



**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112015000267-6 B1**

**(22) Data do Depósito:** 10/07/2013

**(45) Data de Concessão:** 24/01/2023

**(54) Título:** PROTEÍNAS QUIMÉRICAS, E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

**(51) Int.Cl.:** A61K 38/37; C12N 15/00; C12P 21/08.

**(30) Prioridade Unionista:** 01/02/2013 US 61/759,819; 11/07/2012 US 61/670,401; 15/03/2013 US 61/801,504; 15/03/2013 US 61/801,544; 24/05/2013 US 61/827,158; (...).

**(73) Titular(es):** BIOVERATIV THERAPEUTICS INC.; AMUNIX OPERATING INC..

**(72) Inventor(es):** EKTA SETH CHHABRA; TONGYAO LIU; PEI-YUN CHANG; ROBERT T. PETERS; JOHN KULMAN.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2013049989 de 10/07/2013

**(87) Publicação PCT:** WO 2014/011819 de 16/01/2014

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 07/01/2015

**(57) Resumo:** PROTEÍNA QUIMÉRICA, POLINUCLEOTÍDEO OU UM CONJUNTO DE POLINUCLEOTÍDEOS, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DOS MESMOS E MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA. A presente invenção refere-se a uma proteína quimérica que compreende uma proteína de VWF compreendendo domínio D e domínio D3 de VWF, uma ou mais sequências XTEN, e uma proteína FVIII, em que o fragmento VWF, a sequência XTEN, ou a proteína de FVIII são ligados a ou associados com cada outro. A proteína quimérica compreende uma ou mais região de Ig ou uma porção da mesma (por exemplo, uma região Fc). Uma cadeia de polipeptídeos compreendendo um fragmento VWF da invenção se liga a ou está associado com uma cadeia de polipeptídeos compreendendo uma proteína FVIII ligada a uma sequência XTEN e uma cadeia de polipeptídeo compreendendo o fragmento de VWF pode prevenir ou inibir a ligação de VWF endógeno para a proteína FVIII ligada à sequência XTEN. Prevenir ou inibir a ligação de VWF endógeno à proteína FVIII, que é um fator de limitante de meia-vida para FVIII, o fragmento VWF pode induzir a extensão da meia-vida da proteína quimérica compreendendo uma proteína FVIII. A invenção ainda inclui nucleotídeos, vetores, células (...).

## **"PROTEÍNAS QUIMÉRICAS, E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA".**

### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0001] A hemofilia A é uma doença hemorrágica causada por defeitos no gene que codifica o fator de coagulação VIII (FVIII) e afeta 1-2 em cada 10.000 nascimentos do sexo masculino. Graw et al, Nat. Rev. Genet. 6 (6): 488-501 (2005). Os pacientes afetados com hemofilia A podem ser tratados com infusão de Fator VIII produzida de forma recombinante ou purificada. Todos os produtos do FVIII comercialmente disponíveis, contudo, são conhecidos por terem uma meia-vida de cerca de 8-12 horas, e requerem a administração intravenosa frequente para os pacientes. Veja Weiner M.A. e Cairo, M.S., Pediatric Hematology Secrets, Lee, M.T., 12. Disorders of Coagulation, Elsevier Health Sciences, 2001; Lillicrap, D., Thromb. Res. 122 Suppl 4: S2-8 (2008). Além disso, certo número de abordagens tem sido tentada a fim de prolongar a meia-vida do FVIII. Por exemplo, as abordagens em desenvolvimento para prolongar a meia-vida de fatores de coagulação incluem a peguilação, glicopeguilação, e conjugação com albumina. Ver Dumont et al., Blood. 119 (13): 3024-3030 (Publicado on-line 13 de janeiro de 2012). Independentemente da engenharia de proteínas utilizada, no entanto, os produtos de ação estendida do FVIII atualmente em desenvolvimento são referidos como tendo meias-vidas limitadas - apenas de cerca de 1,5 a 2 horas em modelos animais pré-clínicos. Veja id. Resultados consistentes foram demonstrados em humanos, por exemplo, rFVIII-Fc foi relatado para melhorar meia-vida até ~ 1,7 vezes, em comparação com ADVATE® em pacientes com hemofilia A. Veja *Id.* Portanto, a meia-vida aumenta, apesar de pequenas melhorias, pode indicar a presença de outros fatores limitantes de T<sub>1/2</sub>. Veja Liu, T. et al, 2007 ISTH meeting, abstract #P-M-035; Henrik, A. et al, 2011 ISTH meeting, abstract #P=MO-181; Liu, T. et al, 2011 ISTH

meeting abstract#P-WE-131.

[0002] Fator de von Willebrand (VWF) plasmático tem uma meia-vida de aproximadamente 12 horas (variando de 9 a 15 horas). [http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd/2\\_scientificoverview.htm](http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd/2_scientificoverview.htm) (última visita 22 de outubro de 2011). A meia-vida de VWF pode ser afetada por um número de fatores: padrão de glicosilação, ADAMTS-13 (uma desintegrina e metaloprotease com motif-13 de trombospondina), e várias mutações em VWF.

[0003] No plasma, 95-98% do FVIII circula em um complexo não covalente justo com VWF de comprimento completo. A formação deste complexo é importante para a manutenção de níveis plasmáticos adequados do FVIII in vivo. Lenting et al., Blood. 92 (11): 3983-96 (1998); Lenting et al., J. Thromb.Haemost. 5 (7): 1353-1360 (2007). O FVIII de comprimento completo tipo selvagem está presente principalmente como um heterodímero possuindo uma cadeia pesada (MW 200 kD) e uma cadeia leve (MW 73kD). Quando o FVIII é ativado devido à proteólise nas posições 372 e 740 na cadeia pesada e na posição 1689 na cadeia leve, o VWF ligado a FVIII é removido a partir do FVIII ativado. O FVIII ativado, juntamente com o Fator IX ativado, cálcio e fosfolípido ("complexo tenase"), provoca a ativação do fator X, gerando grandes quantidades de trombina. A trombina, por sua vez, em seguida, cliva o fibrinogênio para formar monômeros de fibrina solúveis que então se polimerizam espontaneamente para formar o polímero de fibrina solúvel. A trombina ativa também o fator XIII, o qual, juntamente com o cálcio, serve para reticular e estabilizar o polímero de fibrina solúvel, formando fibrina reticulada (insolúvel). O FVIII ativado é eliminado rápido da circulação por proteólise.

[0004] Devido às doses frequentes e inconvenientes causadas pelo cronograma de dosagem, existe ainda uma necessidade para desenvolver produtos do FVIII que requeiram a administração menos fre-

quente, ou seja, um produto do FVIII que tenha uma meia-vida mais longa do que a limitação de 1,5 a 2 vezes da meia-vida.

#### BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0005] A presente invenção é dirigida a uma proteína quimérica compreendendo (i) um fragmento de Fator de von Willebrand (VWF) compreendendo o domínio D' e o domínio D3 de VWF, (ii) uma sequência de XTEN, e (iii) uma proteína FVIII, em que o fragmento de VWF e a sequência XTEN estão ligados por um ligante opcional, e em que o fragmento de VWF ou a sequência XTEN estão ligados ou associados com a proteína FVIII. A proteína quimérica pode compreender uma única cadeia de polipeptídeos compreendendo o fragmento de VWF, a sequência XTEN, e a proteína FVIII, ou duas cadeias de polipeptídeos, uma primeira cadeia que compreende o fragmento de VWF e a segunda cadeia compreendendo a proteína FVIII, em que o polipeptídeo XTEN está ligado ao VWF ou ao fragmento da proteína FVIII.

[0006] Em uma modalidade, a proteína quimérica da invenção compreende uma fórmula compreendendo:

- (a) V-X-FVIII,
- (b) FVIII-X-V,
- (c) V-X:FVIII,
- (d) X-V:FVIII,
- (e) FVIII:V-X, ou
- (f) FVIII:X-V

em que V compreende um fragmento de VWF,

X compreende uma ou mais sequências de XTEN, e

FVIII compreende uma proteína FVIII. O hífen (-) pode ser uma ligação peptídica ou um ligante, por exemplo, um ligante clivável, enquanto os dois pontos (:) representam uma associação química ou uma associação física entre os polipeptídeos, por exemplo, uma liga-



ção covalente ou ligação não covalente.

[0007] Em outra modalidade, a proteína quimérica compreende ainda: (iv) uma região constante de imunoglobulina (Ig) ou uma fração da mesma (também indicado como F1 ou uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma), ligada ao fragmento de VWF, a sequência XTEN, a proteína FVIII, ou quaisquer combinações dos mesmos. Em outras modalidades, a proteína quimérica compreende ainda uma região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma (também indicado como F2 ou uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma). A primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma pode ser ligada ao fragmento de VWF ou a sequência XTEN, e a segunda região constante de Ig pode ser ligada à proteína FVIII. A primeira região constante de Ig, a segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma, ou ambas, podem prolongar a meia-vida da proteína FVIII.

[0008] Em algumas modalidades, a segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma (F2) é ligada ao fragmento de VWF por um ligante, por exemplo, um ligante processável. Em outras modalidades, a segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma (F2) é associada com a (primeira) região constante de Ig ou uma fração da mesma (F1). A segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma (F2) e a primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma (F1) podem ser idênticas ou diferentes. A segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma pode ser associada com a região constante de Ig ou uma fração da mesma por uma ligação covalente, por exemplo, uma ligação dissulfeto. O fragmento de VWF ligado à primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma também pode estar associada com a proteína FVIII ligada à segunda região Fc por uma ligação não covalente. Em certas modalidades, a proteína FVIII pode ainda compreender uma ou mais sequências adi-

cionais XTEN que estão ligadas ao C-terminal ou N-terminal da proteína FVIII ou inseridas imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos na proteína FVIII (por exemplo, um ou mais sítios de inserção XTEN). Em algumas modalidades, a meia-vida da proteína FVIII é estendida, em comparação com a de tipo selvagem do FVIII ou uma proteína FVIII, sem o fragmento de VWF.

[0009] Em algumas modalidades, a proteína quimérica compreende uma fórmula compreendendo:

- (g) V-L2-X-L1-F1: FVIII-L3-F2;
- (h) V-L2-X-L1-F1:F2-L3-FVIII;
- (i) F1-L1-X-L2-V: FVIII-L3-F2;
- (j) F1-L1-X-L2-V:F2-L3-FVIII;
- (k) V-L2-X-L1-F1-L4-FVIII-L3-F2;
- (l) F2-L3-FVIII-L4-F1-L1-X-L2-V;
- (m) FVIII-L3-F2-L4-V-L2-X-L1-F1; e
- (n) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L3-FVIII,

em que V compreende um fragmento de VWF,

cada um de L1, L2, e L3 compreende um ligante opcional, por exemplo, um ligante clivável,

L4 é um ligante opcional, por exemplo, um ligante processável

FVIII compreende uma proteína FVIII,

X compreende uma ou mais sequências de XTEN,

F1 compreende uma primeira região constante de Ig opcional ou uma fração da mesma,

F2 compreende uma segunda região constante de Ig opcional ou uma fração da mesma, e

(:) é uma ligação covalente ou ligação não covalente.

[00010] A presente invenção também é dirigida a uma proteína quimérica compreendendo (i) uma proteína FVIII, (ii) uma sequência

de XTEN, e (iii) uma região constante de Ig ou uma fração da mesma, em que a sequência XTEN está ligada à proteína FVIII por um ligante opcional no N-terminal ou no C-terminal da proteína FVIII ou inserida imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos na proteína FVIII (por exemplo, um ou mais sítios de inserção) e em que a região constante de Ig ou uma fração da mesma está ligada ou associada com a proteína FVIII ou a sequência XTEN. Em uma modalidade, a região constante de Ig ou uma fração da mesma útil para a proteína quimérica compreende uma primeira região Fc. Em outra modalidade, a proteína quimérica compreende ainda uma região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma. A região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma útil para a invenção pode compreender uma segunda região Fc, que está ligada a ou associada com a primeira região Fc, por exemplo, por uma ligação covalente. Em outras modalidades, a primeira região Fc está ligada a segunda região Fc por um ligante, por exemplo, um ligante processável.

[00011] Em outros aspectos, uma proteína quimérica que compreende (i) uma proteína FVIII, (ii) uma sequência XTEN, (iii) um fragmento de VWF, e (iv) uma região constante de Ig ou uma fração da mesma, que compreende o domínio D' e o domínio D3 de VWF, em que a sequência XTEN está ligada à proteína FVIII por um ligante opcional no N-terminal ou no C-terminal da proteína FVIII ou inserida imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos na proteína FVIII (por exemplo, um ou mais sítios de inserção), o fragmento de VWF está ligado ou associado com a proteína FVIII ou a sequência XTEN, e a região constante de Ig ou uma fração da mesma está ligada à proteína FVIII, a sequência XTEN, o fragmento de VWF, ou quaisquer combinações dos mesmos. Exemplos das proteínas quiméricas não limitantes podem compreender uma fórmula, a qual compreende:

(1) FVIII(X1)-L1-F1:V-L2-X2-L3-F2;

- (2) FVIII(X1)-L1-F1:F2-L3-X2-L2-V;
- (3) F1-L1-FVIII(X1): V-L2-X2-L3-F2;
- (4) F1-L1-FVIII(X1); F2-L3-X2-L2-V;
- (5) FVIII(X1)-L1-F1-L4-V-L2-X2-L3-F2;
- (6) FVIII(X1)-L1-F1-L4-F2-L3-X2-L2-V;
- (7) F1-L1-FVIII(X1)-L4- V-L2-X2-L3-F2, ou
- (8) F1-L1-FVIII(X1)-L4- F2-L3-X2-L2-V,

em que o FVIII(X1) compreende uma proteína FVIII e uma ou mais sequências de XTEN, em que uma ou mais das sequências XTEN estão ligadas ao N-terminal ou C-terminal da proteína FVIII ou inseridas imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos na proteína FVIII (por exemplo, um ou mais sítios de inserção XTEN);

cada um de L1, L2, ou L3 compreende um ligante opcional, por exemplo, um ligante clivável;

L4 é um ligante, um ligante processável;

X2 compreende uma ou mais sequências de XTEN;

F1 compreende uma região constante de Ig ou uma fração da mesma;

F2 compreende uma região constante de Ig opcional adicional ou uma fração da mesma, e

V compreende um fragmento do VWF;

(-) é uma ligação peptídica ou um ou mais aminoácidos; e

(:) compreende uma ligação covalente ou uma ligação não covalente.

[00012] Um aspecto da invenção é que o fragmento de VWF útil para a proteína quimérica não se liga a um receptor de eliminação de VWF, que impede ou inibe a interação da proteína FVIII com VWF endógeno. A proteína quimérica compreendendo o fragmento de VWF assim reduziu a eliminação ou não é eliminada através de uma via de eliminação de VWF. Outro aspecto da invenção é que o fragmento de

VWF é capaz de proteger a proteína FVIII a partir de uma ou mais clivagens da protease, protegendo a proteína FVIII da ativação, estabilizando a cadeia pesada e/ou da cadeia leve da proteína FVIII, ou prevenindo a eliminação da proteína FVIII por um ou mais receptores limpaadores.

[00013] Devido à capacidade do fragmento de VWF para prevenir ou inibir a interação entre a proteína FVIII e VWF endógeno, a meia-vida da proteína FVIII é estendida em comparação com uma proteína FVIII sem o fragmento de VWF. Em uma modalidade, a meia-vida da proteína FVIII é estendida pelo menos cerca de 1,5 vezes, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 2,5 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 6 vezes, pelo menos cerca de 7 vezes, pelo menos cerca de 8 vezes, pelo menos cerca de 9 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 11 vezes, ou pelo menos cerca de 12 vezes maior do que o tipo selvagem do FVIII. Em outra modalidade, a meia-vida da proteína FVIII é pelo menos cerca de 10 horas, pelo menos cerca de 11 horas, pelo menos cerca de 12 horas, pelo menos cerca de 13 horas, pelo menos cerca de 14 horas, pelo menos cerca de 15 horas, pelo menos cerca de 16 horas, pelo menos cerca de 17 horas, pelo menos cerca de 18 horas, pelo menos cerca de 19 horas, pelo menos cerca de 20 horas, pelo menos cerca de 21 horas, pelo menos cerca de 22 horas, pelo menos cerca de 23 horas, pelo menos cerca de 24 horas, pelo menos cerca de 36 horas, pelo menos cerca de 48 horas, pelo menos cerca de 60 horas, pelo menos cerca de 72 horas, pelo menos cerca de 84 horas, pelo menos cerca de 96 horas, ou pelo menos cerca de 108 horas.

[00014] A região constante de Ig ou uma fração da mesma útil para a proteína quimérica compreende uma primeira região Fc, que está ligada ao fragmento de VWF por um ligante opcional, por exemplo, um

ligante clivável. A proteína quimérica pode ainda compreender uma região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma, que está ligada à proteína FVIII ou a sequência XTEN, a região constante de Ig ou uma fração da mesma, o fragmento de VWF, ou quaisquer combinações dos mesmos por um ligante opcional. Em uma modalidade, a região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma está ligada à proteína FVIII por um ligante opcional. A região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma pode compreender uma segunda região Fc.

[00015] A região constante de Ig ou uma fração da mesma útil na presente invenção e a região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma útil na presente invenção são idênticas ou diferentes.

[00016] Em alguns aspectos, a proteína FVIII é ligada a uma sequência XTEN no C-terminal ou N-terminal da proteína FVIII ou inserida imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos no Fator VIII humano maduro nativo (por exemplo, um ou mais sítios de inserção) ou quaisquer combinações. Um ou mais sítios de inserção na proteína FVIII podem ser localizados dentro de um ou mais domínios da proteína FVIII selecionados a partir do grupo que consiste em domínio A1, a região ácida a1, o domínio A2, a região ácida a2, o domínio A3, o domínio B, o domínio C1, o domínio C2, e quaisquer combinações dos mesmos ou entre um ou mais domínios da proteína FVIII selecionados a partir do grupo que consiste em domínio A1 e região ácida a1, região ácida a1 e domínio A2, o domínio A2 e a região ácida a2, a região ácida a2 e domínio B, o domínio B e domínio A3, domínio A3 e domínio C1, o domínio C1 e domínio C2, e quaisquer combinações dos mesmos ou entre dois domínios da proteína FVIII selecionados a partir do grupo que consiste em domínio A1 e região ácida a1, a região ácida a1 e domínio A2, o domínio A2 e a região ácida a2, a região ácida a2 e domínio B, o domínio B e domínio A3, domínio A3 e domínio C1, o

domínio C1 e domínio C2, e quaisquer combinações dos mesmos.

[00017] Em uma modalidade, o um ou mais sítios de inserção estão localizados imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos de Fator VIII humano maduro nativo (por exemplo, SEQ ID NO: 4 [sequência de FVIII madura de comprimento completo]) selecionado a partir do grupo que consiste nos resíduos de aminoácido na Tabela 7, 8, 9, 10, 11, ou quaisquer combinações dos mesmos.

