo mixto, y
 - (b) realizar una etapa de inactivación vírica lavando la matriz de cromatografía unida al polipéptido con una solución de lavado a pH de menos de aproximadamente 4,0,
- en el que la solución de lavado comprende una concentración suficiente de una sal para reducir sustancialmente la elución del polipéptido durante la etapa de inactivación vírica, en el que la concentración de la sal es de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 4,0 M.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la matriz de cromatografía de afinidad es una columna de proteína A.
3. El método de la reivindicación 2, en el que la columna de proteína A comprende un ligando de proteína A que se inmoviliza en una matriz seleccionada del grupo que consiste en matriz basada en dextrano, matriz basada en agarosa, matriz basada en poliestireno, matriz hidrófila basada en polivinil etilo, matriz rígida basada en polimetacrilato, matriz porosa basada en polímero, matriz de poro controlado basada en vidrio y cualquier combinación de las mismas.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la matriz de cromatografía de modo mixto se selecciona del grupo que consiste en matriz basada en dextrano, matriz basada en agarosa, matriz basada en poliestireno, matriz basada en polímero hidrófilo de polivinil etilo, matriz basada en polímero macroporoso altamente reticulado, matriz basada en hidroxiapatita ((Ca₅(PO₄)₃OH)₂), matriz basada en fluoroapatita ((Ca₅(PO₄)₃F)₂) y cualquier combinación de las mismas.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el pH de la solución de lavado es de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,0 y en el que la sal es una sal de amonio.