[00018] Em outra modalidade, o um ou mais sítios de inserção encontram-se em uma ou mais alças permissivas do Fator VIII humano maduro nativo. Em outras modalidades, o um ou mais sítios de inserção estão localizados na região a3 do Fator VIII humano maduro nativo. Por exemplo, uma sequência de XTEN pode ser inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4 (FVIII maduro de comprimento total). Em outras modalidades, uma proteína FVIII é ligada a pelo menos duas sequências de XTEN, uma primeira sequência de XTEN inserida dentro da região a3, e uma segunda sequência de XTEN inserida dentro de uma alça permissiva na proteína FVIII (por exemplo, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1, ou A3-2). Em ainda outras modalidades, uma proteína FVIII está ligada a, pelo menos, três sequências de XTEN, uma primeira sequência XTEN inserida dentro da região a3 e uma segunda sequência de XTEN e uma terceira sequência XTEN inserida dentro de uma ou duas alças permissivas na proteína FVIII (por exemplo, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1, ou A3-2).

[00019] Em certas modalidades, o um ou mais sítios de inserção de uma ou mais inserções XTEN são imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos (numerados em relação à sequência de FVIII maduro) selecionados a partir do grupo consistindo de:

- |                    |                    |                    |
|--------------------|--------------------|--------------------|
| (1) aminoácido 3,  | (2) aminoácido 18, | (3) aminoácido 22, |
| (4) aminoácido 26, | (5) aminoácido 32, | (6) aminoácido 40, |
| (7) aminoácido 60, | (8) aminoácido 65, | (9) aminoácido 81, |

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

[00020] Em algumas modalidades, uma XTEN é inserida na proteína FVIII. Em algumas modalidades, duas XTENs são inseridas na proteína FVIII. Em algumas modalidades, três XTENs são inseridas na proteína FVIII.

[00021] Em um exemplo particular, uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 26, correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1720 correspondente à SEQ ID NO: 4 (FVIII maduro de comprimento completo). Em outro exemplo, uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 403 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1720 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em alguns exemplos, uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1720 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em outros exemplos, uma primeira



XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 26 correspondente à SEQ ID NO: 4, uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1720 correspondente à SEQ ID NO: 4. Ainda em outras modalidades, uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 403 correspondente à SEQ ID NO: 4, uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1720 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em ainda outras modalidades, uma primeira XTEN é inserida entre os aminoácidos 403 e 404 correspondentes a SEQ ID NO: 4, uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1720 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em determinadas modalidades, uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 26, correspondente à SEQ ID NO: 4 (FVIII maduro de comprimento completo), uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1720 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1900 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 26 correspondente à SEQ ID NO: 4, uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 2, uma terceira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1720 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma quarta XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1900 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em outro exemplo, uma XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 745 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em um exemplo adicional, uma primeira XTEN é inserida ime-

diatamente a jusante do aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4 e uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1900 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante de 26 aminoácidos correspondente à SEQ ID NO: 4, uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1900 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em outro exemplo, uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 403 correspondente à SEQ ID NO: 4 e uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 745 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 745 do correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1900 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 18 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 745 correspondente à SEQ ID NO: 4.

[00022] Em algumas modalidades, a proteína FVIII é uma cadeia dupla da isoforma FVIII. Em algumas modalidades, a proteína FVIII é uma única cadeia da isoforma FVIII.

[00023] Em algumas modalidades, o XTEN que é inserido é a SEQ ID NO: 39 (AE288). Em alguns exemplos, as XTENs que são inseridas são SEQ ID NOs: 38 e 37 (AG144 e AE144). Em alguns exemplos, as XTENs que são inseridas são SEQ ID NOs: 37, 38 e 37 (AE144, AG144, e AE144). Em algumas modalidades, as XTENs que são inseridas são SEQ ID NOs: 37 e 40 (AE144 e AE288). Em algumas modalidades, as XTENs que são inseridas são AE42 (SEQ ID NO: 36), AE72 (SEQ ID NO: 127), AE144\_2A (SEQ IDNO: 128), AE144\_3B

(SEQ ID NO: 129), AE144\_4A (SEQ ID NO: 130), AE144\_5A (SEQ IDNO: 131), AE144\_6B (SEQ IDNO: 132), AG144\_A (SEQ ID NO: 133), AG144\_B (SEQ IDNO: 134), AG144\_C (SEQ ID NO: 135), AG144\_F (SEQ IDNO: 136), AE864 (SEQ ID NO: 43), AE576 (SEQ ID NO: 41), AE288 (SEQ IDNO: 39), AE288\_2 (SEQ ID NO: 137), AE144 (SEQ ID NO: 37), AG864 (SEQ ID NO: 44), AG576 (SEQ ID NO: 42), AG288 (SEQ ID NO: 40), AG144 (SEQ ID NO: 38), e quaisquer combinações dos mesmos.

[00024] A proteína FVIII útil na presente invenção pode compreender domínio B ou uma porção do mesmo, por exemplo, o domínio SQ B sem FVIII. Em uma modalidade, a proteína FVIII compreende FVIII de cadeia simples. Em outra modalidade, a FVIII de cadeia única contém pelo menos uma substituição de um aminoácido em um resíduo correspondente ao resíduo 1648, resíduo 1645, ou ambos de polipeptídeo de Fator VIII maduro de comprimento total (SEQ ID NO: 4) ou o resíduo 754, resíduo 751, ou ambos de SQ BDD Fator VIII (SEQ ID NO: 6). Em outras modalidades, a substituição de aminoácido é um aminoácido diferente de arginina. Em algumas modalidades, a proteína FVIII compreende uma cadeia pesada do FVIII e uma cadeia leve do FVIII, em que a cadeia pesada e a cadeia leve são associadas uma à outra por uma ligação de metal.

[00025] A proteína FVIII pode ter uma baixa afinidade para, ou não se liga a uma proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP), por exemplo, por conter pelo menos uma substituição de aminoácidos, que reduz a afinidade ou elimina a ligação para LRP. Dita pelo menos uma substituição de aminoácidos pode ser em um resíduo que corresponde ao resíduo 471, resíduo 484, resíduo 487, resíduo 490, resíduo 497, resíduo 2092, resíduo 2093 ou duas ou mais de combinações dos mesmos de FVIII maduro de comprimento completo. Em uma modalidade particular, a substituição de aminoáci-

dos no resíduo 471, 484 ou 497 é um aminoácido diferente de arginina, a substituição de aminoácidos no resíduo 487 é um aminoácido diferente de tirosina, a substituição de aminoácidos no resíduo 2092 é um aminoácido diferente de lisina, ou a substituição de aminoácido no resíduo 2093 é um aminoácido diferente de fenilalanina.

[00026] Em algumas modalidades, a proteína FVIII contém pelo menos uma substituição de aminoácidos que induz a proteína FVIII a ser mais estável do que uma proteína FVIII sem a substituição. Tais substituições podem ser localizadas no domínio A2 e domínio A3 da proteína FVIII, por exemplo, em um resíduo que corresponde ao resíduo 664, resíduo 1826, resíduo 662, resíduo 1828, ou duas ou mais de combinações dos mesmos de FVIII maduro de comprimento completo.

[00027] O fragmento de VWF útil para a presente invenção compreende um domínio D' e domínio D3, que juntos são capazes de se ligar a FVIII. O fragmento de VWF pode compreender a sequência de aminoácidos do domínio D' é pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica aos aminoácidos 764 a 866 da SEQ ID NO: 2 e/ou a sequência de aminoácidos do domínio D3 é pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica aos aminoácidos 867 a 1240 da SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade, o fragmento de VWF é um monômero. Em outra modalidade, o fragmento de VWF compreende pelo menos dois fragmentos de VWF, pelo menos três fragmentos de VWF, pelo menos quatro fragmentos de VWF, pelo menos cinco fragmentos de VWF, ou, pelo menos seis fragmentos de VWF. Em uma modalidade, os dois ou mais fragmentos de VWF podem ser idênticos ou podem ser diferentes. O fragmento de VWF pode compreender um aminoácido pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntico aos aminoácidos 764 a 1240 da SEQ ID NO: 2. O fragmento de VWF pode consistir essencialmente em, ou consistir nos aminoácidos 764 a 1240 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o

fragmento de VWF pode conter pelo menos uma substituição de um aminoácido em um resíduo correspondente ao resíduo 1099, resíduo 1142, ou ambos os resíduos 1099 e 1142 de SEQ ID NO: 2. Em outras modalidades, o fragmento de VWF compreende ainda o domínio D1, o domínio D2, ou os domínios D1 e D2 de VWF.

[00028] O fragmento de VWF pode ainda compreender um domínio de VWF selecionado a partir do grupo que consiste em domínio A1, o domínio A2, o domínio A3, o domínio D4, o domínio B1, o domínio B2, o domínio B3, o domínio C1, o domínio C2, o domínio CK, um ou mais fragmentos dos mesmos, e quaisquer combinações dos mesmos. Por exemplo, o fragmento de VWF pode consistir essencialmente em, ou consistir em: (1) os domínios D' e D3 de VWF ou fragmentos dos mesmos; (2) os domínios D1, D', e D3 de VWF ou fragmentos dos mesmos; (3) os domínios D2, D', e D3 de VWF ou fragmentos dos mesmos; (4) os domínios D1, D2, D', e D3 de VWF ou fragmentos dos mesmos; ou (5) os domínios D1, D2, D', D3, e A1 de VWF ou fragmentos dos mesmos. Em algumas modalidades, o fragmento de VWF compreende ainda um peptídeo de sinal de VWF ou FVIII que está operativamente ligado ao fragmento de VWF.

[00029] Um ou mais dos ligantes úteis na presente invenção têm um comprimento de pelo menos cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, ou 2000 aminoácidos. Em algumas modalidades, um ou mais dos ligantes têm um comprimento de cerca de 1 a cerca de 2000 aminoácidos. Em uma modalidade, um ou mais dos ligantes têm um comprimento de pelo menos cerca de 20, 35, 42, 48, 73, 75, 95, 98, 144, 288, 324, 333, 576, ou 864 aminoácidos. Em outra modalidade, um ou mais dos elementos de ligação compreendem um peptídeo gly/ser, uma sequência XTEN, ou

ambos. Exemplos de peptídeo gly/ser incluem, entre outros, um de fórmula  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$  (SEQ ID NO: 139) ou  $\text{S}(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$  (SEQ ID NO: 140), em que  $n$  é um inteiro positivo selecionado a partir do grupo que consiste em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Por exemplo, o ligante  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$  pode ser  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$  (SEQ ID NO: 63) ou  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$  (SEQ ID NO: 138). Em uma modalidade, o ligante compreende pelo menos um primeiro sítio de clivagem na extremidade N-terminal do ligante, pelo menos um segundo sítio de clivagem na extremidade C-terminal do ligante, ou ambos. Em outra modalidade, o ligante compreende 20 aminoácidos, 35 aminoácidos, 48 aminoácidos, 73 aminoácidos, ou 95 aminoácidos de ligante clivável por trombina. Os ligantes cliváveis podem compreender um ou mais dos sítios de clivagem por uma protease selecionada a partir do grupo consistindo em fator XIa, fator XIIa, calicreína, fator VIIa, fator IXa, fator Xa, fator IIa (trombina), elastase-2, Granzyme- B, TEV, enteroquinase, Protease 3C, Sortase A, MMP-12, MMP-13, MMP-17 e MMP-20, por exemplo, TLDPRSFLLRNPND-KYEPFWEDEEK (SEQ ID NO: 8). Os exemplos não limitativos de um ou mais dos sítios de clivagem compreendem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo de RRRR (SEQ ID NO: 9), RKRRKR (SEQ ID NO: 10), RRRRS (SEQ ID NO: 11), TQS-FNDFTR (SEQ ID NO: 12), SVSQTSKLTR (SEQ ID NO: 13), DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 14), TTKIKPR (SEQ ID NO: 15), LVPRG (SEQ ID NO: 16), ALRPR (SEQ ID NO: 17), KLTRAET (SEQ ID NO: 18), DFTRVVG (SEQ ID NO: 19), TMTRIVGG (SEQ ID NO: 20), SPFRSTGG (SEQ ID NO: 21), LQVRIVGG (SEQ ID NO: 22), PLGRIVGG (SEQ ID NO: 23), IEGRTVGG (SEQ ID NO: 24), LTPRSLLV (SEQ ID NO: 25), LGPVSGVP (SEQ ID NO: 26), VAGDSLEE (SEQ ID NO: 27), GPAGLGGA (SEQ ID NO: 28), GPAGLRGA (SEQ ID NO: 29), APLGLRLR (SEQ ID NO: 30), PALPLVAQ (SEQ ID NO: 31), ENLYFQG (SEQ ID NO: 32), DDDKIVGG (SEQ ID NO: 33), LEVLFGGP (SEQ ID

NO: 34), e LPKTGSES (SEQ ID NO: 35). Em algumas modalidades, o primeiro sítio de clivagem e o segundo sítio de clivagem são idênticos ou diferentes.

[00030] A sequência XTEN útil para a presente invenção pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em AE42 (SEQ ID NO: 36), AE144 (SEQ ID NO: 37), AG144 (SEQ ID NO: 38), AE288 (SEQ ID NO: 39), AG288 (SEQ ID NO: 40), AE576 (SEQ ID NO: 41), AG576 (SEQ ID NO: 42), AE864 (SEQ ID NO: 43), AE72 (SEQ ID NO: 127), AE144\_2A (SEQ ID NO: 128), AE144\_3B (SEQ ID NO: 129), AE144\_4A (SEQ ID NO: 130), AE144\_5A (SEQ ID NO: 131), AE144\_6B (SEQ ID NO: 132), AG144\_A (SEQ ID NO: 133), AG144\_B (SEQ ID NO: 134), AG144\_C (SEQ ID NO: 135), AG144\_F (SEQ ID NO: 136), AE288\_2 (SEQ ID NO: 137), ou AG864 (SEQ ID NO: 44). Em uma modalidade particular, a sequência compreende XTEN AE288 ou AG288.

[00031] A proteína quimérica da invenção pode ser polissialilada, peguilada, ou hesilada.

[00032] A presente invenção é também dirigida a um polinucleotídeo ou um conjunto de polinucleotídeos que codificam a proteína quimérica. O polinucleotídeo pode compreender ainda uma cadeia de polinucleotídeos, que codifica PC5 ou PC7. A invenção é também dirigida a um vetor que compreende o polinucleotídeo ou o conjunto de polinucleotídeos e um ou mais promotor operativamente ligado ao polinucleotídeo ou o conjunto de polinucleotídeos. O vetor pode ainda compreender um vetor adicional, que compreende uma cadeia de polinucleotídeos que codifica PC5 ou PC7. A invenção também é desenhada para uma célula hospedeira que compreende o polinucleotídeo ou o vetor. A célula hospedeira pode ser uma célula de mamífero, por exemplo, células HEK293, células CHO, ou células BHK. Em algumas modalidades, o PC5 ou PC7 das células hospedeiras cliva os domínios

D1D2 de VWF.

[00033] A invenção é também dirigida a uma composição farmacêutica compreendendo a proteína quimérica, o polinucleotídeo, vetor, ou a célula hospedeira, e um veículo farmacêuticamente aceitável. A composição da presente invenção tem, assim, uma meia-vida estendida em comparação com a proteína tipo selvagem do FVIII. A meia-vida da proteína FVIII é estendida pelo menos cerca de 1,5 vezes, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 2,5 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 6 vezes, pelo menos cerca de 7 vezes, pelo menos cerca de 8 vezes, pelo menos cerca de 9 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 11 vezes, ou pelo menos cerca de 12 vezes maior do que o tipo selvagem do FVIII. A meia-vida do Fator VIII é pelo menos cerca de 17 horas, pelo menos cerca de 18 horas, pelo menos cerca de 19 horas, pelo menos cerca de 20 horas, pelo menos cerca de 21 horas, pelo menos cerca de 22 horas, pelo menos cerca de 23 horas, pelo menos cerca de 24 horas, pelo menos cerca de 25 horas, pelo menos cerca de 26 horas, pelo menos cerca de 27 horas, pelo menos cerca de 28 horas, pelo menos cerca de 29 horas, pelo menos cerca de 30 horas, pelo menos cerca de 31 horas, pelo menos cerca de 32 horas, pelo menos cerca de 33 horas, pelo menos cerca de 34 horas, pelo menos cerca de 35 horas, pelo menos cerca de 36 horas, pelo menos cerca de 48 horas, pelo menos cerca de 60 horas, pelo menos cerca de 72 horas, pelo menos cerca de 84 horas, pelo menos cerca de 96 horas, ou pelo menos cerca de 108 horas.

[00034] A composição da presente invenção pode ser administrada por uma via selecionada a partir do grupo consistindo em administração tópica, administração intraocular, administração parenteral, administração intratecal, administração subdural e administração oral. Em



uma modalidade, a composição é administrada por via parenteral, por exemplo, intravenosa ou subcutânea. A composição da invenção é útil para tratar uma doença ou condição de sangramento em um sujeito com essa necessidade. A doença de hemorragia ou condição é selecionada a partir do grupo consistindo em um distúrbio da coagulação de sangramento, hemartrose, hemorragia nos músculos, hemorragia oral, hemorragia, hemorragia nos músculos, hemorragia oral, trauma, trauma capitis, sangramento gastrointestinal, hemorragia intracraniana, hemorragia intra-abdominal, hemorragia intratorácica, fratura óssea, sangramento do sistema nervoso central, sangramento no espaço retrofaringeal, sangramento no espaço retroperitoneal, sangramento na bainha ileopsoas e quaisquer combinações dos mesmos. Em uma modalidade, o sujeito tratado com a proteína quimérica será submetido a uma cirurgia. Em outra modalidade, o tratamento é profilático ou sob demanda.

[00035] A invenção é também dirigida a um método para prevenir ou inibir a ligação de uma proteína FVIII com VWF endógeno compreendendo a adição de uma quantidade eficaz da proteína quimérica, o vetor polinucleotídico, a célula hospedeira, ou a composição a um sujeito em necessidade do mesmo, em que o fragmento de VWF liga-se à proteína FVIII e, assim, previne ou inibe ligação do VWF endógeno. A presente invenção é ainda dirigida para um método de prolongar ou aumentar a meia-vida da proteína FVIII, em que o método compreende a administração de uma quantidade eficaz da proteína quimérica, o polinucleotídeo, vetor, a célula hospedeira, ou a composição a um sujeito em necessidade do mesmo, em que o fragmento de VWF liga-se à proteína FVIII e, portanto, estende ou aumenta a meia-vida da proteína FVIII. É também proporcionado método para prevenir ou inibir a eliminação de uma proteína FVIII a partir de uma célula, em que o método compreende a administração de uma quantidade eficaz da prote-

ina quimérica, o polinucleotídeo, vetor, a célula hospedeira, ou a composição a uma célula compreendendo uma proteína FVIII ou um polinucleotídeo que codifica a proteína FVIII, em que a proteína tendo atividade de VWF se liga à proteína FVIII. O sujeito útil para os presentes métodos é um animal, por exemplo, um ser humano, por exemplo, um paciente que sofre de hemofilia A.

[00036] A presente invenção também fornece um método de tratamento de uma doença ou distúrbio de sangramento em um sujeito com essa necessidade compreendendo a administração de uma quantidade eficaz da proteína quimérica, o polinucleotídeo, o vetor, a célula hospedeira, ou a composição, em que doença ou distúrbio de sangramento é selecionado a partir do grupo consistindo em um distúrbio da coagulação do sangramento, hemartrose, hemorragia nos músculos, hemorragia oral, hemorragia, hemorragia nos músculos, hemorragia oral, trauma, trauma capitis, hemorragia gastrointestinal, hemorragia intracraniana, hemorragia intra-abdominal, hemorragia intratorácica, fratura óssea, sangramento do sistema nervoso central, sangramento no espaço retrofaríngeo, sangramento no espaço retroperitoneal, e sangramento na bainha ileopsoas. O tratamento pode ser profilático ou sob demanda. Em uma modalidade, a quantidade eficaz é de 0,1 µg/kg a 500 mg/kg.

[00037] A invenção também inclui um método de produção de uma proteína quimérica, compreendendo a transfecção de uma ou mais células hospedeiras com o polinucleotídeo ou o vetor e expressando a proteína quimérica na célula hospedeira.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS/FIGURAS

[00038] Figura 1A-D. Diagramas esquemáticos de fragmentos FVW. Fig. 1A mostra três fragmentos de VWF exemplares úteis para a invenção, por exemplo, VWF-002, VWF- 010, e VWF -013. VWF-002 contém os aminoácidos 1 a 477 de SEQ ID NO: 124 (aminoácidos 764

a 1240 da SEQ ID NO: 2) e é sintetizada sem as sequências pré/pró-peptídeo. VWF-010 contém os domínios D1D2 em adição aos domínios D'D3. VWF-013 contém os domínios D1D2D'D3 além dos resíduos de alanina substituindo as cisteínas nos resíduos 336 e 379 da SEQ ID NO: 123. Fig. 1B mostra VWF-031, que contém os domínios D1D2D'D3 fundidos com uma região constante de Ig ou uma fração da mesma, por exemplo, uma região Fc, por um ligante clivável, por exemplo, um ligante clivável por trombina de 48 aminoácidos. Fig. 1C mostra VWF-025, que é uma sequência de nucleotídeos que codifica os domínios D1D2D'D3 contidos em vetor pLIVE, e VWF-029, que é uma sequência de nucleotídeos que codifica os domínios D1D2D'D3 com duas substituições de aminoácidos, C336A e C379A, em vetor pLIVE. Fig. 1D mostra fragmento de VWF de comprimento completo compreendendo pró-peptídeo (os domínios D1 e D2) e subunidades maduras (os domínios D', D3, A1, A2, A3, D4, B1-3, C1-2). O fragmento de VWF é de cerca de 250 kDa proteína e forma multímeros (> 20 MDa) por ligações dissulfeto. Os fragmentos de VWF associados com FVIII (95-98%) no complexo não covalente e depois estende a meia-vida do FVIII por proteger o FVIII a partir de clivagem/ativação por protease, estabilizando cadeia pesada e leve, e impedindo a eliminação do FVIII por receptores limpadores. O fragmento de VWF pode também limitar a meia-vida do FVIII pela eliminação de complexo FVIII-VWF através de receptores de VWF e prevenção da pinocitose e reciclagem de rFVIII-Fc.

[00039] Figura 2. Perfil farmacocinético de rFVIII-XTEN (rFVIII-AE288 ou rFVIII-288AE) em camundongos com expressão de VWF D'D3 ou em camundongos com expressão duplo knockout de FVIII e VWF (DKO). A Figura 2A mostra a linha do tempo da injeção hidrodinâmica (HDI) do domínio D'D3 que codifica o plasmídeo de DNA (VWF-025) (dia -5), dosagem intravenosa de rFVIII-XTEN AE288 (dia

0), e de coleta de amostras PK (dia 5 ). A Figura 2B mostra a atividade do FVIII medido por um ensaio cromogênico do FVIII após a administração IV de rFVIII-XTEN288 em camundongos D1D2D'D3 (triângulo invertido) e rFVIII-XTEN288 em camundongos DKO (diamante). Fig. 2C mostra o nível plasmático de D'D3 (ng/mL) após a administração de VWF-025. O eixo X representa o tempo em horas.

[00040] Figura 3. Diagrama esquemático de constructos exemplares de heterodímero VWF:FVIII. Os constructos têm a estrutura comum representada como fórmula do FVIII-F1-L1-V-X-L2-F2, mas contêm exemplos de ligantes diferentes variáveis. O constructo (FVIII-161) mostrado contém um FVIII heterodimérico (a cadeia pesada e a cadeia leve são associadas por um ligante metálico) ligado a uma primeira região Fc e um fragmento de VWF, que é domínios D' e D3 de VWF (isto é, aminoácidos 1 a 477 de SEQ ID NO: 2 com substituições de aminoácidos C336A e C379A) ligados a uma sequência de XTEN, que é ainda ligada a um ligante clivável e uma segunda região Fc. A sequência XTEN contida em FVIII-161 é uma sequência de XTEN AE288, e o ligante é um ligante clivável por trombina, que tem 35 aminoácidos. Em FVIII-161, a proteína FVIII ligada à primeira região Fc está ligada ao fragmento de VWF por um ligante processável. Após expressão, o ligante processável pode ser clivado por uma enzima de processamento intracelular, preparando, assim, o constructo de três cadeias de polipeptídeos associadas umas com as outras.

[00041] A Figura 4 mostra diagramas esquemáticos de exemplos de heterodímero ou monômero de FVIII-VWF. FVIII-168, FVIII-175, FVIII-172, FVIII-174, e FVIII170. Constructo FVIII-168 compreende uma sequência FVIII de cadeia única (tendo um substituto do resíduo de alanina aos resíduos de arginina nos resíduos 1645 e 1648) ligada a uma primeira região Fc, que é depois fundida com um fragmento de VWF ligado a uma segunda região Fc de um ligante clivável por trombina,

que tem 48 aminoácidos. AE288 XTEN é inserida no domínio B da sequência FVIII de cadeia única. A ligação entre a primeira região Fc e o fragmento de VWF compreende um ligante que é capaz de ser clivado por uma enzima de processamento intracelular, ou seja, ligante processável. Constructo FVIII-175 compreende um FVIII de cadeia única (tendo um substituto de resíduo de alanina dos resíduos de arginina nos resíduos 1645 e 1648) ligada a AE288 XTEN e uma primeira região Fc que está ligada a uma segunda região Fc por um ligante, por exemplo, um ligante processável. AE288 XTEN é inserida no domínio B da sequência de FVIII de cadeia única. Constructo FVIII-172 compreende duas cadeias de polipeptídeos, uma primeira cadeia compreendendo uma sequência de cadeia pesada do FVIII fundida com AE288 XTEN, uma segunda cadeia compreendendo uma sequência de cadeia leve do FVIII, uma primeira região Fc, um ligante (por exemplo, um ligante processável), um fragmento de VWF, um ligante clivável por trombina (por exemplo, 48 aminoácidos), e uma segunda região Fc. Constructo FVIII-174 compreende duas cadeias de polipeptídeos, uma primeira cadeia compreendendo uma sequência de cadeia pesada do FVIII fundida com AE288 XTEN e uma segunda cadeia compreende uma cadeia leve do FVIII, uma primeira região Fc, um ligante (por exemplo, um ligante processável), e uma segunda região Fc. Constructo FVIII-170 compreende um fragmento de VWF, AE288 XTEN, um ligante (por exemplo, um ligante clivável por trombina, que é de 35 aminoácidos de comprimento), e uma sequência FVIII de cadeia única.

[00042] Figura 5. O perfil farmacocinético de heterodímeros do FVIII/VWF contendo uma sequência XTEN em combinação com uma região Fc. Constructos FVIII-161, FVIII-168, e FVIII-172 foram administrados a camundongos duplo knockout FVIII: VWF (DKO) por injeção hidrodinâmica (IDH) na dose 100 µg/dose de camundongo. Constructo

FVIII-170 foi administrado a camundongos DKO FVIII:VWF por HDI em 50 µg/dose de camundongo. A atividade de FVIII plasmática pós-HDI foi analisada por teste cromogênico de FVIII por 24 horas após HDI. A atividade do FVIII dos heterodímeros FVIII:VWF que contêm uma sequência de XTEN e domínios Fc foi comparada com a atividade do FVIII de BDD-FVIII sem o fragmento de VWF, sequência XTEN, e domínios Fc.

[00043] Figura 6. Diagramas esquemáticos de exemplos de heterodímero FVIII-VWF em sistema de co-transfecção. Fig. 6A. Constructo FVIII-169 contém a sequência FVIII de comprimento completo (com um resíduo de alanina substituindo os resíduos de arginina em 1645 e 1648 e com uma sequência XTEN inserida na sequência do FVIII de cadeia única), a qual está ligada a uma região Fc. VWF-031 contém o fragmento D1D2D'D3 (com um resíduo de alanina substituindo os resíduos de cisteína em 336 e 379), que está ligada a outra região Fc com um ligante clivável por trombina de 48. Após o processamento intracelular, constructo FVIII-169 produz um FVIII de cadeia única de comprimento completo (SCFVIII) fundido com um fragmento Fc e uma sequência XTEN, e constructo VWF-031 produz um fragmento D'D3 de 477 aminoácidos ligado a outro fragmento Fc. Duas ligações covalentes podem ser formadas entre os fragmentos Fc que estão ligados ao SC FVIII ou o fragmento D'D3, este por sua vez, permite uma associação não covalente do FVIII e D'D3. Fig. 6B. Constructo FVIII-173 contém uma sequência do FVIII heterodimérica, uma sequência de cadeia pesada do FVIII ligada a uma sequência XTEN e uma sequência de cadeia leve do FVIII ligada a uma região Fc. VWF-031 está descrito acima. Após o processamento intracelular, constructo FVIII-173 produz uma proteína heterodimérica, uma cadeia pesada do FVIII fundida com uma sequência XTEN, uma cadeia leve do FVIII fundida com um fragmento Fc, e constructo VWF-031 produz um fragmento D'D3

de 477 aminoácidos ligado a outro fragmento Fc. Duas ligações covalentes podem ser formadas entre os fragmentos Fc que estão ligados à cadeia leve do FVIII ou o fragmento D'D3, este por sua vez, permite uma associação não covalente do FVIII e D'D3.

[00044] Figura 7. Afinidade de ligação do FVIII:VWF exemplar contendo uma sequência XTEN e domínios Fc para hVWF imobilizado em ensaio Octeto. A afinidade de ligação para FVIII-169/VWF-031 e FVIII-057 (rFVIII-Fc) fundido ao hVWF imobilizado foi testada usando medições baseadas em interferometria de biocamada (ensaio Octeto). A Figura 7 A mostra resposta de ligação em nanomoles do FVIII169 e FVIII-Fc substância da droga (um controle positivo) para hVWF imobilizado. A Figura 7B mostra a resposta de ligação de IgG1 humana (controle negativo) para o vWF humano imobilizado.

[00045] Figura 8. Perfil farmacocinético (PK) de FVIII-169 em HemA e camundongos duplo knockout FVIII:VWF (DKO). A Figura 8A mostra o perfil PK do FVIII-169/VWF-031 em camundongos FVIII-Fc e HemA. Os camundongos HemA foram tratados com uma dose intravenosa única do FVIII-169/VWF-031 a 200 IU/kg. As amostras de plasma coletadas a partir dos camundongos foram testadas por ensaio cromogênico de FVIII. Meia-vida do FVIII-169/VWF-031 foi calculada utilizando o programa WinNonlin. Figura 8B mostra o perfil PK do FVIII-169/VWF-031, FVIII-169/Fc, e FVIII-Fc em camundongos DKO FVIII/VWF.

[00046] Figura 9. Perfil de PK de variantes FVIII-XTEN variantes em camundongos DKO FVIII/VWF expressando D'D3. A Figura 9A mostra a comparação do perfil de PK das variantes FVIII-XTEN, FVIII com uma XTEN, FVIII com duas XTENs, e FVIII com três XTENs. Uma, duas, ou três XTENs foram inseridas em várias porções do FVIII, incluindo C-terminal e o domínio B. CT indica que uma XTEN está ligada ao C-terminal do FVIII. O sítio de inserção B/CT indica que uma XTEN é inserida entre o resíduo de aminoácido 745 e o resíduo de aminoácido

746 da proteína FVIII e outra XTEN está ligada ao C-terminal da proteína FVIII. A numeração de resíduos de aminoácidos corresponde à da sequência da proteína FVIII SQ BDD. O sítio de inserção 1900/B/CT indica que uma primeira XTEN é inserida entre o resíduo de aminoácido 1900 e o resíduo de aminoácido 1901 do FVIII, uma segunda XTEN é inserida entre o resíduo de aminoácido 745 e o resíduo de aminoácido 746 do FVIII, e uma terceira XTEN é ligada ao C-terminal do FVIII. A cepa de camundongo usada para administrar as variantes do FVIII-XTEN é uma cepa de camundongo DKO expressando domínios D'D3. A Figura 9B mostra o perfil PK do FVIII-XTEN com três inserções de XTEN. A variante FVIII-XTEN (1900/B/CT) foi administrada, aos camundongos DKO FVIII/VWF ou camundongos HemA. A meia-vida do FVIII-XTEN (1900/B/CT) é comparada.

[00047] Figura 10. Atividade FVIII do FVIII<sub>169</sub>:Fc (círculo preenchido), FVIII<sub>169</sub>:VWF31 (triângulo oco) em plasma de DKO de camundongos medida por ensaio cromogênico. FVIII:Fc contém uma cadeia dupla do FVIII(cadeia pesada e cadeia leve) fundida com um dímero de Fc (isto é, híbrido monômero-dímero). FVIII 169 é descrito acima (contendo AE288 no domínio B, imediatamente a jusante do aminoácido 745 correspondente a sequência de FVIII madura). FVIII<sub>169</sub>:Fc contém FVIII<sub>169</sub> fundido com um dímero de Fc. FVIII<sub>169</sub>:VWF31 contém VWF31, além do dímero de Fc, FVIII 169 fundido com a primeira região Fc e VWF31 fundido com a segunda região Fc, em que a primeira região Fc e segunda região Fc formam uma ligação covalente, por exemplo, uma ou mais ligações dissulfeto.

[00048] Figura 11. Efeitos do Fc, XTEN, e fragmentos VWF- D'D3 em extensão da meia-vida do FVIII. BDD-FVIII(REFACTO®) (quadrado), FVIII<sub>169</sub>:Fc (círculo), FVIII<sub>169</sub>:VWF31 (triângulo), e FVIII 169/VWF031 (triângulo invertido) foram administrados a camundongos duplo knockout



(DKO) FVIII e VWF. A atividade do FVIII foi medida por ensaio cromogênico, e a meia-vida foi calculada utilizando o programa WinNonlin-Phoenix. Eixo X mostra o tempo, e o eixo Y mostra a atividade do FVIII no plasma em mU/ml.

[00049] Figura 12A-C. Efeitos de diferentes XTENs em heterodímero rFVIII-XTEN/VWF em camundongos HemA. A Figura 12A mostra a atividade plasmática de FVIII normalizado em valor (%) de 5 min de duas XTENs inseridas imediatamente a jusante dos resíduos 1900 e 1656 correspondendo à sequência de FVIII maduro (isto é FVIII-195 (isoforma FVIII de cadeia dupla) e FVIII-199 (isoforma do FVIII de cadeia simples)), em comparação com o FVIII-169 contendo uma XTEN imediatamente a jusante do resíduo 745 correspondente à sequência FVIII madura. FVIII-169/VWF-031 (círculo preenchido), FVIII-199/VWF-031 (quadrado preenchido) e FVIII-195/VWF031 (quadrado oco) foram administrados em camundongos HemA para medir a atividade plasmática de FVIII. A Figura 12B mostra o efeito de extensão de meia-vida da segunda inserção XTEN imediatamente a jusante de resíduos 403 (domínio A2) e 745 (domínio B) (isto é, FVIII-203) e resíduos 745 (domínio B) e 1900 (domínio A3) (FVIII-204) correspondendo a sequência do FVIII madura em comparação com o FVIII-169 (uma inserção XTEN apenas no domínio B). FVIII-204/VWF031 (triângulo preenchido), FVIII-169/VWF-031 (círculo preenchido) FVIII-203/VWF-031 (quadrado preenchido) e scBDD- FVIII (diamante oco) foram administrados aos camundongos HemA. O eixo X mostra a atividade plasmática de FVIII normalizada para valor 5 min (%), e o eixo y mostra o tempo em horas. A Figura 12C mostra o efeito de extensão de meia-vida das duas inserções XTEN imediatamente a jusante dos resíduos 18 (domínio A1) e 745 (domínio B) (isto é o FVIII-205) em comparação com o FVIII-169 (uma única inserção XTEN no domínio B) e FVIII de cadeia única sem quaisquer regiões Fc ou quaisquer XTENs (isto é, FVIII-207). A Figura

12C mostra, adicionalmente, o efeito de extensão da meia-vida de três inserções XTEN incorporadas imediatamente a jusante dos resíduos 26 (domínio A1), 1656 (domínio A3), e 1900 (domínio A3) (isto é FVIII-201) em comparação com FVIII-169 (uma única inserção XTEN imediatamente a jusante do resíduo 745). FVIII-205/VWF-031 (quadrado preenchido), FVIII-201/VWF-031 (triângulo invertido), FVIII-169/VWF-031 (círculo preenchido) e FVIII-207 (diamante oco) foram administradas a camundongos HemA. A atividade plasmática de FVIII normalizada para valor de 5 min (%) (eixo X) foi medida ao longo do tempo em horas (eixo Y).

[00050] Figura 13. Atividade do FVIII de heterodímero rFVIII-XTEN/VWF-XTEN em camundongos DKO FVIII/VWF. Atividade do FVIII de amostras plasmáticas foi analisada por análise cromogênica do FVIII, e a curva de regressão de atividade plasmática de FVIII (eixo X) como uma função do tempo (eixo Y) foi representada graficamente. FVIII-155 (scFVIII-Fc sem quaisquer XTENs) foi co-expressa com VWF-034 (VWF-Fc com AE 288 XTEN mais um ligante clivável por trombina de 35 resíduos). A meia-vida do FVIII-155/VWF-034 foi comparada com a do FVIII-169/VWF-031, que tem uma AE 288 XTEN inserida na junção domínio B (imediatamente a jusante do resíduo 745 correspondente ao polipeptídeo do FVIII maduro) do FVIII.