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el pH de la solución de lavado es de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,0 y en el que la sal es una sal de potasio.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el pH de la solución de lavado es de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,5 y en el que la sal es sulfato de amonio.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el pH de la solución de lavado es de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,5 y en el que la sal es cloruro de sodio.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la concentración de la sal es de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 2,5 M.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la concentración de la sal es de aproximadamente 2,5 M a aproximadamente 3,0 M.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el método comprende múltiples etapas de inactivación vírica.
12. El método de la reivindicación 11, en el que las múltiples etapas de inactivación vírica usan soluciones de lavado idénticas o diferentes.
13. El método de la reivindicación 12, en el que al menos una de las soluciones de lavado comprende un detergente.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el polipéptido se une a la matriz de cromatografía de afinidad o la matriz de cromatografía de modo mixto a un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el método comprende además eluir el polipéptido de la matriz de cromatografía de afinidad o la matriz de cromatografía de modo mixto con una solución de elución, opcionalmente en el que al menos un 70 % del polipéptido se recupera en la solución de elución.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el polipéptido comprende un factor de coagulación.
17. El método de la reivindicación 16, en el que el factor de coagulación es factor XI (FXI).
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el polipéptido comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

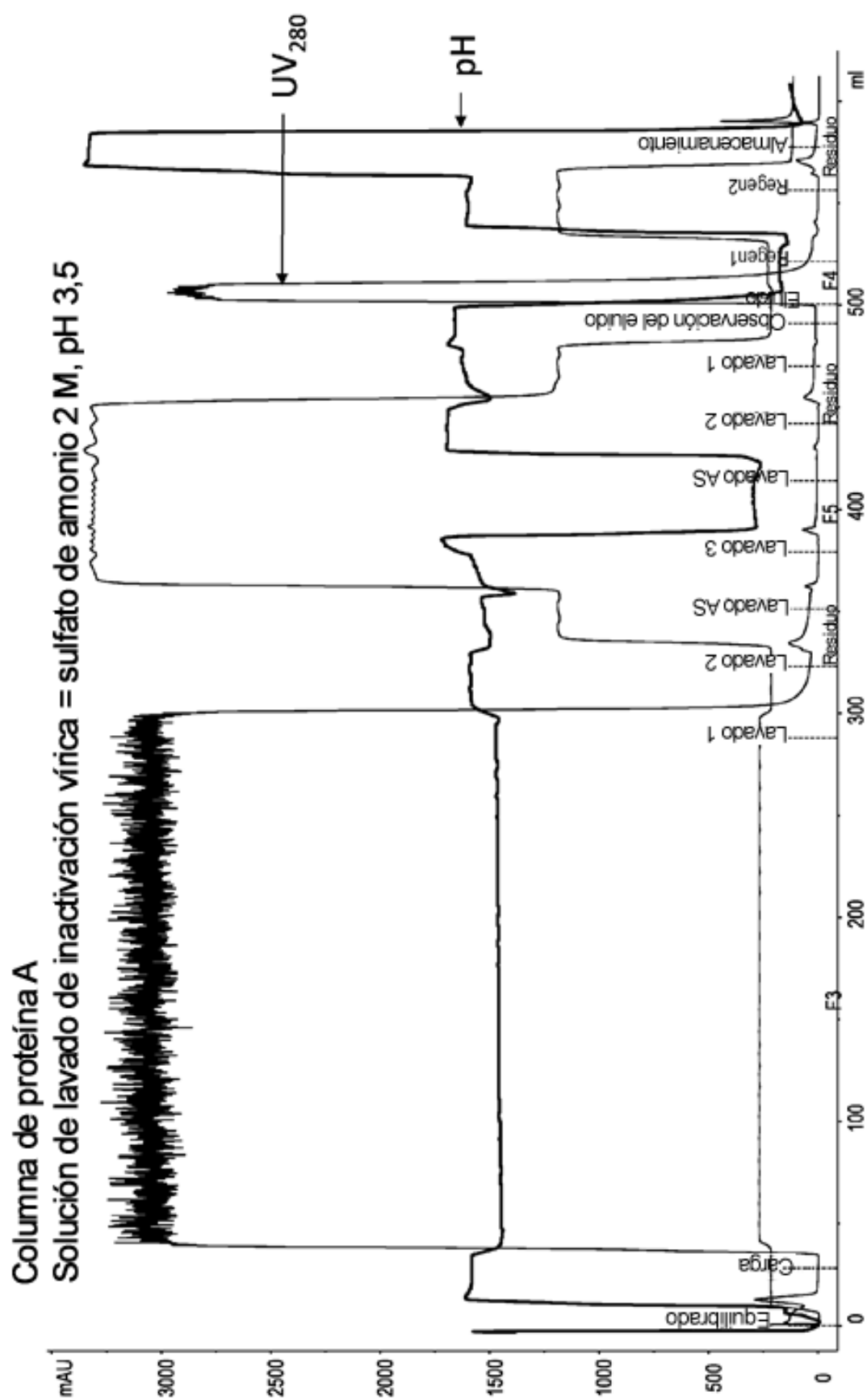
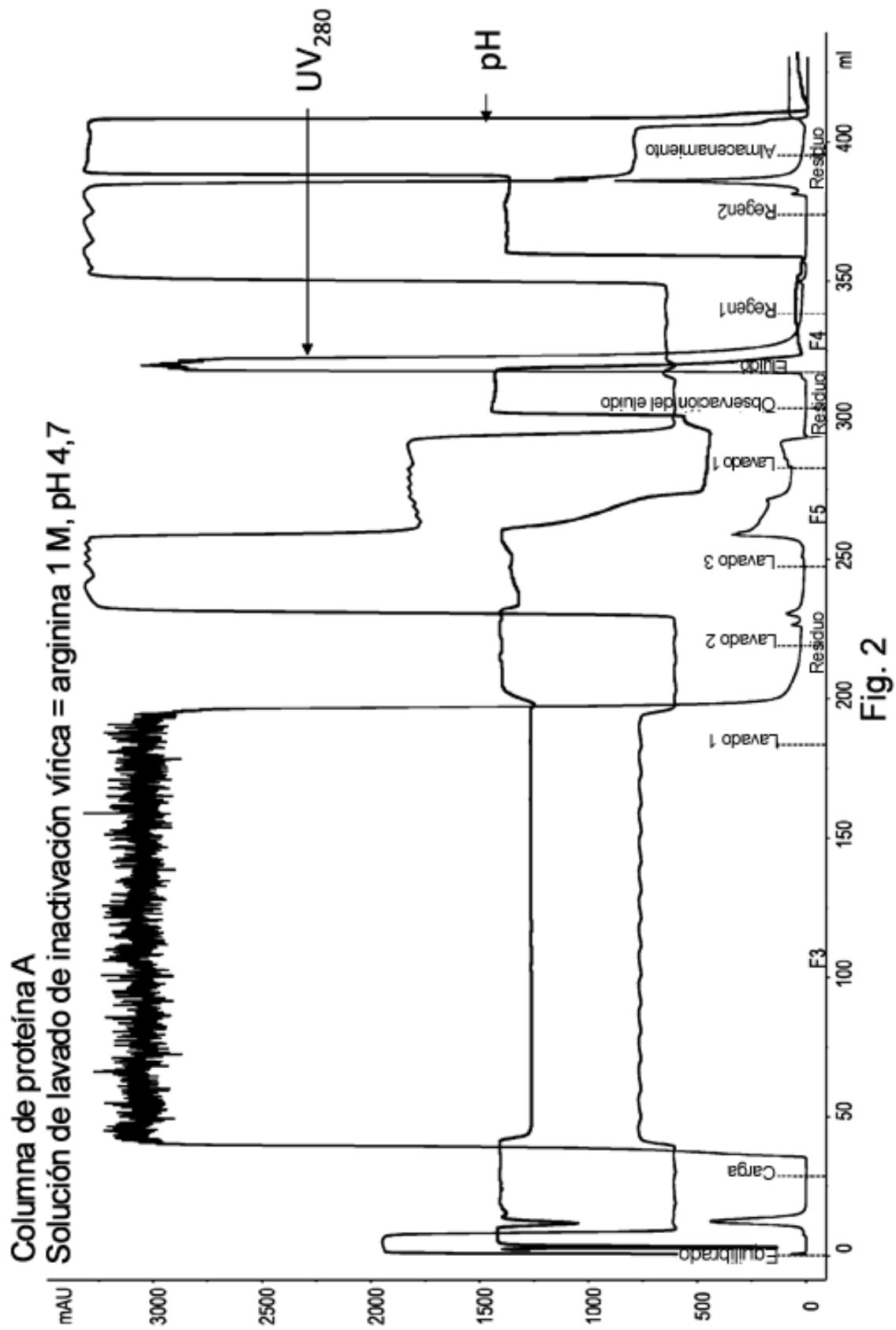
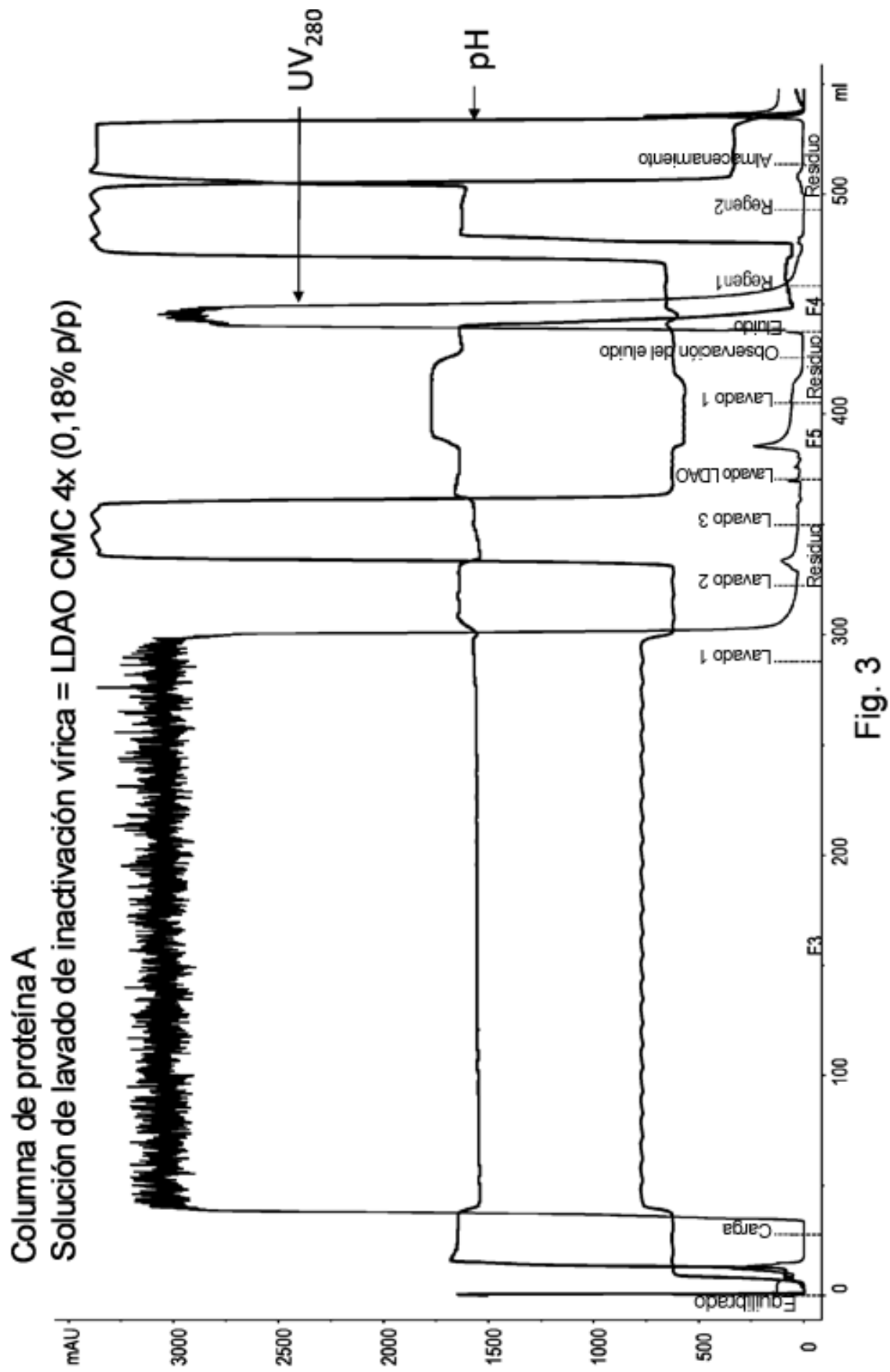
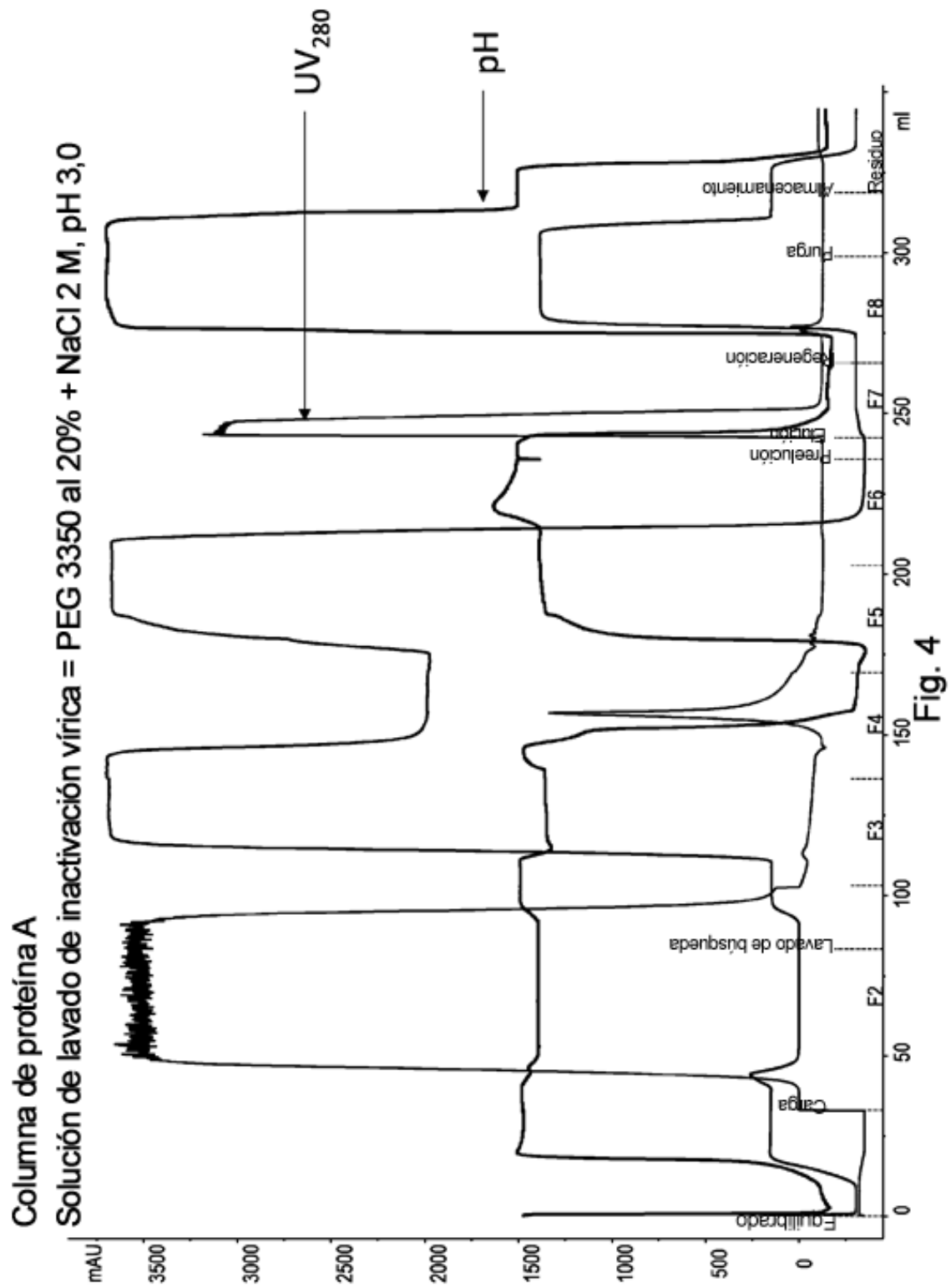