[00051] Figura 14A-H. Diagramas esquemáticos de vários constructos rFVIII-XTEN/VWF. Estes constructos são também descritos nas outras secções aqui. Fig. 14A mostra, a proteína de FVIII sem o domínio B de cadeia única (por vezes aqui indicada como scBDD-FVIII). Os constructos scBDD-FVIII contêm duas substituições nos resíduos 1645 e 1648 a partir de Arg para Ala. A Figura 14B mostra dois constructos de cadeias de polipeptídeos (FVIII 155/VWF031), a primeira compreendendo FVIII de cadeia única ligada a uma região Fc sem quaisquer XTENS e a segunda cadeia compreendendo o fragmento VWF D'D3

ligado a uma região Fc. Este constructo é utilizado como um controle. Fig. 14C mostra dois constructos de cadeia de polipeptídeos (FVIII 199/VWF031), a primeira cadeia compreendendo FVIII de cadeia única ligada a uma região Fc, em que uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante do resíduo 1900 correspondente a sequência do FVIII madura e uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do resíduo 1656 correspondente a sequência do FVIII madura, e a segunda cadeia compreendendo o fragmento de VWF D'D3 ligado a uma região Fc. Fig. 14D mostra dois constructos de cadeia de polipeptídeos (FVIII201/VWF031), a primeira cadeia compreendendo proteína FVIII de cadeia única ligada a uma região Fc, em que uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante do resíduo 26 que corresponde a sequência madura do FVIII, uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do resíduo 1656 correspondente a sequência madura do FVIII, e uma terceira XTEN é inserida imediatamente a jusante do resíduo 1900 correspondente a sequência madura do FVIII, e a segunda cadeia compreendendo o fragmento de VWF D'D3 ligado a uma região Fc. Fig. 14E mostra dois constructos de cadeia de polipeptídeos (FVIII 169/VWF031), a primeira cadeia compreende proteína FVIII de cadeia única ligada a uma região Fc, em que uma XTEN é inserida imediatamente a jusante do resíduo 745 (indicado como "B") que corresponde a sequência madura do FVIII, e a segunda cadeia compreendendo o fragmento de VWF D'D3 ligado a uma região Fc. Fig. 14F mostra dois constructos de cadeia de polipeptídeos (FVIII203/VWF031), a primeira cadeia compreendendo proteína FVIII de cadeia única, em que uma primeira XTEN é inserida no resíduo 745 ("B") que corresponde a sequência madura do FVIII e uma segunda XTEN é inserida no resíduo 1900 correspondente a sequência madura do FVIII, e a segunda cadeia compreendendo o fragmento VWF D'D3 ligado a uma região Fc. Fig. 14G mostra dois constructos de cadeia de

polipeptídeos (FVIII204/VWF031), a primeira cadeia compreendendo proteína FVIII de cadeia única ligada a uma região Fc, em que uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante do resíduo 403 correspondente a sequência madura do FVIII e uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do resíduo 745 ("B") que corresponde a sequência madura do FVIII, e uma segunda cadeia compreendendo o fragmento de VWF D'D3 ligado a uma região Fc. Fig. 14H mostra dois constructos de cadeia de polipeptídeos (FVIII205/VWF031), a primeira cadeia compreendendo FVIII de cadeia única, em que uma primeira XTEN é inserida imediatamente a jusante do resíduo 18 que corresponde a sequência madura do FVIII e uma segunda XTEN é inserida imediatamente a jusante do resíduo 745 ("B") que corresponde a sequência madura do FVIII, e a segunda cadeia compreendendo o fragmento VWF D'D3 ligado a uma região Fc.

[00052] Figura 15. Atividade de FVIII de rFVIII-XTEN/VWF e BDD-FVIII em camundongos DKO FVIII/VWF. Atividade do FVIII de amostras plasmáticas foi analisada por análise cromogênica do FVIII, e a curva de regressão de atividade plasmática de FVIII (eixo X) como uma função do tempo (eixo Y) foi representada graficamente. A meia-vida de rFVIII-XTEN/VWF (FVIII-205/VWF-031) foi comparada com a de BDD-FVIII e rFVIII-Fc.

[00053] Figura 16. Eficácia do heterodímeros FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc em camundongos HemA usando modelo sangramento com clipe na cauda. O modelo de sangramento com clipe na cauda de camundongos HemA foi utilizado para comparar a eficácia do FVIII169/VWF034, FVIII205/VWF031 e BDD-FVIII. A perda de sangue mediana em ml por 200 IU/kg do FVIII169/VWF034 e FVIII205/VWF031 é comparada com 200 IU/kg de BDD-FVIII, 65 IU/kg de BDD-FVIII, 20 IU/kg de BDD-FVIII, e veículo.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

## DEFINIÇÕES

[00054] Deve-se notar que o termo "uma" entidade refere-se a uma ou mais dessas entidades; por exemplo, "uma sequência de nucleotídeos", é entendida como representando um ou mais sequências de nucleotídeos. Como tal, os termos "uma" (ou "uma"), "uma ou mais" e "pelo menos uma" podem ser aqui utilizados indistintamente.

[00055] O termo "polinucleotídeo" ou "nucleotídeo" destina-se a abranger um ácido nucleico singular, bem como ácidos nucleicos plurais, e refere-se a uma molécula isolada de ácido nucleico ou a constructo, por exemplo, RNA mensageiro (mRNA) ou de DNA de plasmídeo (pDNA). Em certas modalidades, um polinucleotídeo compreende uma ligação fosfodiéster convencional ou uma ligação não convencional (por exemplo, uma ligação amida, como encontrado nos ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). O termo "ácido nucleico" refere-se a qualquer um ou mais segmentos de ácido nucleico, por exemplo, fragmentos de DNA ou RNA presentes em um polinucleotídeo. Por ácido nucleico ou polinucleotídeo "isolado" entende-se uma molécula de ácido nucleico, DNA ou RNA, que tenha sido removida do seu ambiente nativo. Por exemplo, um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo de Fator VIII contido em um vetor é considerado isolado para os fins da presente invenção. Outros exemplos de um polinucleotídeo isolado incluem polinucleotídeos recombinante mantidos em células hospedeiras heterólogas ou purificadas (parcialmente ou substancialmente) a partir de outros polinucleotídeos em uma solução. Moléculas de RNA isoladas incluem transcritos de RNA in vivo ou in vitro dos polinucleotídeos da presente invenção. Polinucleotídeos ou ácidos nucleicos isolados de acordo com a presente invenção incluem ainda estas moléculas produzidas sinteticamente. Além disso, um polinucleotídeo ou um ácido nucleico pode incluir elementos reguladores como promotores, potencializadores, sítios de ligação ao ribossoma, ou si-

nais de terminação da transcrição.

[00056] Como aqui utilizado, uma "região de codificação" ou "sequência de codificação" é uma porção de polinucleotídeo que consiste em códons traduzíveis em aminoácidos. Embora um "códon de terminação" (TAG, TGA, ou TAA) normalmente não seja traduzido em um aminoácido, este pode ser considerado como fazendo parte de uma região de codificação, mas quaisquer sequências flanqueadoras, por exemplo, promotores, sítios de ligação ao ribossoma, terminadores de transcrição, íntrons e semelhantes, não são parte de uma região de codificação. Os limites de uma região de codificação são geralmente determinados por um códon de início no terminal 5', que codifica o terminal amino do polipeptídeo resultante, e um códon de paragem da tradução no terminal 3', que codifica o terminal carboxil do polipeptídeo resultante. Duas ou mais regiões de codificação da presente invenção podem estar presentes em um único constructo de polinucleotídeo, por exemplo, em um único vetor, ou em constructos de polinucleotídeos separados, por exemplo, em (diferentes) vetores separados. Segue-se, então, que um único vetor pode conter apenas uma única região de codificação, ou compreende duas ou mais regiões de codificação, por exemplo, um único vetor pode codificar um domínio A separadamente e um domínio B de ligação como descrito abaixo. Além disso, um vetor, polinucleotídeo ou ácido nucleico da invenção pode codificar regiões de codificação heterólogas, fundidas ou não fundidas com um ácido nucleico que codifica um domínio de ligação da invenção. Regiões de codificação heterólogas incluem, sem limitação elementos ou motifs especializados, como um peptídeo sinal de secreção ou um domínio funcional heterólogo.

[00057] Algumas proteínas secretadas por células de mamíferos estão associadas com um peptídeo de sinal de secreção, que é clivado a partir da proteína madura, uma vez a exportação da cadeia de

proteína em crescimento em todo o retículo endoplasmático rugoso foi iniciada. Os especialistas na técnica estão cientes de que os peptídeos de sinal são geralmente fundidos com o N-terminal do polipeptídeo e são clivados a partir de polipeptídeo completo ou "de comprimento completo" para produzir uma forma secretada ou "madura" do polipeptídeo. Em certas modalidades, um peptídeo de sinal nativo ou um derivado funcional dessa sequência que retém a capacidade para dirigir a secreção do polipeptídeo que é operativamente associado com esta. Alternativamente, um peptídeo de sinal de mamífero heterólogo, por exemplo, um ativador do plasminogênio tecidual humano (TP A) ou peptídeo de sinal  $\beta$ -glucuronidase de camundongo, ou um derivado funcional do mesmo, podem ser usados.

[00058] O termo "a jusante" refere-se a uma sequência de nucleotídeos que está localizada 3' à uma sequência de nucleotídeos de referência. Em certas modalidades, as sequências nucleotídicas a jusante referem-se às sequências que se seguem ao ponto de partida da transcrição. Por exemplo, o códon de iniciação da tradução de um gene está localizado a jusante do local de início da transcrição.

[00059] O termo "a montante" refere-se a uma sequência de nucleotídeos que está localizada 5' à uma sequência de nucleotídeos de referência. Em certas modalidades, as sequências nucleotídicas a montante referem-se às sequências que estão localizadas no lado 5' da região de codificação ou um ponto de partida da transcrição. Por exemplo, a maioria dos promotores está localizada a montante do sítio do início da transcrição.

[00060] Como aqui utilizado, o termo "região reguladora" refere-se às sequências de nucleotídeos localizadas a montante (sequências não codificadoras 5'), dentro ou a jusante (sequências não codificadoras 3') de uma região de codificação, e que influenciam a transcrição, o processamento do RNA, a estabilidade, ou a tradução da região de

codificação associada. As regiões reguladoras podem incluir promotores, sequências líder de tradução, íntrons, sequências de reconhecimento de poliadenilação, locais de processamento de RNA, sítios de ligação efetoras e estruturas haste-alça. Se uma região de codificação se destina a expressão em uma célula eucariótica, um sinal de poliadenilação e sequência de terminação da transcrição estarão normalmente localizadas 3' da sequência de codificação.

[00061] Um polinucleotídeo que codifica um produto de gene, por exemplo, um polipeptídeo, pode incluir um promotor e/ou outros elementos de controle de transcrição ou de tradução operativamente associados com uma ou mais regiões de codificação. Em uma associação operável uma região que codifica para um produto do gene, por exemplo, um polipeptídeo, está associada com uma ou mais regiões reguladoras de tal modo que coloque a expressão do produto do gene sob a influência ou o controle das regiões reguladoras. Por exemplo, uma região de codificação e um promotor são "operativamente associadas", se a indução da função promotora resulta na transcrição de mRNA que codifica o produto do gene codificado pela região de codificação, e se a natureza da ligação entre o promotor e a região de codificação não interfere com a capacidade do promotor para dirigir a expressão do produto do gene ou interferir com a capacidade do molde de DNA ser transcrito. Outros elementos de controle da transcrição, além de um promotor, por exemplo, potencializadores, operadores, repressores, e sinais de terminação da transcrição, também podem ser operativamente associados com uma região de codificação para dirigir a expressão de produtos de genes direta.

[00062] Uma variedade de regiões de controle da transcrição é conhecida aos especialistas na técnica. Estas incluem, entre outras, as regiões de controle da transcrição que funcionam em células de vertebrados, como, entre outras, promotor e segmentos potencializadores



de citomegalovírus (o promotor precoce imediato, em conjugação com o íntron-A), vírus símio 40 (o promotor precoce), e retrovírus (como o vírus do sarcoma de Rous). Outras regiões de controle da transcrição incluem aquelas derivadas a partir de genes de vertebrados, como a actina, a proteína de choque térmico, o hormônio de crescimento bovino e  $\beta$ -globina de coelho, assim como outras sequências capazes de controlar a expressão de genes em células eucarióticas. Regiões de controle de transcrição adequadas adicionais incluem promotores e potencializadores específicos de tecidos, bem como promotores induzíveis por linfoquina (por exemplo, promotores induzíveis por interferons ou interleucinas).

[00063] Do mesmo modo, uma variedade de elementos de controle de tradução é conhecida dos especialistas na técnica. Estes incluem, entre outros, sítios de ligação ao ribossoma e códons de iniciação e de terminação da tradução, elementos derivados de picornavírus (particularmente um sítio interno de entrada do ribossoma, ou IRES, também referido como uma sequência CITE).

[00064] O termo "expressão", como aqui utilizado refere-se a um processo pelo qual um polinucleotídeo produz um produto de gene, por exemplo, um RNA ou um polipeptídeo. Este inclui, sem limitação, a transcrição do polinucleotídeo em RNA mensageiro (mRNA), RNA de transferência (tRNA), RNA hairpin pequeno (shRNA), pequeno RNA interferente (siRNA) ou qualquer outro produto de RNA e a tradução de um mRNA em polipeptídeo. Expressão produz um "produto do gene." Como aqui utilizado, um produto do gene pode ser um ácido nucleico, por exemplo, um RNA mensageiro produzido por transcrição de um gene, ou um polipeptídeo que é traduzido a partir de uma transcrição. Os produtos de gene aqui descritos incluem ainda ácidos nucleicos com modificações pós-transcricionais, por exemplo, de poliadenilação ou splicing, ou polipeptídeos com modificações pós-traducionais,

por exemplo, metilação, glicosilação, a adição dos lipídeos, associação com outras subunidades proteicas, ou clivagem proteolítica.

[00065] Um "vetor" refere-se a qualquer veículo para a clonagem e/ou transferência de um ácido nucleico em uma célula hospedeira. Um vetor pode ser um replicon ao qual outro segmento de ácido nucleico pode ser ligado de forma a provocar a replicação do segmento ligado. Um "replicon" designa qualquer elemento genético (por exemplo, plasmídeo, fago, cosmídeo, cromossomo, vírus) que funciona como uma unidade autônoma de replicação in vivo, isto é capaz de replicação sob o seu próprio controle. O termo "vetor" inclui ambos os veículos virais e não virais para introduzir o ácido nucleico em uma célula in vitro, ex vivo ou in vivo. Um grande número de vetores é conhecido e utilizado na técnica, incluindo, por exemplo, plasmídeos, vírus eucarióticos modificados, ou vírus bacterianos modificados. A inserção de um polinucleotídeo em um vetor adequado pode ser conseguida por ligação dos fragmentos de polinucleotídeos adequados em um vetor escolhido que tem extremidades coesivas complementares.

[00066] Os vetores podem ser modificados para codificar ou repórteres marcadores selecionáveis que permitam a seleção ou identificação de células que incorporaram o vetor. Expressão de marcadores selecionáveis ou repórteres permite a identificação e/ou seleção de células hospedeiras que incorporam e expressam outras regiões de codificação contidas no vetor. Exemplos de genes marcadores selecionáveis conhecidos e utilizados na técnica incluem: genes que fornecem resistência a ampicilina, estreptomicina, gentamicina, canamicina, higromicina, herbicida bialafos, sulfonamida, e semelhantes; e os genes que são utilizados como marcadores fenotípicos, ou seja, os genes reguladores de antocianina, gene da transferase de isopentanol, e semelhantes. Exemplos de repórteres conhecidos e utilizados na técnica incluem: luciferase (Luc), proteína fluorescente verde (GFP), cloranfe-

nicol acetiltransferase (CAT), -galactosidase (LacZ), -glucuronidase (GuS), e semelhantes. Os marcadores selecionáveis podem também ser considerados como repórteres.

[00067] O termo "plasmídeo" refere-se a um elemento extra-cromossômico frequentemente contendo um gene que não é parte do metabolismo central da célula, e normalmente sob a forma de moléculas de DNA de cadeia dupla circular. Tais elementos podem ser sequências de replicação autônoma, sequências integrando genoma, sequências de nucleotídeos ou de fagos, linear, circular, super-enrolado ou, DNA ou de RNA de cadeia simples ou dupla, derivado de qualquer fonte, nos quais um número de sequências de nucleotídeos foram unidas ou recombinadas em um único constructo que é capaz de introduzir um fragmento do promotor e a sequência de DNA para um produto de gene selecionado, juntamente com a sequência 3' apropriada não traduzida em uma célula.

[00068] Os vetores virais eucarióticos que podem ser usados incluem, entre outros, vetores de adenovírus, vetores de retrovírus, vetores de vírus adeno-associados, e os poxvírus, por exemplo, vetores de vírus de vaccínia, vetores de baculovírus, ou vetores de vírus de herpes. Os vetores não virais incluem plasmídeos, lipossomas, lipídeos carregados eletricamente (citofectinas), complexos de DNA-proteína, e biopolímeros.

[00069] Um "vetor de clonagem" refere-se a um "replicon", que é uma comprimento unitário de um ácido nucleico que replica sequencialmente e que compreende uma origem de replicação, como um plasmídeo, fago ou cosmídeo, ao qual outro segmento de ácido nucleico podem ser fixados de modo a provocar a replicação do segmento ligado. Certos vetores de clonagem são capazes de replicação em um tipo de célula, por exemplo, bactérias e expressão em outro, por exemplo, células eucarióticas. Os vetores de clonagem compreendem geralmen-

te uma ou mais sequências que podem ser utilizadas para a seleção de células compreendendo o vetor e/ou um ou mais sítios de clonagem múltiplos para inserção de sequências de ácido nucleico de interesse.

[00070] O termo "vetor de expressão" refere-se a um veículo concebido para permitir a expressão de uma sequência de ácido nucleico inserida na sequência de inserção em uma célula hospedeira. A sequência de ácido nucleico inserida é colocada em associação operável com regiões reguladoras, como descrito acima.

[00071] Os vetores são introduzidos em células hospedeiras através de métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo, transfecção, eletroporação, microinjeção, transdução, fusão celular, DEAE dextrano, precipitação com fosfato de cálcio, lipofecção (fusão de lisosoma), utilização de uma pistola de genes, ou um transportador de vetor de DNA.

[00072] "Cultura", "cultivar" e "cultura", como aqui utilizado, significam incubar células sob condições in vitro que permitam o crescimento celular ou divisão ou para manter as células em um estado vivo. "As células em cultura", como aqui utilizado, significa células que são propagadas in vitro.

[00073] Como aqui utilizado, o termo "polipeptídeo" pretende incluir um "polipeptídeo" singular, bem como "polipeptídeos" plurais e refere-se a uma molécula composta por monômeros (aminoácidos) linearmente ligados por ligações de amida (também conhecidas como ligações peptídicas). O termo "polipeptídeo" refere-se a qualquer cadeia ou cadeias de dois ou mais aminoácidos, e não se refere a um comprimento específico do produto. Assim, os peptídeos, os dipeptídeos, tripeptídeos, oligopeptídeos, "proteína", "cadeia de aminoácidos", ou qualquer outro termo utilizado para se referir a uma cadeia ou cadeias de dois ou mais aminoácidos, estão incluídas dentro da definição de

"polipeptídeo", e o termo "polipeptídeo" pode ser usado em vez de, ou de forma intercambiável com qualquer um destes termos. O termo "polipeptídeo" também tem a intenção de se referir aos produtos de modificações pós-expressão do polipeptídeo, incluindo, entre outros, glicosilação, acetilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos de proteção/bloqueadores conhecidos, clivagem proteolítica, ou por modificação por aminoácidos que não ocorrem de forma natural. Um polipeptídeo pode ser derivado de uma fonte biológica singular ou produzido por tecnologia recombinante, mas não é necessariamente traduzido a partir de uma sequência de ácido nucleico designado. Ele pode ser gerado de qualquer modo, incluindo por síntese química.

[00074] Um polipeptídeo "isolado" ou um fragmento, variante ou derivado do mesmo refere-se a um polipeptídeo que não está no seu meio natural. Não é necessário qualquer nível particular de purificação. Por exemplo, um polipeptídeo isolado pode simplesmente ser removido do seu ambiente nativo ou natural. Polipeptídeos produzidos de forma recombinante e proteínas expressas em células hospedeiras são considerados isolados para a finalidade da invenção, como são os polipeptídeos nativos ou recombinantes que foram separados, fracionados, ou parcialmente ou substancialmente purificados por qualquer técnica adequada.

[00075] Também incluídos na presente invenção estão os fragmentos ou variantes de polipeptídeos, e qualquer combinação dos mesmos. O termo "fragmento" ou "variante" quando se refere aos domínios de ligação de polipeptídeos ou moléculas de ligação da presente invenção incluem quaisquer polipeptídeos que retêm pelo menos algumas das propriedades (por exemplo, afinidade de ligação ao FcRn para um domínio de ligação ao FcRn ou variante Fc, a atividade de coagulação para uma variante FVIII, ou atividade de ligação do FVIII para o fragmento de VWF) do polipeptídeo de referência. Fragmentos de

polipeptídeos incluem fragmentos proteolíticos, bem como fragmentos de deleção, além de fragmentos de anticorpos específicos discutidos aqui em outro ponto, mas não incluem o polipeptídeo de comprimento total de ocorrência natural (ou polipeptídeo maduro). Variantes de domínios de ligação do polipeptídeo ou moléculas de ligação da presente invenção incluem fragmentos, como descrito acima, e também polipeptídeos com sequências de aminoácidos alteradas devido a substituições de aminoácidos, deleções ou inserções. As variantes podem ser de ocorrência natural ou não natural. As variantes que não ocorrem naturalmente podem ser produzidas utilizando técnicas de mutagênese conhecidas na técnica. Os polipeptídeos variantes podem compreender substituições, deleções ou adições de aminoácidos conservadoras ou não conservadoras.

[00076] O termo "fragmento de VWF" ou "fragmentos de VWF" aqui utilizado significa qualquer fragmento de VWF que interage com o FVIII e retém, pelo menos uma ou mais propriedades que são normalmente fornecidas ao FVIII por VWF de comprimento completo, por exemplo, impedindo a ativação prematura do FVIIIa, evitando a proteólise prematura, impedindo a associação com membranas fosfolipídicas que poderiam levar a eliminação prematura, a prevenção da ligação aos receptores de eliminação do FVIII que podem se ligar ao FVIII nu, mas não a FVIII ligado a VWF, e/ou estabilização das interações da cadeia pesada e da cadeia leve do FVIII.

[00077] Uma "substituição de aminoácidos conservadora" é aquela em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral semelhante. As famílias de resíduos de aminoácidos possuindo cadeias laterais semelhantes foram definidas na técnica, incluindo cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares sem carga (por exem-

plo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim, se um aminoácido em um polipeptídeo é substituído por outro aminoácido da mesma família de cadeias laterais, a substituição é considerada conservadora. Em outra modalidade, uma cadeia de aminoácidos pode ser conservadoramente substituída por uma cadeia estruturalmente semelhante que difere em ordem e/ou a composição dos membros da família de cadeias laterais.

[00078] Como é conhecido na técnica, "identidade de sequência" entre dois polipeptídeos é determinada pela comparação da sequência de aminoácidos de um polipeptídeo com a sequência de um segundo polipeptídeo. Quando aqui discutido, se qualquer polipeptídeo em particular é pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, ou 100% idêntico a outro polipeptídeo pode ser determinada utilizando métodos e programas de computador/software conhecidos na técnica, como, entre outros, o programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versão 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). O programa BESTFIT utiliza o algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), para encontrar o melhor segmento de homologia entre duas sequências. Quando se utiliza o BESTFIT ou qualquer outro programa de alinhamento de sequências para determinar se uma sequência em particular é, por exemplo, 95% idêntica a uma sequência de referência de acordo com a presente invenção, os parâmetros são ajustados, naturalmente, de tal modo que a percentagem de identidade é calculada sobre o comprimento total da sequência polipeptídica de referência e

que as lacunas na homologia de até 5% do número total de aminoácidos na sequência de referência sejam permitidas.

[00079] Como aqui utilizado, um "aminoácido correspondente a" ou um "equivalente de aminoácidos" em uma sequência de VWF ou uma sequência de proteína FVIII é identificada por alinhamento para maximizar a identidade ou semelhança entre uma primeira sequência de VWF ou FVIII e um segundo VWF ou sequência do FVIII. O número utilizado para identificar um aminoácido equivalente, com uma segunda sequência de VWF ou o FVIII é baseado no número utilizado para identificar o aminoácido correspondente na primeira sequência de VWF ou o FVIII.

[00080] Como aqui utilizado, o termo "sítio de inserção do" refere-se a uma posição de um polipeptídeo do FVIII, ou fragmento do mesmo, variante, ou derivado, que é imediatamente a jusante da posição em que uma fração heteróloga pode ser inserida. Um "sítio de inserção" é especificado como um número, o número é o número do aminoácido em FVIII nativo maduro (SEQ ID NO: 4) para a qual o sítio de inserção corresponde, o que é imediatamente N-terminal para a posição da inserção. Por exemplo, a frase "a3 compreende uma XTEN em um sítio de inserção que corresponde ao aminoácido 1656 da SEQ ID NO: 4" indica que a fração heteróloga está localizada entre dois aminoácidos correspondentes ao aminoácido 1656 e o aminoácido 1657 da SEQ ID NO: 4.

[00081] A frase "imediatamente a jusante de um aminoácido", como aqui utilizada refere-se à posição ao lado direito do grupo carboxil terminal do aminoácido. Da mesma forma, a frase "imediatamente a montante de um aminoácido" refere-se à posição ao lado direito do grupo amina terminal do aminoácido. Portanto, a frase "entre dois aminoácidos de um sítio de inserção" como aqui utilizada refere-se a uma posição em que é inserida uma XTEN ou qualquer outro polipeptídeo entre



dois aminoácidos adjacentes. Assim, as frases "inserido imediatamente a jusante de um aminoácido" e "inserido entre dois aminoácidos de um sítio de inserção" são utilizadas como sinônimos com "inserido em um sítio de inserção."

[00082] Os termos "inserido", "é inserido", "inserido em" ou termos gramaticalmente relacionados, como aqui utilizados referem-se à posição de uma XTEN em um polipeptídeo quimérico em relação à posição análoga no Fator VIII humano maduro nativo. Como aqui utilizado, os termos referem-se às características do polipeptídeo FVIII recombinante em relação ao FVIII humano nativo maduro, e não indicam, implicam em ou inferem quaisquer métodos ou processos pelos quais o polipeptídeo quimérico foi preparado. Por exemplo, em referência a um polipeptídeo quimérico aqui proporcionado, a frase "uma XTEN é inserida imediatamente a jusante do resíduo 745 do polipeptídeo do FVIII" significa que o polipeptídeo quimérico compreende uma XTEN imediatamente a jusante de um aminoácido que corresponde ao aminoácido 745 em Fator VIII humano maduro nativo, por exemplo, delimitado pelos aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 745 e 746 do Fator VIII humano maduro nativo.

[00083] Uma "fusão" ou proteína "quimérica" compreende uma primeira sequência de aminoácidos ligada a uma segunda sequência de aminoácidos com a qual não está naturalmente ligada na natureza. As sequências de aminoácidos que normalmente existem em proteínas separadas podem ser reunidas no polipeptídeo de fusão, ou as sequências de aminoácidos que existem normalmente na mesma proteína pode ser colocadas em um novo arranjo no polipeptídeo de fusão, por exemplo, fusão de um domínio do Fator VIII da invenção com um domínio Fc de Ig. Uma proteína de fusão é criada, por exemplo, por síntese química, ou através da criação e tradução de um polinucleotídeo em que as regiões peptídicas são codificadas na relação deseja-

da. Uma proteína quimérica pode compreender ainda uma segunda sequência de aminoácidos associada com a primeira sequência de aminoácidos por uma ligação covalente, ligação não peptídica, ou uma ligação não covalente.

[00084] Como aqui utilizado, o termo "meia-vida" refere-se a uma meia-vida biológica de um polipeptídeo particular in vivo. A meia-vida pode ser representada pelo tempo necessário para que metade da quantidade administrada a um sujeito seja eliminada da circulação e/ou de outros tecidos do animal. Quando uma curva de eliminação de um determinado polipeptídeo é construída como uma função do tempo, a curva é geralmente bifásica com uma fase  $\alpha$ - rápida e uma fase  $\beta$  mais longa. A fase  $\alpha$  representa tipicamente um equilíbrio do polipeptídeo Fc administrado entre o espaço intra e extra-vascular e é em parte, determinada pelo tamanho do polipeptídeo. A fase  $\beta$  representa tipicamente o catabolismo do polipeptídeo no espaço intravascular. Em algumas modalidades, FVIII e proteínas quiméricas compreendendo FVIII são monofásicas, e, portanto, não têm uma fase alfa, mas apenas a fase beta única. Por isso, em certas modalidades, a meia-vida do termo como aqui utilizado refere-se à meia-vida do polipeptídeo na fase  $\beta$ . A meia-vida de fase  $\beta$  típica de um anticorpo humano em seres humanos é de 21 dias.

[00085] O termo "ligado", como aqui utilizado refere-se a uma primeira sequência de aminoácidos ou sequência de nucleotídeos de forma covalente ou não covalentemente unida a uma segunda sequência de sequência de aminoácidos ou nucleotídeos, respectivamente. A primeira sequência de aminoácidos ou de nucleotídeos pode ser diretamente unida ou justaposta à segunda sequência de aminoácido ou nucleotídeos ou, alternativamente, uma sequência interveniente pode juntar-se covalentemente à primeira sequência com a segunda sequência. O termo "ligado" significa não só uma fusão de uma primei-

ra sequência de aminoácidos a uma segunda sequência de aminoácidos no C-terminal ou em N-terminal, mas também inclui a inserção de toda a primeira sequência de aminoácidos (ou a segunda sequência de aminoácidos) em quaisquer dois aminoácidos na segunda sequência de aminoácidos (ou a primeira sequência de aminoácidos, respectivamente). Em uma modalidade, a primeira sequência de aminoácidos pode ser ligada a uma segunda sequência de aminoácidos por uma ligação peptídica ou um ligante. A primeira sequência de nucleotídeos que pode ser ligada a uma segunda sequência de nucleotídeos por uma ligação fosfodiéster ou um ligante. O ligante pode ser um peptídeo ou um polipeptídeo (para cadeias de polipeptídeos) ou um nucleotídeo ou uma cadeia de nucleotídeos (para cadeias de nucleotídeos) ou qualquer fração química (para ambas as cadeias de polipeptídeo e de polinucleotídeos). O termo "ligado" também é indicado por um hífen (-).

[00086] Como aqui utilizado, o termo "associado com" refere-se a uma ligação covalente ou ligação não covalente formada entre uma primeira cadeia de aminoácido e uma segunda cadeia de aminoácidos. Em uma modalidade, o termo "associado com" significa uma ligação covalente, ligação não peptídica, ou uma ligação não covalente. Esta associação pode ser indicada por dois pontos, ou seja, (:). Em outra modalidade, isso significa uma ligação covalente, exceto uma ligação peptídica. Por exemplo, o aminoácido cisteína compreende um grupo tiol que pode formar uma ligação dissulfeto ou uma ponte com um grupo tiol de um segundo resíduo de cisteína. Na maioria das moléculas de IgG ocorrendo naturalmente, as regiões CH1 e CL estão associadas por uma ligação de dissulfeto e as duas cadeias pesadas estão associadas por duas ligações dissulfeto nas posições correspondentes a 239 e 242 utilizando o sistema de numeração de Kabat (posição 226 ou 229, sistema de numeração EU). Exemplos de ligações covalentes

incluem, entre outras, uma ligação peptídica, uma ligação de metal, uma ligação de hidrogênio, uma ligação dissulfeto, uma ligação sigma, uma ligação pi, uma ligação delta, uma ligação glicosídica, uma ligação agnóstica, uma ligação curvada, uma ligação dipolar, uma Back-bond Pi, uma ligação dupla, uma ligação tripla, uma ligação quádrupla vínculo, ligação quádrupla quádrupla, ligação quádrupla sêxtupla, conjugação, hiperconjugação, aromaticidade, hapticidade, ou anti-ligação. Exemplos não limitantes de ligação não covalente incluem uma ligação iônica (por exemplo, ligação cátion-pi ou ligação sal), uma ligação metal, uma ligação de hidrogênio (por exemplo, ligação di-hidrogênio, complexo hidratado, ligação de hidrogênio de baixa barreira, ou ligação de hidrogênio simétrica), força de van der Waals, força dispersão London, uma ligação mecânica, um vínculo de halogênio, aurofilicidade, intercalação, empilhamento, força entrópica, ou polaridade química.

[00087] O termo "híbrido monômero-dímero" aqui utilizado refere-se a uma proteína quimérica compreendendo uma primeira cadeia de polipeptídeos e uma segunda cadeia de polipeptídeos, que estão associados uns aos outros por uma ligação dissulfeto, em que a primeira cadeia compreende um fator de coagulação, por exemplo, Fator VIII, e uma primeira região Fc e a segunda cadeia compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em uma segunda região Fc sem o fator de coagulação. O constructo híbrido monômero-dímero é assim um híbrido compreendendo um aspecto monômero possuindo apenas um dos fatores de coagulação e um aspecto dímero possuindo duas regiões Fc.

[00088] Como aqui utilizado, o termo "sítio de clivagem" ou "sítio de clivagem enzimática" refere-se a um sítio reconhecido por uma enzima. Certos sítios de clivagem enzimáticas compreendem um local de processamento intracelular. Em uma modalidade, um polipeptídeo possui um

sítio de clivagem enzimática clivado por uma enzima que é ativada durante a cascata de coagulação, de tal modo que a clivagem de tais locais ocorre no local da formação do coágulo. Exemplos de tais sítios incluem, por exemplo, os que foram reconhecidos pela trombina, Fator XIa ou Fator Xa. Sítios de clivagem FXIa exemplificativos incluem, por exemplo, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 45) e SVSQTSKLTR (SEQ ID NO: 46). Sítios de clivagem de trombina exemplificativos incluem, por exemplo, DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 47), TTKIKPR (SEQ ID NO: 48), LVPRG (SEQ ID NO: 49) e ALRPR (aminoácidos 1 a 5 de SEQ ID NO: 50). Outros sítios de clivagem enzimáticos são conhecidos na técnica.

[00089] Como aqui utilizado, o termo "sítio de processamento" ou "sítio de processamento intracelular" refere-se a um tipo de sítio de clivagem enzimática em um polipeptídeo que é um alvo para as enzimas que funcionam após a tradução do polipeptídeo. Em uma modalidade, ditas enzimas funcionam durante o transporte a partir do lúmen de Golgi para o compartimento de trans-Golgi. Enzimas de processamento de polipeptídeos intracelulares clivam antes da secreção da proteína a partir da célula. Exemplos de ditos sítios de processamento incluem, por exemplo, os que são alvo de família de endopeptidases PACE/furina (onde PACE é um acrônimo para Enzima de Clivagem de Aminoácidos básicos Pareados). Estas enzimas estão localizadas na membrana de Golgi e clivam as proteínas no lado do terminal carboxil do motif de sequência Arg [qualquer resíduo] - (Lys ou Arg)-Arg. Como aqui utilizado, a família "furina" de enzimas inclui, por exemplo, PCSK1 (também conhecida como PC1/Pc3), PCSK2 (também conhecido como PC2), PCSK3 (também conhecida como furina ou PACE), PCSK4 (também conhecido como PC4), PCSK5 (também conhecida como PC5 ou PC6), PCSK6 (também conhecida como PACE4), ou PCSK7 (também conhecida como PC7/LPC, PC8, ou SPC7). Outros sítios de

processamento são conhecidos na técnica.

[00090] Em constructos que incluem mais de um processamento ou sítio de clivagem, será entendido que tais locais podem ser iguais ou diferentes.

[00091] O termo "Furina" refere-se às enzimas correspondentes a EC N.º 3.4.21.75. A furina é convertase de pró-proteína tipo subtilisina, que também é conhecida como PACE (Enzima de Clivagem de Aminoácidos básicos Emparelhados). Furina exclui seções de proteínas precursoras inativas para convertê-las em proteínas biologicamente ativas. Durante o seu transporte intracelular, pró-peptídeo do VWF pode ser clivado a partir da molécula de VWF madura por uma enzima furina. Em algumas modalidades, furina cliva D1D2 do D'D3 de VWF. Em outras modalidades, uma sequência de nucleotídeos que codifica furina pode ser expressa juntamente com a sequência de nucleotídeos que codifica um fragmento de VWF de modo que os domínios D1D2 podem ser clivados intracelularmente por furina.

[00092] Em constructos que incluem mais de um sítio de processamento ou clivagem, será entendido que tais sítios podem ser iguais ou diferentes.

[00093] Um "ligante processável" como aqui utilizado refere-se a um ligante que compreende, pelo menos um sítio de processamento intracelular, o qual é descrito aqui em outro local.

[00094] Distúrbios hemostáticos, como aqui utilizado, significam uma condição herdada geneticamente ou adquirida caracterizada por uma tendência para hemorragia, espontaneamente ou como resultado de um trauma, devido a uma diminuição da capacidade ou incapacidade para formar um coágulo de fibrina. Exemplos de tais distúrbios incluem a hemofilias. As três formas principais são hemofilia A (deficiência do Fator VIII), hemofilia B (deficiência do fator IX ou "doença de Christmas") e hemofilia C (deficiência do fator XI, tendência de san-

gramento leve). Outros distúrbios de hemostasia incluem, por exemplo, doença de Von Willebrand, a deficiência do fator XI (deficiência PTA), deficiência de Fator XII, deficiências ou anormalidades estruturais em fibrinogênio, protrombina, Fator V, Fator VII, Fator X, ou Fator XIII, síndrome de Bernard-Soulier, que é um defeito ou deficiência em GPIb. GPIb, o receptor para VWF, pode estar com defeito e levar à falta de formação de coágulos primários (hemostasia primária) e tendência de aumento de sangramento), e trombastenia de Glanzman e Naegeli (trombastenia de Glanzmann). Em pacientes com insuficiência hepática (formas agudas e crônicas), há insuficiente produção de fatores de coagulação pelo fígado; isso pode aumentar o risco de sangramento.