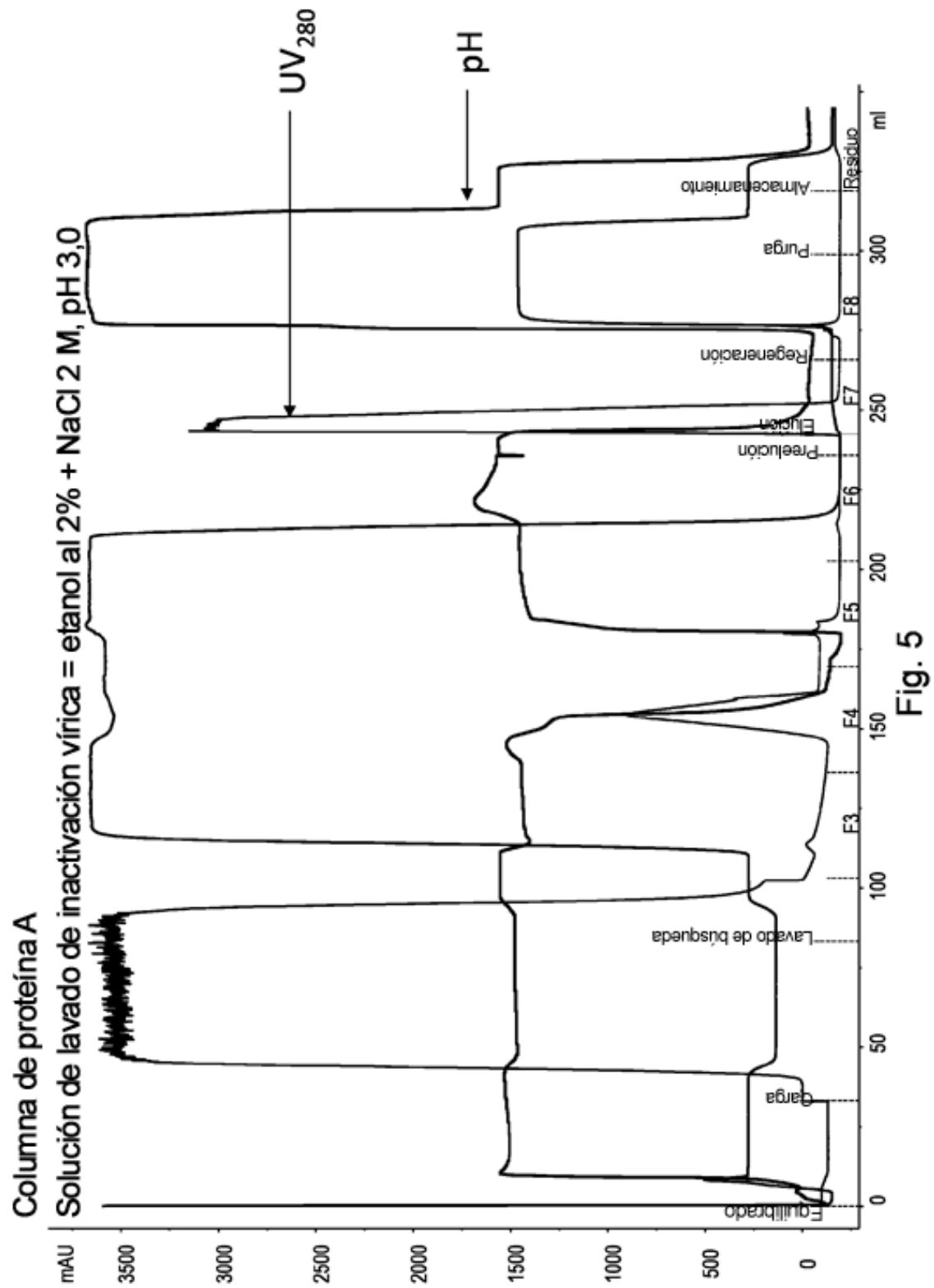


Fig. 1









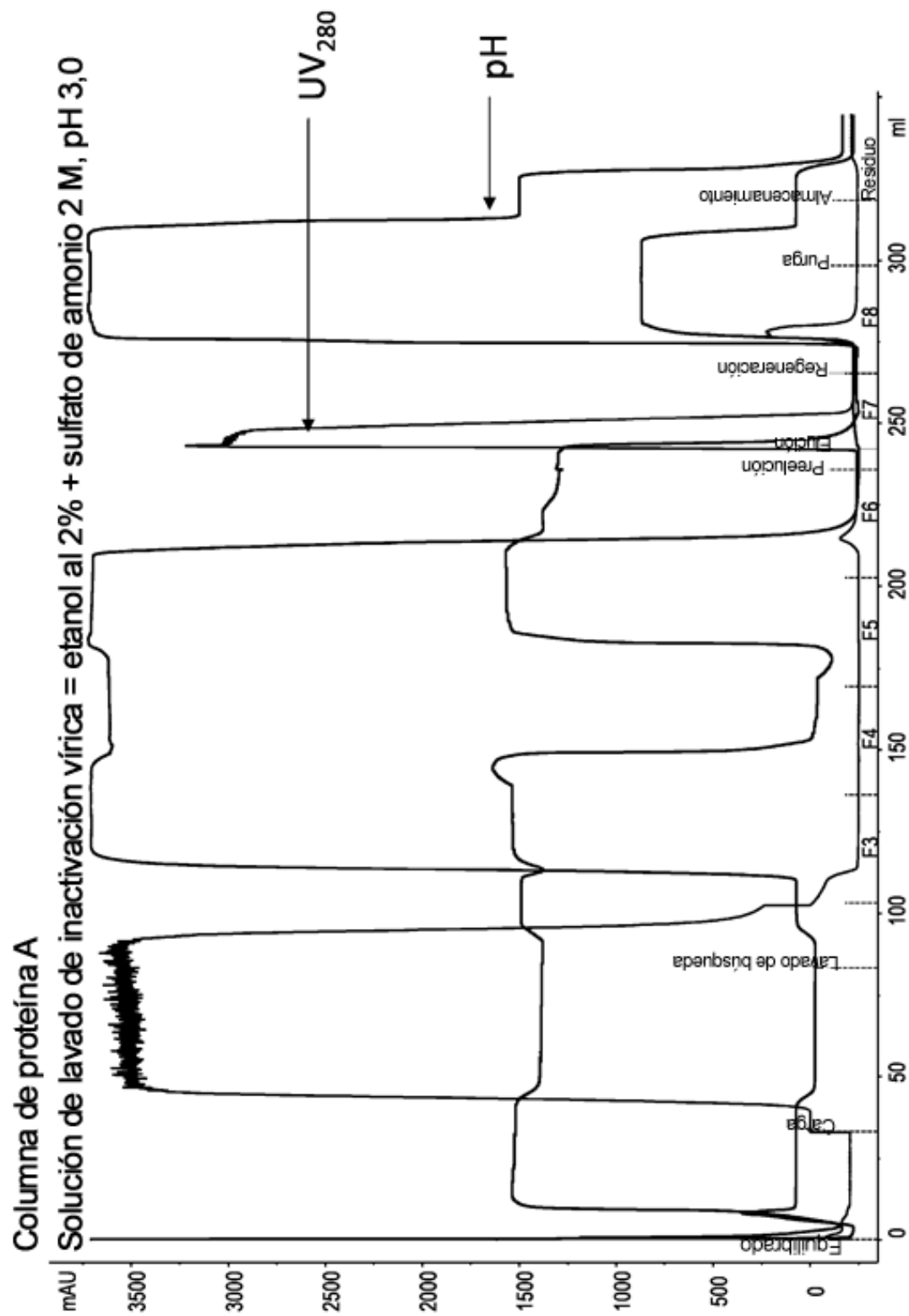
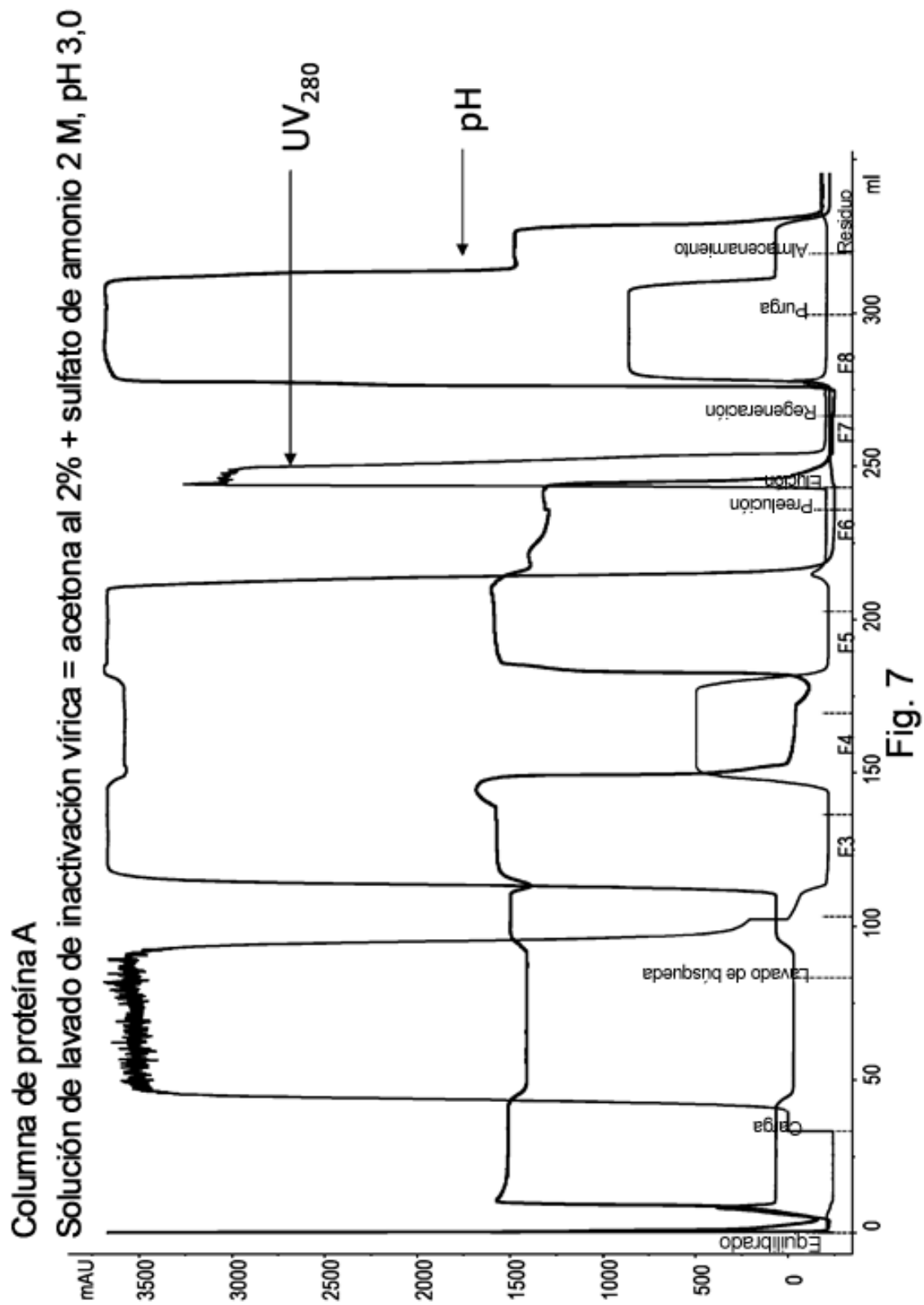


Fig. 6



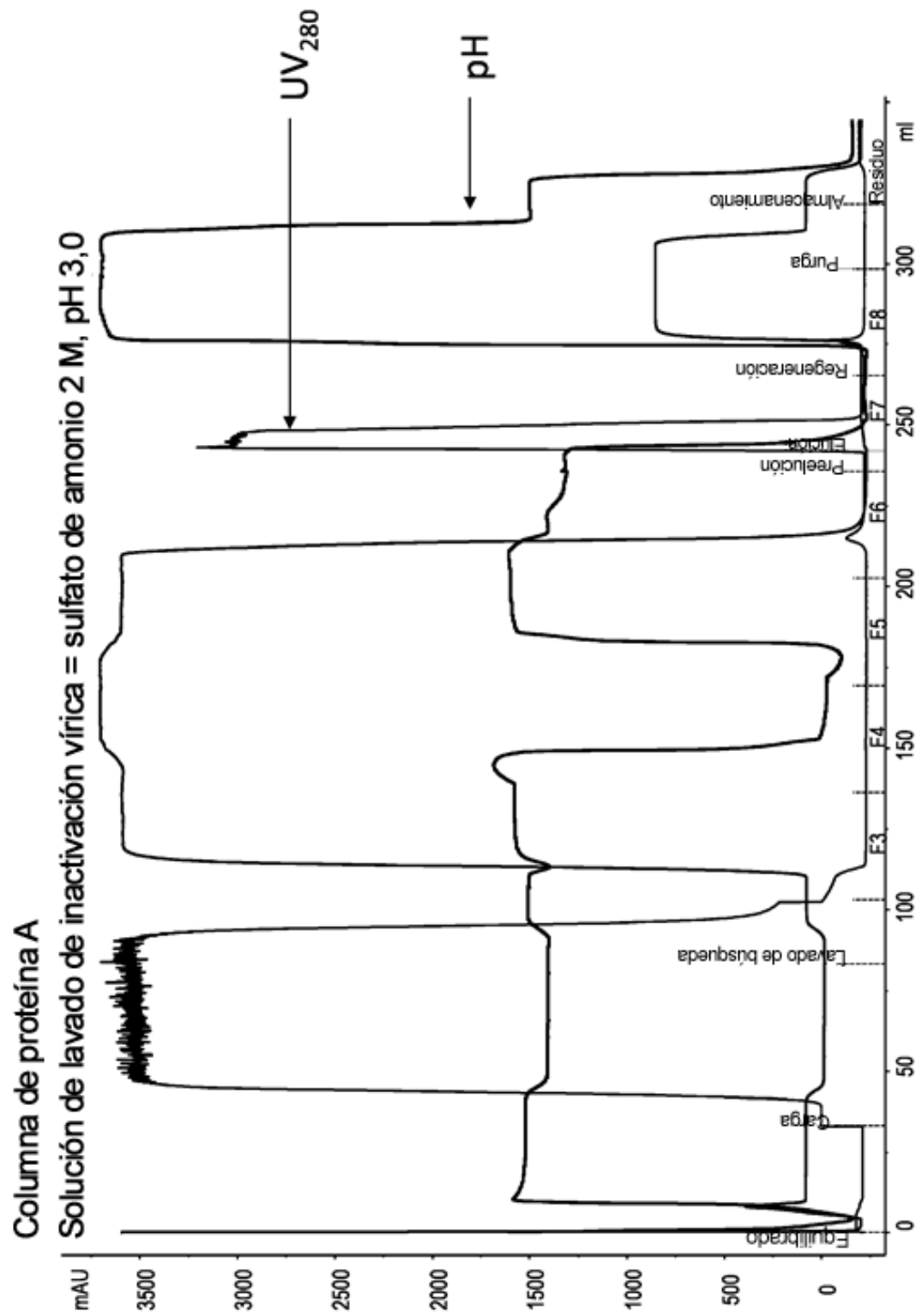
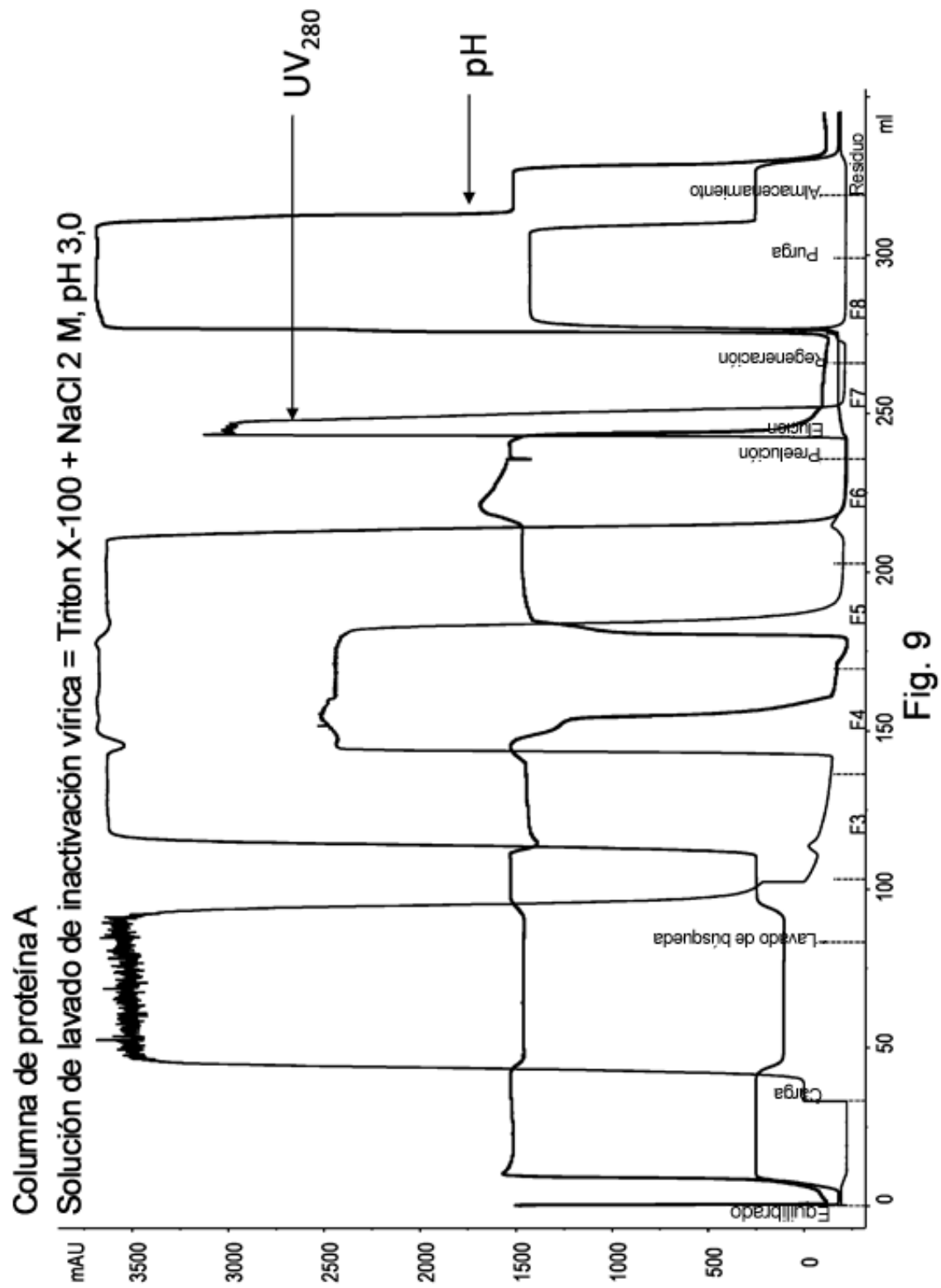
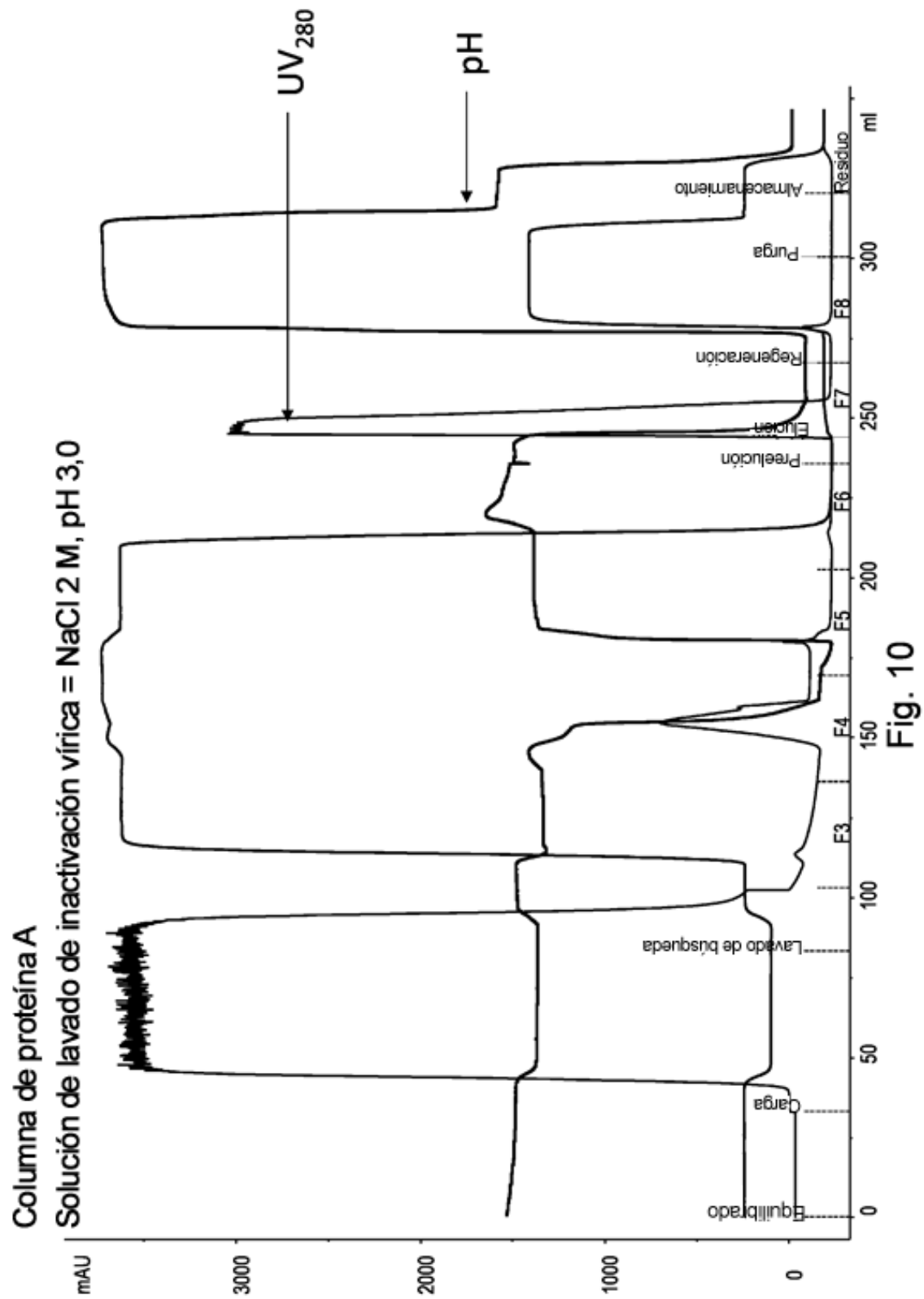
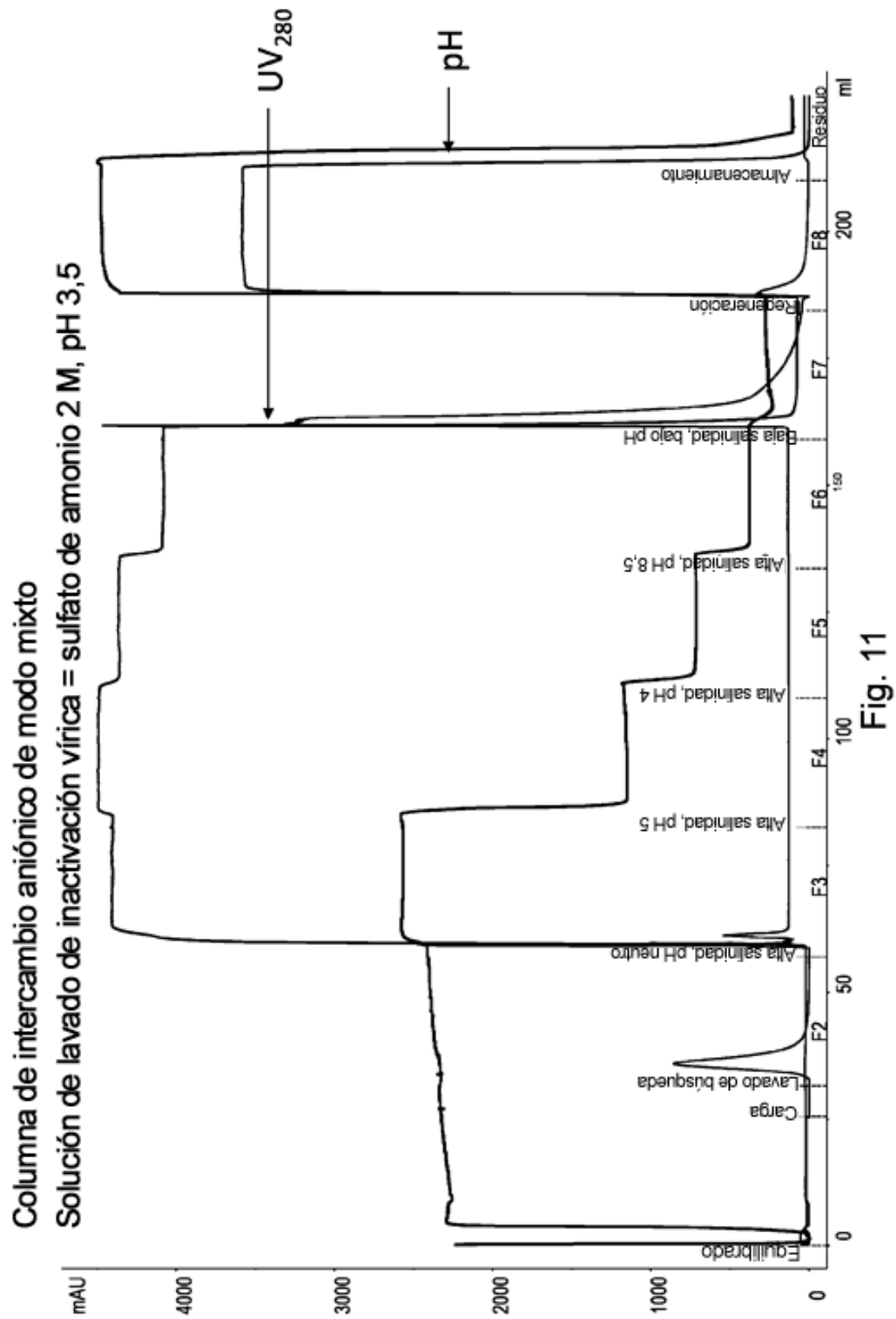
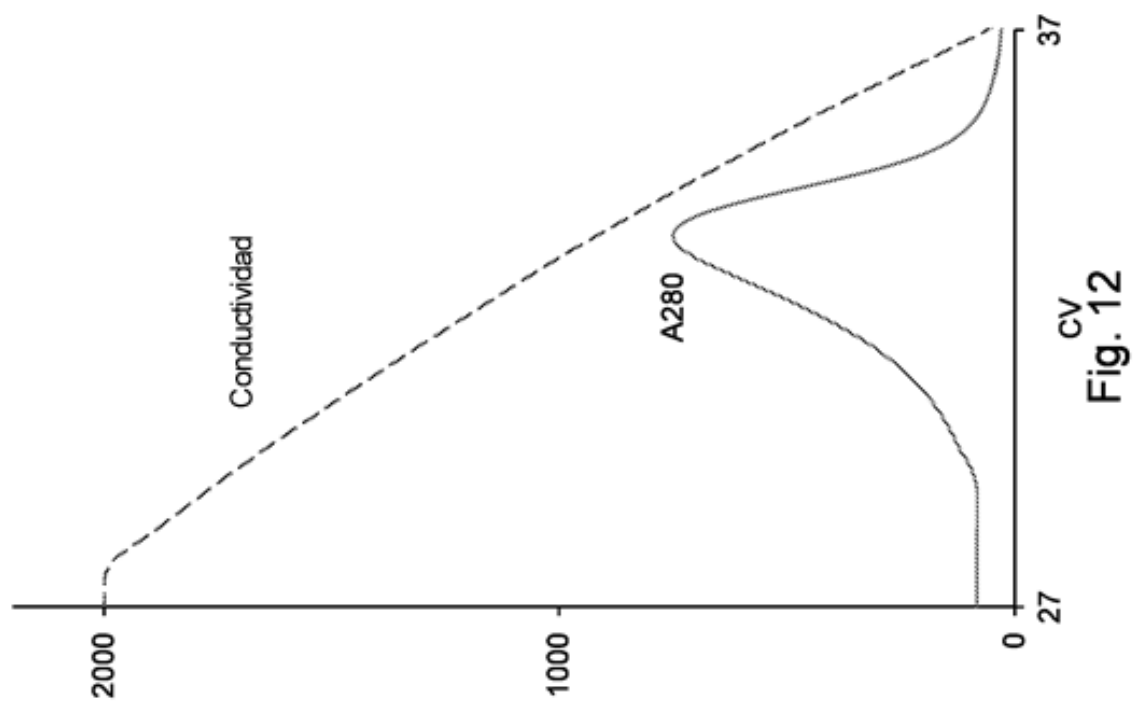


Fig. 8









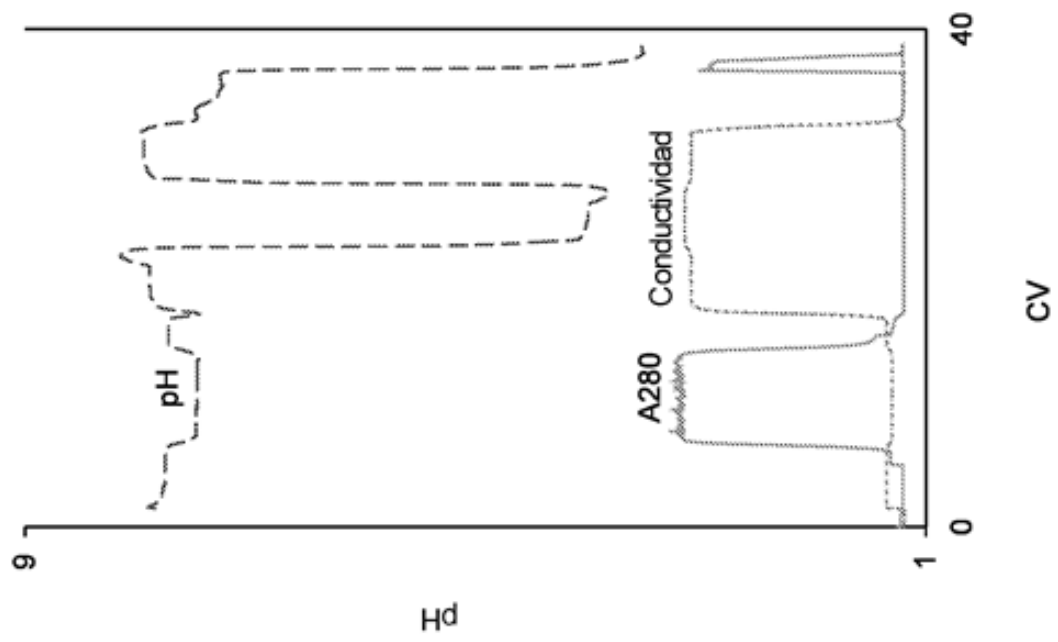


Fig. 13

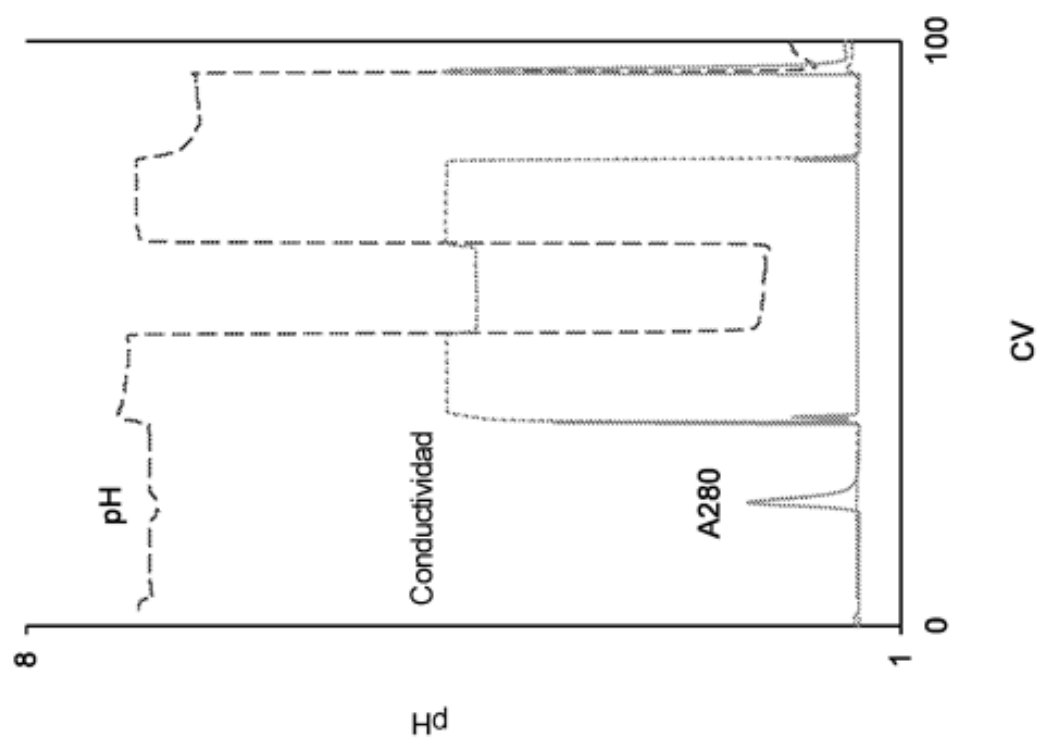


Fig. 14

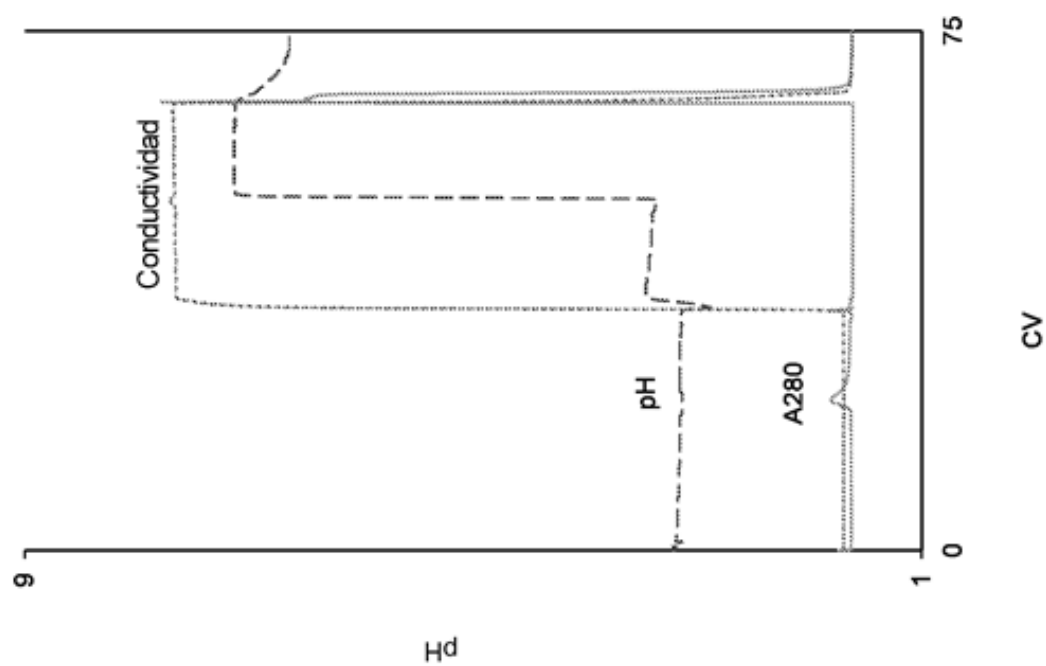


Fig. 15