[00095] As moléculas quiméricas da invenção podem ser utilizadas profilaticamente. Como aqui utilizado, o termo "tratamento profilático" refere-se à administração de uma molécula antes de um episódio hemorrágico. Em uma modalidade, o sujeito que precisa de um agente hemostático geral é submetido, ou está prestes a passar por uma cirurgia. A proteína quimérica da invenção pode ser administrada antes ou depois de cirurgia como um profilático. A proteína quimérica da invenção pode ser administrada durante ou após a cirurgia para controlar um episódio de sangramento agudo. A cirurgia pode incluir, entre outras, transplante do fígado, a ressecção hepática, procedimentos dentários, ou transplante de células-tronco.

[00096] A proteína quimérica da invenção é também usada para tratamento sob demanda. O termo "tratamento sob demanda" refere-se à administração de uma molécula quimérica em resposta aos sintomas de um episódio de sangramento ou antes de uma atividade que pode provocar sangramento. Em um aspecto, o tratamento sob demanda pode ser dado a um indivíduo quando hemorragia começa, como depois de uma lesão, ou quando a hemorragia é esperada, co-

mo antes da cirurgia. Em outro aspecto, o tratamento sob demanda pode ser dado antes da atividade que aumentam o risco de hemorragia, como desportos de contato.

[00097] Como aqui utilizado, o termo "sangramento agudo" refere-se a um episódio de sangramento independentemente da causa subjacente. Por exemplo, um sujeito pode ter trauma, uremia, um distúrbio de doença hemorrágica hereditária (por exemplo, deficiência do fator VII), um distúrbio de plaquetas, ou resistência devido ao desenvolvimento de anticorpos de fatores de coagulação.

[00098] Tratar, tratamento, tratando, como usado aqui referem-se a, por exemplo, redução da gravidade de uma doença ou condição; a redução na duração de um curso da doença; a melhoria de um ou mais sintomas associados com uma doença ou condição; o fornecimento de um efeito benéfico a um sujeito com uma doença ou condição, sem necessariamente a cura da doença ou condição, ou a profilaxia de um ou mais sintomas associados com uma doença ou condição. Em uma modalidade, o termo "tratar" ou "tratamento" significa a manutenção de um nível mínimo de FVIII pelo menos cerca de 1 IU/dL, 2 IU/dL, 3 IU/dL, 4 IU/dL, 5 IU/dL, 6 IU/dL, 7 IU/dL, 8 IU/dL, 9 IU/dL, 10 IU/dL, 11 IU/dL, 12 IU/dL, 13 IU/dL, 14 IU/dL, 15 IU/dL, 16 IU/dL, 17 IU/dL, 18 IU/dL, 19 IU/dL, ou 20 IU/dL em um sujeito por administração de uma proteína quimérica ou um fragmento de VWF da invenção. Em outra modalidade, o tratamento ou tratar significa a manutenção de um nível mínimo do FVIII entre cerca de 1 e cerca de 20 IU/dL, cerca de 2 e cerca de 20 IU/dL, cerca de 3 e cerca de 20 IU/dL, cerca de 4 e cerca de 20 IU/dL, cerca de 5 e cerca de 20 IU/dL, cerca de 6 e cerca de 20 IU/dL, cerca de 7 e cerca de 20 IU/dL, cerca de 8 e cerca de 20 IU/dL, cerca de 9 e cerca de 20 IU/dL, ou cerca de 10 e cerca de 20 IU/dL. O tratamento ou tratar uma doença ou condição pode também incluir a manutenção da atividade do FVIII em um sujeito a um nível compará-



vel com pelo menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, ou 20% da atividade do FVIII em um sujeito não hemofílico. O nível mínimo necessário para a o tratamento pode ser medido por um ou mais métodos conhecidos e pode ser ajustado (aumentado ou diminuído) para cada pessoa.

### PROTEÍNAS QUIMÉRICAS

[00099] A presente invenção é dirigida a estender a meia-vida de uma proteína do Fator VIII utilizando um fragmento de VWF e uma sequência XTEN por prevenção ou inibição de um fator limitante de meia-vida do FVIII, ou seja, o VWF endógeno, de se associar com a proteína FVIII. VWF endógeno se associa com cerca de 95% a cerca de 98% do FVIII em complexos não covalentes. Enquanto VWF endógeno é um fator limitante da meia-vida do FVIII, VWF endógeno ligada a uma proteína FVIII é também conhecido por proteger o FVIII de várias maneiras. Por exemplo, o VWF de comprimento total (como um multímero possuindo cerca de 250 kDa) pode proteger o FVIII a partir de clivagem de protease e de ativação do FVIII, estabiliza a cadeia pesada e/ou cadeia leve de FVIII, e impede a eliminação do FVIII por receptores limpadores. Mas, ao mesmo tempo, VWF endógeno limita a meia-vida do FVIII por prevenção da pinocitose e eliminando o complexo FVIII -VWF a partir do sistema através da via de eliminação de VWF. Acredita-se, embora não ligado por uma teoria, que o VWF endógeno é um fator limitante da meia-vida que impede a meia-vida de uma proteína FVIII fundida com um extensor de meia-vida de ser maior do que cerca de duas vezes aquela do tipo selvagem do FVIII. Portanto, a presente invenção é dirigida para prevenir ou inibir a interação entre VWF endógeno e uma proteína FVIII utilizando um fragmento de VWF, aumentando assim a meia-vida da proteína FVIII, utilizando uma sequência de XTEN sozinha ou uma sequência XTEN em combinação

com uma região constante de Ig ou uma fração da mesma. A sequência XTEN pode ser ligada à proteína FVIII ou ao fragmento de VWF. A proteína FVIII associada com o fragmento de VWF é assim, eliminada da circulação mais lentamente por um ou mais receptores de eliminação de VWF e, em seguida, pode ter a extensão da meia-vida completa da sequência XTEN ou a sequência XTEN em combinação de região constante de Ig, como em comparação com tipo selvagem do FVIII ou uma proteína FVIII sem o fragmento de VWF.

[000100] Em uma modalidade, um fragmento de VWF está associado (ou ligado) com a proteína FVIII por uma ligação covalente ou uma ligação não covalente. Em alguns casos, no entanto, o bloqueio físico ou associação química (por exemplo, ligação não covalente) entre o fragmento de VWF e a proteína FVIII pode não ser suficientemente forte para proporcionar um complexo estável compreendendo a proteína FVIII e o fragmento de VWF, na presença de VWF endógeno. Por exemplo, um fragmento de VWF formando uma ligação covalente com uma proteína FVIII sem quaisquer outras ligações podem ser facilmente dissociado in vivo da proteína FVIII na presença de VWF endógeno, substituindo o fragmento de VWF (por exemplo, VWF recombinante, ou seja, rVWF) com VWF endógeno. Portanto, a proteína FVIII não covalentemente ligada ao VWF endógeno poderia passar pela via de eliminação de VWF e ser prontamente eliminada do sistema. A fim de evitar a dissociação do fragmento de VWF com a proteína FVIII, em algumas modalidades, a associação ou a ligação entre a proteína FVIII e o fragmento de VWF é uma ligação covalente, por exemplo, uma ligação peptídica, um ou mais aminoácidos, ou uma ligação dissulfeto. Em certas modalidades, a associação (ou seja, a ligação) entre o adjuvante e a fração de proteína FVIII é uma ligação peptídica ou um ligante entre a proteína FVIII e o fragmento de VWF ("ligante FVIII/VWF"). Exemplos não limitativos do ligante são aqui descritas em

outro local. Em algumas modalidades, o fragmento de VWF é um polipeptídeo que compreende, que consiste essencialmente em, ou consiste em, pelo menos cerca de 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000, 4000 ou aminoácidos. Exemplos não limitativos do fragmento de VWF são aqui descritos em outro local.

[000101] Em certas modalidades, o fragmento de VWF quimicamente (por exemplo, não covalente) liga-se a ou fisicamente bloqueia um ou mais sítios de ligação de VWF em uma proteína FVIII. O sítio de ligação de VWF em uma proteína FVIII está localizado dentro do domínio A3 ou domínio C2 da proteína FVIII. Em ainda outras modalidades, o sítio de ligação de VWF em uma proteína FVIII está localizado dentro do domínio A3 e domínio C2. Por exemplo, o sítio de ligação de VWF em uma proteína FVIII pode corresponder aos aminoácidos 1669 a 1689 e/ou 2303 a 2332 de SEQ ID NO: 4 [FVIII maduro de comprimento completo].

[000102] A invenção também proporciona uma proteína quimérica (compreendendo uma proteína FVIII e um fragmento de VWF) compreendendo ainda uma ou mais sequências de XTEN, que fornecem propriedades adicionais de extensão da meia-vida. As uma ou mais sequências de XTEN podem ser inseridas no interior da proteína FVIII ou o fragmento de VWF ou ligadas ao N-terminal ou o C-terminal da proteína FVIII ou o fragmento de VWF. A invenção também inclui uma proteína FVIII ligada a uma sequência XTEN (uma primeira fração que estende a meia-vida) e uma região constante de Ig ou uma fração da mesma (uma segunda fração que estende a meia-vida), de modo que as duas frações que estendem a meia-vida estendem a meia-vida da proteína FVIII por dois mecanismos diferentes.

[000103] Em algumas modalidades, uma proteína quimérica compreende uma proteína FVIII ligada a uma primeira região constante de

Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, um primeiro parceiro de ligação ao FcRn), um fragmento de VWF ligado a uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, um segundo parceiro de ligação ao FcRn), e uma ou mais sequências de XTEN inseridas ou ligadas à proteína FVIII ou o fragmento de VWF, em que o fragmento de VWF impede o fator limitante da meia-vida do FVIII (por exemplo, VWF endógeno) de ligação à proteína FVIII, em que as primeira e segunda regiões constantes de Ig ou frações das mesmas formam uma ligação covalente, por exemplo, uma ligação dissulfeto, e as uma ou mais sequências de XTEN estendem a meia-vida da proteína FVIII.

[000104] Em certas modalidades, uma proteína quimérica da invenção compreende uma proteína FVIII ligada a um fragmento de VWF por um ligante opcional (ou seja, ligante FVIII/VWF) e uma ou mais sequências de XTEN inseridas ou ligadas à proteína FVIII ou o fragmento de VWF, em que o fragmento de VWF impede o fator limitante da meia-vida do FVIII (por exemplo, o VWF endógeno) de se ligar à proteína FVIII e as uma ou mais sequências XTEN estendem a meia-vida da proteína FVIII. Em um aspecto, o ligante opcional (ligante FVIII/VWF) compreende um motif de reconhecimento sortase. Em outro aspecto, o ligante opcional (ligante FVIII/VWF) compreende um sítio clivável. Exemplos da ligante de clivagem (isto é um ligante contendo um ou mais sítios de clivagem) são aqui descritas em outro local.

[000105] A proteína quimérica da presente invenção inclui, entre outros:

(1) um fragmento de VWF que compreende um domínio D' e um domínio D3, uma sequência XTEN, e FVIII, em que a sequência XTEN está ligada ao fragmento de VWF;

(2) uma proteína FVIII, uma sequência XTEN, e uma região constante de Ig ou uma fração da mesma, em que a proteína FVIII é

ligada a uma sequência XTEN e região constante de Ig ou a uma fração da mesma, ou

(3) uma proteína FVIII, uma sequência XTEN, e um fragmento de VWF, em que a sequência XTEN está ligada à proteína FVIII no C-terminal ou no N-terminal ou inserido imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos (por exemplo, um ou mais sítios de inserção de XTEN) do FVIII, e o fragmento de VWF e proteína FVIII estão associadas umas com as outras.

(1) Fragmento de Fator de Von Willebrand (VWF) ligado a XTEN, e FVIII  
[000106] A presente invenção é dirigida a uma proteína quimérica compreendendo (i) um fragmento de VWF compreendendo um domínio D' e um domínio D3 de VWF, (ii) uma sequência de XTEN, e (iii) uma proteína FVIII, em que (i), (ii) e (iii) são ligados ou associados com cada outro. O fragmento de VWF ligado à sequência XTEN, como uma parte de uma proteína quimérica na presente invenção, associa-se com a proteína FVIII, prevenindo assim ou inibindo a interação entre VWF endógeno e a proteína FVIII. Em certas modalidades, o fragmento de VWF, o qual é capaz de prevenir ou inibir a ligação da proteína FVIII com VWF endógeno, pode ao mesmo tempo ter pelo menos uma propriedade de proteção do FVIII tipo o VWF. Exemplos de propriedades de proteção de FVIII tipo VWF incluem, entre outros, proteção do FVIII da clivagem por protease e ativação do FVIII, estabilizando a cadeia pesada e/ou a cadeia leve do FVIII, e impedindo a eliminação do FVIII por receptores limpadores. Como resultado, o fragmento de VWF pode impedir a eliminação da proteína FVIII através da via de eliminação de VWF, reduzindo assim a eliminação do FVIII a partir do sistema circulatório. Em algumas modalidades, os fragmentos de VWF da presente invenção ligam-se a, ou estão associados a uma proteína do FVIII e/ou fisicamente ou quimicamente bloqueiam o sítio de ligação de VWF na proteína FVIII. A proteína FVIII associada com o

fragmento de VWF é assim, eliminada da circulação mais lentamente, em comparação com a de tipo selvagem do FVIII ou o FVIII não associado com o fragmento de VWF.

[000107] Em uma modalidade, a invenção é dirigida a uma proteína quimérica compreendendo (i) um fragmento de VWF que compreende o domínio D' e o domínio D3 de VWF, (ii) uma sequência de XTEN, e (iii) uma proteína FVIII, em que a sequência XTEN está ligada ao fragmento de VWF (por exemplo, (a1) V-X ou (a2) X-V, em que V compreende um fragmento de VWF e X compreende uma sequência de XTEN), e o fragmento de VWF está ligado ou associado com a proteína FVIII. Em outra modalidade, o fragmento de VWF e a sequência XTEN podem ser ligados por um ligante (por exemplo, (a3) V-L-X ou (a4) X-L-V) ou uma ligação peptídica. O ligante pode ser um ligante clivável, por exemplo, um ligante clivável por trombina, que pode ser clivado no sítio de coagulação. Em outras modalidades, o fragmento de VWF, a sequência XTEN, e a proteína FVIII são colocadas em uma única cadeia de polipeptídeos. Em ainda outras modalidades, a proteína quimérica compreende duas cadeias de polipeptídeos, uma primeira cadeia que compreende o fragmento de VWF e a sequência XTEN e uma segunda cadeia compreendendo a proteína FVIII. Em ainda outras modalidades, a proteína quimérica compreende três cadeias de polipeptídeos, uma primeira cadeia que compreende o fragmento de VWF e a sequência XTEN, uma segunda cadeia compreendendo uma cadeia leve do FVIII e uma terceira cadeia compreendendo uma cadeia pesada do FVIII, em que a primeira cadeia e a segunda cadeia são associadas umas com as outras (por exemplo, ligação covalente, por exemplo, ligação dissulfeto), e a segunda corrente e a terceira corrente são associadas umas com as outras (por exemplo, ligação de metal). Em ainda outras modalidades, a sequência XTEN pode ser ligada ao N-terminal ou o C-terminal do fragmento de VWF ou inserida

imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos do fragmento de VWF.

[000108] Em certas modalidades, uma proteína quimérica da invenção compreende uma fórmula compreendendo:

- (a) V-X-FVIII,
- (b) FVIII-X-V,
- (c) V-X:FVIII,
- (d) X-V :FVIII,
- (e) FVIII:V-X,
- (f) FVIII:X-V, ou
- (a5) X-V-FVIII,

em que V compreende um fragmento de VWF,

X compreende uma ou mais sequências de XTEN,

FVIII compreende uma proteína FVIII;

(-) representa uma ligação peptídica ou um ou mais aminoácidos; e

(:) é uma associação química ou uma associação física. Em uma modalidade, (:) representa uma associação química, por exemplo, pelo menos uma ligação não peptídica. Em outra modalidade, a associação química, isto é (:) é uma ligação covalente. Em outras modalidades, a associação química, isto é (:) é uma interação não covalente, por exemplo, uma interação iônica, uma interação hidrofóbica, uma interação hidrofílica, uma interação de Van der Waals, ou uma ligação de hidrogênio. Em outras modalidades, (:) é uma ligação covalente não peptídica. Em ainda outras modalidades, (:) é uma ligação peptídica. Em ainda outras modalidades, (:) representa uma associação física entre duas sequências, em que uma fração de uma primeira sequência está em estreita proximidade a uma segunda sequência de tal modo que a primeira sequência protege ou bloqueia uma fração da segunda sequência de interagir com outra fração e, além disso, que esta asso-

ciação física é mantida, sem permitir que a segunda sequência interaja com outras frações. A orientação das fórmulas polipeptídicas aqui referidas é a partir de N-terminal (esquerda) para C-terminal (à direita). Por exemplo, a fórmula V-X-FVIII significa fórmula NH<sub>2</sub>-V-X-FVIII-COOH. Em uma modalidade, as fórmulas aqui descritas podem compreender quaisquer sequências adicionais entre as duas frações. Por exemplo, a fórmula V-X-FVIII pode ainda compreender quaisquer sequências na região N-terminal de V entre V e X, entre X e FVIII, ou em C-terminal do FVIII, a menos que especificado de outra forma. Em outra modalidade, o hífen (-) indica uma ligação peptídica.

[000109] Em outras modalidades, uma proteína quimérica da invenção compreende uma fórmula compreendendo:

- (a) V(X1)-X2-FVIII,
- (b) FVIII-X2-V(X1),
- (c) V(X1):FVIII,
- (d) FVIII:V(X1), ou
- (a5) X2-V(X1)-FVIII,

em que V (X1) compreende um fragmento de VWF e uma primeira sequência XTEN (X1), em que a sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos do fragmento de VWF,

X2 compreende uma ou mais sequências XTEN opcionais,

FVIII compreende uma proteína FVIII;

(-) é uma ligação peptídica ou um ou mais aminoácidos; e

(:) é uma associação química ou uma associação física.

[000110] Em algumas modalidades, uma proteína quimérica que compreende (i) um fragmento de VWF que compreende um domínio D' e um domínio D3 de VWF, (ii) uma sequência de XTEN, (iii) uma proteína FVIII, (iv) um primeiro ligante opcional, e (v) um segundo ligante opcional, em que a sequência XTEN está ligada ao fragmento de VWF e/ou à proteína FVIII pelo ligante. Em determinadas modalidades, uma



proteína quimérica compreende uma fórmula compreendendo:

- (b1) V-L1-X-L2-FVIII,
- (b2) FVIII-L2-X-L1-V,
- (b3) V-L1-X:FVIII,
- (b4) X-L1-V:FVIII,
- (b5) FVIII:V-L1-X,
- (b6) FVIII:X-L1-V,
- (b7) X-L1-V-L2-FVIII, ou
- (b8) FVIII-L2-V-L1-X,

em que V compreende um fragmento de VWF,

X compreende uma ou mais sequências de XTEN,

FVIII compreende uma proteína FVIII,

L1 compreende um primeiro ligante opcional, por exemplo, um primeiro ligante clivável,

L2 compreende um segundo ligante opcional, por exemplo, um segundo ligante clivável ou um ligante processável opcional;

(-) é uma ligação peptídica ou um ou aminoácidos; e

(:) é uma associação química ou uma associação física. Em uma modalidade, (:) representa uma associação química, por exemplo, pelo menos uma ligação não peptídica. Em outra modalidade, a associação química, isto é (:) é uma ligação covalente. Em outras modalidades, a associação química, isto é (:) é uma interação não covalente, por exemplo, uma interação iônica, uma interação hidrofóbica, uma interação hidrofílica, uma interação de Van der Waals, ou uma ligação de hidrogênio. Em outras modalidades, (:) é uma ligação covalente não peptídica. Em ainda outras modalidades, (:) é uma ligação peptídica. Em ainda outras modalidades, (:) representa uma associação física entre duas sequências, em que uma fração de uma primeira sequência está em estreita proximidade a uma segunda sequência de tal modo que a primeira sequência protege ou bloqueia uma fração da segunda sequên-

cia de interagir com outra fração molecular, e ainda que esta associação física é mantida, sem permitir que a segunda sequência interaja com outras frações. A orientação das fórmulas polipeptídicas aqui referida é a partir de N-terminal (esquerda) para C-terminal (à direita). Por exemplo, a fórmula (b1) V-L1-X-L2-FVIII significa fórmula NH<sub>2</sub>-V-L1-X-L2-FVIII-COOH. Em uma modalidade, as fórmulas aqui descritas podem compreender quaisquer sequências adicionais entre as duas frações. Em outra modalidade, o hífen (-) indica uma ligação peptídica.

[000111] Outro aspecto da presente invenção é proporcionar uma proteína quimérica FVIII tendo reduzida ou nenhuma interação com um fator limitante de meia-vida do FVIII, por exemplo, o VWF endógeno, e ao mesmo tempo maximizar a meia-vida da proteína FVIII utilizando uma sequência XTEN (um primeiro extensor de meia-vida) em combinação com um segundo extensor de meia-vida ou uma fração de fornecimento de uma ligação covalente entre a proteína FVIII e o fragmento de VWF, por exemplo, uma região constante de Ig ou uma fração da mesma. Em uma modalidade, uma proteína quimérica da invenção compreende (i) um fragmento de VWF que compreende um domínio D' e um domínio D3 de VWF, (ii) uma sequência de XTEN, (iii) uma proteína FVIII, e (iv) uma região constante de Ig ou uma fração da mesma (também aqui referida como F), em que (1) o fragmento de VWF está ligado à sequência de XTEN por um ligante opcional, por exemplo, um ligante clivável, (2) o fragmento de VWF está associado com, ou ligado à proteína FVIII por um ligante adicional opcional, por exemplo, um ligante clivável, e (3) uma região constante de Ig ou uma fração da mesma é ligada ao fragmento de VWF, a sequência XTEN, ou a proteína FVIII. Em outra modalidade, uma proteína quimérica da invenção compreende (i) um fragmento de VWF que compreende um domínio D' e um domínio D3 de VWF, (ii) uma sequência de XTEN, (iii) uma proteína FVIII, (iv) uma região constante de Ig ou uma fração da

mesma (F1 ou uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma), e (v) uma região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma (F2 ou uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma), em que (1) o fragmento de VWF é ligado à sequência de XTEN por um ligante opcional, por exemplo, um ligante clivável, (2) a sequência XTEN ou o fragmento de VWF é ligada à região constante de Ig ou uma fração da mesma, (3) o FVIII é ligado à região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma, e (4) a região constante de Ig ou uma fração da mesma está associada ou ligada à região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma. Em uma modalidade, a associação ou a ligação entre as duas regiões constantes de Ig ou uma fração da mesma é uma ligação covalente, por exemplo, uma ligação dissulfeto. Em outra modalidade, a associação ou a ligação entre as duas regiões constantes de Ig ou uma fração da mesma é um ligante processável, em que o ligante é processável intracelularmente processado por uma protease. Por exemplo, a proteína quimérica compreende uma fórmula compreendendo:

- (g) V-L2-X-L1-F1: FVIII-L3-F2;
- (h) V-L2-X-L1-F1:F2-L3-FVIII;
- (i) F-L1-X-L2-V: FVIII-L3-F2;
- (j) F-L1-X-L2-V:F2-L3-FVIII;
- (k) V-L2-X-L1-F1-L4-FVIII-L3-F2;
- (l) F2-L3-FVIII-L4-F1-L1-X-L2-V;
- (m) FVIII-L2-F2-L4-V-L2-X-L1-F1; ou
- (n) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L2-FVIII,

em que V compreende um fragmento de VWF,

cada um de L1 e L3 compreende um ligante opcional,

L2 compreende um ligante opcional, por exemplo, um ligante clivável,

L4 é um ligante opcional, por exemplo, um ligante proces-

sável

FVIII compreende uma proteína FVIII,

X compreende uma ou mais sequências de XTEN,

F1 compreende uma região constante de Ig opcional ou uma fração da mesma,

F2 compreende uma região constante de Ig opcional adicional ou uma fração da mesma;

(-) é uma ligação peptídica ou um ou mais aminoácidos; e

(:) é uma associação química ou uma associação física.

[000112] Em algumas modalidades, a proteína FVIII em quaisquer constructos ou fórmulas aqui descritos podem compreender ainda pelo menos uma, pelo menos duas, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, ou pelo menos seis sequências XTEN, cada uma das sequências XTEN inserida imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos na proteína FVIII ou ligadas ao N-terminal ou o C-terminal da proteína FVIII. Os exemplos não limitativos dos sítios de inserção XTEN são divulgados em outro local aqui.

[000113] Em uma modalidade, (:) representa uma associação química, por exemplo, pelo menos uma ligação não peptídica. Em outra modalidade, a associação química, isto é (:) é uma ligação covalente. Em outras modalidades, a associação química, isto é (:) é uma interação não covalente, por exemplo, uma interação iônica, uma interação hidrofóbica, uma interação hidrofílica, uma interação de Van der Waals, ou uma ligação de hidrogênio. Em outras modalidades, (:) é uma ligação covalente não peptídica. Em ainda outras modalidades, (:) é uma ligação peptídica. Em ainda outras modalidades, (:) representa uma associação física entre duas sequências, em que uma fração de uma primeira sequência está em estreita proximidade a uma segunda sequência de tal modo que a primeira sequência protege ou bloqueia uma fração da segunda sequência de interagir com outra fração e, além

disso, que esta associação física é mantida, sem permitir que a segunda sequência interaja com outras frações. A orientação das fórmulas polipeptídicas aqui referidas é a partir de N-terminal (esquerda) à C-terminal (à direita). Por exemplo, a fórmula (n) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L2-FVIII significa fórmula NH<sub>2</sub>-F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L2-FVIII-COOH. Em uma modalidade, as fórmulas aqui descritas podem compreender quaisquer sequências adicionais entre as duas frações. Em outra modalidade, o hífen (-) indica uma ligação peptídica.

[000114] Em uma modalidade, uma ou ambas de região constante de Ig ou uma fração da mesma (por vezes aqui indicado por "F" ou "F1") e a região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma (por vezes aqui indicado por "F2") ligada ao fragmento de VWF ou a proteína FVIII pode estender a meia-vida do fragmento de VWF, a proteína FVIII, ou ambos. Em outra modalidade, um par de regiões constantes de Ig ou uma fração da mesma (por vezes aqui indicado por "F" ou "F1") e a região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma (por vezes aqui indicado por "F2"), cada uma das que estão ligadas ao fragmento de VWF e proteína FVIII, proporciona uma ligação mais forte do que a ligação não covalente entre a proteína FVIII e o fragmento de VWF, ou seja, uma ligação covalente, por exemplo, uma ligação dissulfeto, prevenindo assim VWF endógeno de substituir o fragmento de VWF in vivo. F1 ou F2 podem compreender uma região Fc ou um parceiro de ligação FcRn. Em outras modalidades, um ou ambos de F1 e F2 ligados ao fragmento de VWF e/ou a proteína FVIII formam uma ligação covalente (por exemplo, uma ligação dissulfeto) entre F1 e F2, colocando assim o fragmento de VWF e proteína FVIII em estreita proximidade para evitar a interação da proteína FVIII com o fragmento de VWF. Em algumas modalidades, F1 e F2 são iguais ou diferentes. Exemplos de F1 e F2 não limitativos podem ser selecionados a partir do grupo que consiste em um domínio CH1, um domínio CH2,

um domínio CH3, um domínio CH4, um domínio de dobradiça, quaisquer fragmentos funcionais, derivados ou os seus análogos, e duas ou mais de suas combinações. Em uma modalidade, F1, F2, ou ambos compreendem pelo menos um domínio CH1, pelo menos um domínio CH2, pelo menos um domínio CH3, pelo menos um domínio CH4, ou fragmentos funcionais, derivados ou os análogos dos mesmos. Em outra modalidade, F1, F2, ou ambos compreendem pelo menos um domínio de dobradiça ou fração do mesmo e pelo menos um domínio CH2 ou uma fração do mesmo (por exemplo, na orientação dobradiça-CH2). Em outras modalidades, F1, F2, ou ambos compreendem pelo menos um domínio CH2 ou fração do mesmo e pelo menos um domínio CH3 ou uma fração do mesmo (por exemplo, na orientação CH2-CH3). Exemplos da combinação incluem, entre outros, um domínio CH2, um domínio CH3, e um domínio em dobradiça, que também são conhecidos como uma região Fc (ou domínio Fc), por exemplo, uma primeira região Fc ou um primeiro parceiro de ligação ao FcRn para F1 e uma segunda região Fc ou um segundo parceiro de ligação FcRn para F2. Em outras modalidades, F1 está ligada ao fragmento de VWF por um ligante, e/ou F2 é ligado à proteína FVIII por um ligante. Em algumas modalidades, F1 e F2/ou compreendem, consistem essencialmente em, ou consistem em uma região de dobradiça. Outros exemplos não limitativos das regiões Fc ou os parceiros de ligação ao FcRn são aqui descritas em outro local.

[000115] Em determinadas modalidades, uma proteína quimérica da invenção compreende duas cadeias de polipeptídeos, uma primeira cadeia de polipeptídeos compreende, que consiste essencialmente em, ou consiste em um fragmento de VWF que compreende um domínio D' e um domínio D3, uma sequência XTEN, uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, uma primeira região Fc), e um ligante opcional entre o fragmento de VWF e a se-

quência XTEN ou a sequência XTEN ou a primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma e uma segunda cadeia de polipeptídeos que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste em uma proteína FVIII e uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, uma segunda região Fc). O ligante entre o fragmento de VWF e a primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma pode ser um ligante clivável, por exemplo, um ligante clivável por trombina, que pode ser clivada no sítio de coagulação. Em algumas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeos e a segunda cadeia de polipeptídeos estão associadas uma com a outra. A associação entre a primeira cadeia e a segunda de cadeia impede a substituição da primeira cadeia que compreende o fragmento de VWF com VWF endógeno in vivo. Em uma modalidade, a associação entre a primeira cadeia e a segunda cadeia pode ser uma ligação covalente. Em uma modalidade particular, a ligação covalente é uma ligação dissulfeto. Em algumas modalidades, a proteína FVIII na segunda cadeia compreende ainda uma ou mais sequências de XTEN ligadas ao C-terminal ou N-terminal da proteína FVIII ou inseridas imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos (por exemplo, pelo menos um sítio de inserção aqui) na proteína FVIII divulgada. Os exemplos não limitativos dos sítios de inserção encontram-se descritos em outras partes aqui.

[000116] Em outras modalidades, uma proteína quimérica da invenção compreende três cadeias de polipeptídeos, em que uma primeira cadeia de polipeptídeos compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em uma cadeia pesada de uma proteína FVIII, uma segunda cadeia de polipeptídeos compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em uma cadeia leve de uma proteína FVIII fundida com uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, uma primeira região Fc), e uma terceira cadeia de polipeptídeos compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em um frag-

mento de VWF que compreende um domínio D' e um domínio D3, uma sequência XTEN, uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, uma segunda região Fc), e um ligante opcional entre a sequência XTEN e a segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma ou fragmento de VWF e a sequência XTEN. O ligante na terceira cadeia pode ser um ligante clivável, que é clivado no local de coagulação, por exemplo, um sítio de clivagem da trombina. Em algumas modalidades, a cadeia pesada do FVIII ou a cadeia leve de FVIII está ligada a uma ou mais sequências de XTEN, que podem ser ligadas ao N-terminal, C-terminal, ou inseridas dentro de um ou mais sítios de inserção no interior da sequência do FVIII. Os exemplos não limitativos dos sítios de inserção estão descritos em outro local aqui.

[000117] Ainda em outras modalidades, uma proteína quimérica da invenção compreende duas cadeias de polipeptídeos, uma primeira cadeia de polipeptídeos que compreende, que consiste essencialmente em, ou consiste em uma cadeia pesada de uma proteína FVIII e uma segunda cadeia de polipeptídeos que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste em uma cadeia leve de uma proteína FVIII, uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, uma primeira região Fc), um primeiro ligante (por exemplo, um ligante processável, que contém um ou mais sítios de clivagem de protease que compreende um ou mais sítios intracelulares de processamento), um fragmento de VWF, um segundo ligante (por exemplo, um ligante clivável por trombina), uma sequência de XTEN, e uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, uma segunda região Fc), em que a cadeia leve da proteína FVIII está ligada à primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, a primeira região Fc), que é posteriormente ligada ao fragmento de VWF pelo primeiro ligante, e em que o fragmento de VWF está ligado à sequência de XTEN, que é ainda li-



gada à segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma pelo segundo ligante. Em certas modalidades, o primeiro ligante é um ligante processável, e o segundo ligante é um ligante clivável. Na expressão, a proteína quimérica pode ser processada por uma enzima de processamento intracelular, que cliva o ligante processável, e, assim, a proteína quimérica pode compreender, consistir essencialmente de, ou consiste em três cadeias de polipeptídeos. Além disso, o fragmento de VWF pode ser clivado no sítio de coagulação devido ao ligante clivável.

[000118] Em certas modalidades, uma proteína quimérica da invenção compreende uma cadeia de polipeptídeos, que compreende uma proteína FVIII de cadeia única, uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, uma primeira região Fc), um primeiro ligante (por exemplo, um ligante processável), um fragmento de VWF, uma sequência XTEN, um segundo ligante (por exemplo, um ligante clivável por trombina), e uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, uma segunda região Fc), em que a proteína FVIII de cadeia simples está ligada à primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma, que está também ligada ao fragmento de VWF pelo primeiro ligante, e o fragmento de VWF está ligado à sequência de XTEN, o qual é posteriormente ligada à segunda região constante de Ig ou a uma fração da mesma. Em uma modalidade, o fragmento de VWF e a sequência XTEN estão ligados pelo segundo ligante. Em outra modalidade, a sequência XTEN e a segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma está ligada pelo segundo ligante. Em outras modalidades, a segunda cadeia compreende ainda um terceiro ligante. A cadeia de polipeptídeos única pode compreender, assim, o fragmento de VWF ligado à sequência XTEN pelo segundo ligante e a XTEN ligada à segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma pelo terceiro ligante. O segundo ligante e a terceira região de ligação podem ser idênticos ou diferentes. Em

uma modalidade, o primeiro ligante é um ligante processável. Em outra modalidade, o segundo ligante ou o terceiro ligante é um ligante clivável que compreende um ou dois sítios cliváveis. Em uma modalidade específica, o segundo ligante é um ligante clivável por trombina. Os ligantes úteis para a invenção são aqui descritas em outro local.

## (2) FVIII, XTEN, e Fc

[000119] Uma proteína quimérica da invenção também compreende (i) uma proteína FVIII, (ii) uma sequência de XTEN (um primeiro extensor de meia-vida), e (iii) uma região constante de Ig ou uma fração da mesma (um segundo extensor de meia-vida), em que a sequência XTEN está ligada à proteína FVIII por um ligante opcional e a região constante de Ig ou uma fração da mesma por um ligante adicional opcional. A sequência XTEN e a região constante de Ig ou uma fração da mesma podem ser usados em conjunto para estender a meia-vida da proteína FVIII. Em uma modalidade, a proteína quimérica é um monômero. Em outra modalidade, a proteína quimérica é um dímero (um homodímero ou um heterodímero).

[000120] A presente invenção também é dirigida a uma proteína quimérica compreendendo (i) uma proteína FVIII, (ii) uma sequência de XTEN, (iii) uma região constante de Ig ou uma fração da mesma (ou seja, uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma, "F", ou "F1"), e (iv) uma região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma (ou seja, uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma ou "F2"). Em uma modalidade, a sequência XTEN está ligada à proteína FVIII no C-terminal ou o N-terminal ou inserida imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos na proteína FVIII (por exemplo, um ou mais sítios de inserção de XTEN), a proteína FVIII está ligada à primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma, e a primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma e a segunda região constante de Ig ou uma fração da

mesma estão associadas com, ou ligadas entre si por um ligante opcional. Em certos aspectos, a proteína quimérica é um híbrido de monômero-dímero, o qual compreende uma primeira cadeia de polipeptídeos e uma segunda cadeia de polipeptídeos, em que a primeira cadeia de polipeptídeos compreende uma proteína FVIII, uma sequência XTEN, e uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma, e a segunda cadeia de polipeptídeos compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma, sem a proteína FVIII e em que a primeira cadeia e da segunda cadeia são associadas umas com as outras. A associação entre a região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, primeira região Fc) e a região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma (por exemplo, uma segunda região Fc) é uma associação química ou uma associação física. Em certas modalidades, a associação química é uma ligação covalente. Em outras modalidades, a associação química é uma interação não covalente, por exemplo, uma interação iônica, uma interação hidrofóbica, uma interação hidrofílica, uma interação de Van der Waals, ou uma ligação de hidrogênio. Em outras modalidades, a associação é uma ligação covalente não peptídica. Em ainda outras modalidades, a associação é uma ligação peptídica.

[000121] Em outros aspectos, a proteína quimérica é uma cadeia de polipeptídeos única compreendendo uma proteína FVIII, uma sequência XTEN, uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma, um ligante, por exemplo, um ligante processável, e uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma, em que a cadeia de polipeptídeos única é processada após expressão por uma enzima intracelular e torna-se duas cadeias de polipeptídeos.

[000122] Em uma modalidade, a região constante de Ig ou uma fração da mesma (por vezes aqui indicado por "F" ou "F1") ligada à prote-

ina FVIII pode estender a meia-vida da proteína FVIII, juntamente com a sequência de XTEN. Em outra modalidade, a região constante de Ig ou uma fração da mesma ("F" ou "F1") é uma região Fc ou um parceiro de ligação ao FcRn aqui descrito em outro local.

[000123] Em outras modalidades, a região constante de Ig ou a uma fração adicional da mesma (por vezes aqui indicada por "F2" ou uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma) associada com, ou ligada à primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma também pode estender a meia-vida da proteína FVIII. Em outras modalidades, a segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma ("F2") juntamente com a primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma e a sequência XTEN podem estender a meia-vida da proteína FVIII. A região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma pode ser uma região Fc ou um parceiro de ligação ao FcRn aqui descrito em outro local.

[000124] Em certas modalidades, a segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma associada com a primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma é ainda ligada a um fragmento de VWF aqui descrito em outro local e uma sequência XTEN opcional.

[000125] Em algumas modalidades, uma ou ambas de região constante de Ig ou uma fração da mesma ("F" ou "F1" ou uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma) e uma região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma (ou seja, uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma ou "F2") (indicadas neste parágrafo como " regiões constantes de Ig frações das mesmas) podem incluir, entre outros, um domínio CH1, um domínio CH2, um domínio CH3, um domínio CH4, um domínio de dobradiça, quaisquer fragmentos funcionais, derivados ou os análogos dos mesmos ou duas ou mais combinações. Em uma modalidade, a região constante de Ig ou uma fração da mesma compreende pelo menos um domínio CH1,

pelo menos um domínio CH2, pelo menos um domínio CH3, pelo menos um domínio CH4, ou fragmentos, derivados funcionais, ou análogos dos mesmos. Em outra modalidade, a região constante de Ig ou a uma fração da mesma compreende pelo menos um domínio de dobradiça ou fração da mesma e pelo menos um domínio CH2 ou uma fração do mesmo (por exemplo, na orientação dobradiça-CH2). Em outras modalidades, o domínio constante de Ig ou fração do mesmo compreende pelo menos um domínio CH2 ou fração do mesmo e pelo menos um domínio CH3 ou uma fração do mesmo (por exemplo, na orientação CF2-CH3). Exemplos de combinação incluem, entre outros, um domínio CH2, um domínio CH3, e um domínio de dobradiça, que também são conhecidos como uma região Fc (ou o domínio Fc), por exemplo, primeira região Fc. Exemplos adicionais de regiões constantes de Ig ou fração das mesmas são aqui descritos em outro local.

[000126] A proteína quimérica da invenção pode ter uma meia-vida estendida da proteína FVIII em comparação com tipo selvagem do FVIII. Em uma modalidade, a meia-vida da proteína FVIII é estendida pelo menos cerca de 1,5 vezes, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 2,5 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 6 vezes, pelo menos cerca de 7 vezes, pelo menos cerca de 8 vezes, pelo menos cerca de 9 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 11 vezes, ou pelo menos cerca de 12 vezes maior do que a meia-vida de tipo selvagem do FVIII. Em outra modalidade, a meia-vida da proteína FVIII é pelo menos cerca de 10 horas, pelo menos cerca de 11 horas, pelo menos cerca de 12 horas, pelo menos cerca de 13 horas, pelo menos cerca de 14 horas, pelo menos cerca de 15 horas, pelo menos cerca de 16 horas, pelo menos cerca de 17 horas, pelo menos cerca de 18 horas, pelo menos cerca de 19 horas, pelo menos cerca de 20 horas, pelo menos cerca de 21 horas, pelo

menos cerca de 22 horas, pelo menos cerca de 23 horas, pelo menos cerca de 24 horas, pelo menos cerca de 36 horas, pelo menos cerca de 48 horas, pelo menos cerca de 60 horas, pelo menos cerca de 72 horas, pelo menos cerca de 84 horas, pelo menos cerca de 96 horas, ou pelo menos cerca de 108 horas.

### (3) FVIII, XTEN e VWF

[000127] Em um aspecto, a proteína quimérica da presente invenção compreende (i) uma proteína FVIII, (ii) uma sequência de XTEN, e (iii) um fragmento de VWF que compreende um domínio D' e um domínio D3 de VWF, em que a proteína FVIII é ligada à sequência XTEN e em que a proteína FVIII está associada com, ou ligada aos o fragmento de VWF. Em uma modalidade, o fragmento de VWF da proteína quimérica aqui descrita não é capaz de se ligar a um receptor de eliminação de VWF. Em outra modalidade, o fragmento de VWF é capaz de proteger a proteína FVIII a partir de uma ou mais clivagens pela protease, protegendo a proteína FVIII da ativação, estabilizando a cadeia pesada e/ou cadeia leve da proteína FVIII, ou impedindo eliminação da proteína FVIII por um ou mais receptores limpadores. Em outras modalidades, o fragmento de VWF impede ou inibe a ligação do VWF endógeno ao sítio de ligação de VWF na proteína FVIII. O sítio de ligação de VWF pode ser localizado no domínio A3 ou o domínio C2 da proteína FVIII ou ambos domínio A3 e o domínio C2. Em uma modalidade específica, o sítio de ligação de VWF compreende a sequência de aminoácidos correspondente aos aminoácidos 1669 a 1689 e/ou aminoácidos 2303 a 2332 de SEQ ID NO: 2.

[000128] Em outro aspecto, uma proteína quimérica que compreende (i) uma proteína FVIII, (ii) uma sequência XTEN, (iii) um fragmento de VWF, que compreende um domínio D' e um domínio D3 de VWF, e (iv) uma região constante de Ig ou uma fração da mesma, em que a sequência XTEN está ligada à proteína FVIII no C- terminal ou N-terminal

ou inserido imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos (por exemplo, um ou mais sítios de inserção XTEN aqui descritos) na proteína FVIII, o fragmento de VWF está ligado ou associado com a proteína FVIII ou a sequência XTEN, e a região constante de Ig ou uma fração da mesma está ligada à proteína FVIII, a sequência XTEN, o fragmento de VWF, ou quaisquer combinações dos mesmos. A região constante de Ig ou uma fração da mesma útil para as proteínas quiméricas da presente invenção é descrita em outros locais aqui. Em uma modalidade, a região constante de Ig ou uma fração da mesma é capaz de estender a meia-vida de uma proteína FVIII. Em outra modalidade, a região constante de Ig ou a uma fração da mesma compreende uma primeira região Fc ou um primeiro parceiro de ligação ao FcRn. Em ainda outras modalidades, a região constante de Ig ou uma fração da mesma está ligada à proteína FVIII por um ligante opcional. Em ainda outras modalidades, o ligante compreende um ligante clivável. A proteína quimérica pode ser uma única cadeia de polipeptídeos, isto é um monômero (isto é uma única cadeia), contendo (i), (ii), (iii) e (iv) ou duas cadeias contendo uma primeira cadeia que compreende (i) e (ii) e uma segunda cadeia compreendendo (iii) e (iv). Em outros aspectos, a proteína quimérica é um dímero (por exemplo, um homodímero ou um heterodímero). Em uma modalidade, a proteína quimérica compreende duas cadeias, cada uma compreendendo (i), (ii), (iii) e (iv).

[000129] Em certas modalidades, uma proteína quimérica compreende (i) uma proteína FVIII, (ii) uma sequência de XTEN, (iii) um fragmento de VWF, que compreende um domínio D' e um domínio D3 de VWF, (iv) uma região constante de Ig ou uma fração da mesma (por vezes também indicado como "F", "uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma, ou "F2"), e (v) uma região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma (por vezes também indicado como "F2" ou "uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mes-

ma), em que (1) a proteína FVIII é ligada à sequência de XTEN na extremidade C-terminal ou N-terminal da proteína FVIII ou inserida imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos (por exemplo, um ou mais sítios de inserção XTEN aqui descritos) na proteína FVIII, (2) ou a sequência XTEN ou a proteína FVIII é ligada à região constante de Ig ou uma fração da mesma, (3) o fragmento de VWF está ligado à segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma, e (4) a região constante de Ig ou a uma fração da mesma está associada com a segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma. Em uma modalidade, a região constante de Ig ou uma fração da mesma ligada à proteína de FVII ou a sequência XTEN é ainda ligada ao fragmento de VWF por um ligante, por exemplo, um ligante processável. Em outra modalidade, a região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma útil para as proteínas quiméricas da invenção pode ainda ser ligada à proteína FVIII ou a região constante de Ig ou uma fração da mesma por um ligante opcional, por exemplo, um ligante processável. Em algumas modalidades, um par de região constante de Ig ou uma fração da mesma e a região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma, cada uma das quais está ligada ao fragmento de VWF e proteína FVIII, proporciona uma ligação mais forte do que a ligação não covalente entre a proteína FVIII e o fragmento de VWF, ou seja, uma ligação covalente, por exemplo, uma ligação dissulfeto, prevenindo assim VWF de substituir o fragmento de VWF in vivo. Em outras modalidades, uma ou ambas da região constante de Ig ou uma fração da mesma e a região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma são capazes de estender a meia-vida da proteína FVIII ou o fragmento de VWF. Em outras modalidades, a região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma compreende uma região Fc ou um segundo parceiro de ligação ao FcRn. A região constante de Ig ou uma fração da mesma e a região constante de Ig adicional ou uma fra-



ção da mesma nas proteínas quiméricas são idênticas ou diferentes.

[000130] Em certas modalidades, a região constante de Ig ou uma fração da mesma e a região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma estão associadas por uma associação química ou uma associação física. Em uma modalidade, a associação química, isto é, (:) é pelo menos uma ligação não peptídica. Em certas modalidades, a associação química, isto é, (:) é uma ligação covalente. Em outras modalidades, a associação química, isto é, (:) é uma interação não covalente, por exemplo, uma interação iônica, uma interação hidrofóbica, uma interação hidrofílica, uma interação de Van der Waals, ou uma ligação de hidrogênio. Em outras modalidades, (:) é uma ligação covalente não peptídica. Em ainda outras modalidades, (:) é uma ligação peptídica. Em ainda outras modalidades, (:) representa uma associação física entre duas sequências, em que uma fração de uma primeira sequência está em estreita proximidade a uma segunda sequência de tal modo que a primeira sequência protege ou bloqueia uma fração da segunda sequência de interagir com outra fração. Em algumas modalidades, a associação entre a região constante de Ig ou uma fração da mesma e a região constante de Ig adicional ou uma fração da mesma pode ser uma ligação covalente, por exemplo, uma ligação dissulfeto, que impede a substituição do fragmento de VWF ou polipeptídeo que contém o fragmento de VWF com VWF endógeno. Por conseguinte, impedir a interação entre a proteína FVIII e VWF endógeno reduz ou elimina este fator limitante de meia-vida para a proteína FVIII, e assim, a meia-vida da proteína FVIII é expandida em comparação com uma proteína FVIII, sem a proteína de VWF ou tipo selvagem do FVIII.

[000131] Em outros aspectos, uma proteína quimérica compreende uma fórmula compreendendo

- (1) FVIII(X1)-L1-F1:V-L2-X2-L3-F2;
- (2) FVIII(X1)-L1-F1:F2-L3-X2-L2-V;

- (3) F1-L1-FVIII(X1): V-L2-X2-L3-F2;
- (4) F1-L1-FVIII(X1); F2-L3-X2-L2-V;
- (5) FVIII(X1)-L1-F1-L4-V-L2-X2-L3-F2;
- (6) FVIII(X1)-L1-F1-L4-F2-L3-X2-L2-V;
- (7) F1-L1-FVIII(X1)-L4- V-L2-X2-L3-F2, ou
- (8) F1-L1-FVIII(X1)-L4- F2-L3-X2-L2-V,

em que o FVIII(X1) compreende uma proteína FVIII e uma ou mais sequências de XTEN, em que a uma ou mais sequência XTEN estão ligadas ao N-terminal ou C-terminal da proteína FVIII ou inseridas imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos (por exemplo, um ou mais sítios de inserção XTEN aqui divulgados) na proteína FVIII; cada um de L1, L2, L3 ou compreende um ligante opcional, por exemplo, um ligante clivável;

L4 é um ligante, por exemplo, um ligante processável;

X2 compreende uma ou mais sequências opcionais XTEN;

F1 compreende uma região constante de Ig ou uma fração da mesma;

F2 compreende uma região constante de Ig opcional adicional ou uma fração da mesma, e

V compreende um fragmento do VWF;

(-) é uma ligação peptídica ou um ou mais aminoácidos; e

(:) compreende uma associação química ou uma associação física. Em uma modalidade, (:) representa uma associação química, por exemplo, pelo menos uma ligação não peptídica. Em outra modalidade, a associação química, isto é, (:) é uma ligação covalente. Em outras modalidades, a associação química, isto é, (:) é uma interação não covalente, por exemplo, uma interação iônica, uma interação hidrofóbica, uma interação hidrofílica, uma interação de Van der Waals, ou uma ligação de hidrogênio. Em outras modalidades, (:) é uma ligação covalente não peptídica. Em ainda outras modalidades, (:) é

é uma ligação peptídica. Em ainda outras modalidades, (:) representa uma associação física entre duas sequências, em que uma fração de uma primeira sequência está em estreita proximidade a uma segunda sequência de tal modo que a primeira sequência protege ou bloqueia uma fração da segunda sequência de interagir com outra fração e, além disso, que esta associação física é mantida, sem permitir que a segunda sequência interaja com outras frações. A orientação das fórmulas polipeptídicas aqui referida é a partir de N-terminal (esquerda) para C-terminal (à direita). Por exemplo, a fórmula V-X-FVIII significa fórmula NH<sub>2</sub>-V-X-FVIII -COOH. Em uma modalidade, as fórmulas aqui descritas podem compreender quaisquer sequências adicionais entre as duas frações. Por exemplo, a fórmula V-X-FVIII pode ainda compreender quaisquer sequências na região N-terminal de V entre V e X, entre X e o FVIII, ou em C-terminal do FVIII, a menos que especificado de outra forma. Em outra modalidade, o hífen (-) indica uma ligação peptídica.

[000132] Em um aspecto, a proteína quimérica compreende duas cadeias de polipeptídeos, (a) uma primeira cadeia compreende (i) uma proteína FVIII de cadeia simples (ii) uma sequência de XTEN, e (iii) uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma, por exemplo, uma primeira região Fc ou parceiro de ligação ao FcRn, em que a sequência XTEN está ligada à proteína FVIII no N-terminal ou C-terminal ou inserida imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos da proteína FVIII (por exemplo, um ou mais sítios de inserção de XTEN aqui revelados) e a primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma é ligada à sequência de XTEN quando a sequência XTEN está ligada à proteína FVIII no N-terminal ou ao C-terminal ou da proteína FVIII, quando a sequência XTEN é inserida dentro da proteína FVIII, e (b) uma segunda cadeia compreendendo (iv) um fragmento de VWF que compreende um domínio D' e um domínio D3, (v) um ligante, e (vi) uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma,

por exemplo, uma segunda região Fc ou um segundo parceiro de ligação ao FcRn, em que o fragmento de VWF está ligado ao ligante, por exemplo, um ligante clivável, o qual é posteriormente ligada à segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma, e em que a primeira cadeia de polipeptídeos e a segunda cadeia de polipeptídeo estão associadas uma com a outra, por exemplo, uma ligação covalente, por exemplo, uma ligação dissulfeto. Em uma modalidade, o ligante é um ligante clivável aqui descrito em outro local, por exemplo, um ligante clivável por trombina. Em algumas modalidades, a segunda cadeia compreende uma ou mais sequências entre XTEN (iv) e (v) ou (v) e (vi).

[000133] Em outros aspectos, a proteína quimérica compreende uma cadeia de polipeptídeos que compreende (i) uma proteína FVIII de cadeia única (ii) uma sequência de XTEN, (iii) uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma, por exemplo, uma primeira região Fc ou um primeiro parceiro de ligação ao FcRn, (iv) um primeiro ligante, (v) um fragmento de VWF que compreende um domínio D' e um domínio D3, (vi) um segundo ligante, e (vii) uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma, por exemplo, uma segunda região Fc ou um segundo parceiro de ligação ao FcRn, em que (i) a (vii) estão ligados na ordem ou em qualquer ordem. Em uma modalidade, o primeiro ligante é um ligante processável, que pode ser clivado intracelularmente ou processado após expressão e torna a cadeia de polipeptídeos única em duas cadeias de polipeptídeos. Em outra modalidade, o segundo ligante é um ligante clivável aqui descrito, por exemplo, um ligante clivável por trombina. A sequência XTEN aqui utilizada pode ser ligada à proteína FVIII por um ligante opcional no N-terminal ou C-terminal da proteína FVIII ou inserido imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos (por exemplo, um ou mais sítios de inserção em XTEN) na proteína FVIII.

[000134] Em certos aspectos, uma proteína quimérica compreende

três cadeias de polipeptídeos, (A) uma primeira cadeia de polipeptídeos compreende (i) uma cadeia pesada de uma proteína FVIII e (ii) uma sequência de XTEN, que estão ligadas umas às outras e (b) uma segunda cadeia de polipeptídeos compreendendo (iii) uma cadeia leve da proteína FVIII e (iv) uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma, por exemplo, uma primeira região Fc ou um primeiro parceiro de ligação ao FcRn, que estão ligados uns aos outros, e (c) uma terceira cadeia de polipeptídeos compreendendo (v) um fragmento de VWF compreendendo um domínio D' e um domínio D3, (vi) um ligante, e (vii) uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma, por exemplo, uma segunda região Fc ou um segundo parceiro de ligação ao FcRn, em que a segunda cadeia está associada com a primeira cadeia e a terceira cadeia. Em uma modalidade, a associação entre a primeira cadeia e a segunda cadeia é uma associação química ou uma associação física. Por exemplo, a associação entre a primeira e a segunda cadeia de cadeia pode ser uma ligação de metal. Em outra modalidade, a associação entre a segunda cadeia e a terceira cadeia é também uma associação química ou uma associação física, por exemplo, uma ligação covalente ou uma ligação não covalente. Em certas modalidades, a associação entre a segunda cadeia e a terceira cadeia é através de ambas as regiões constantes de Ig ou uma fração da mesma e uma ponte de dissulfeto. A ligação entre a segunda cadeia e a terceira cadeia previne ou inibe a ligação da proteína FVIII com VWF endógeno, evitando assim que a proteína FVIII seja eliminada pela via de eliminação de VWF. Em algumas modalidades, o ligante é um ligante processável, que é clivado intracelularmente após a expressão em uma célula hospedeira. A sequência XTEN aqui utilizada está ligada à proteína FVIII por um ligante opcional no N-terminal ou no C-terminal da proteína FVIII ou inserido imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos (por exemplo, um ou mais sítios de inserção

XTEN) na proteína FVIII.

[000135] Em certas modalidades, o fragmento de VWF está diretamente ligado à proteína FVIII, que compreende uma ou mais XTENs, por uma ligação peptídica ou um ligante. Como um modo de ligar o fragmento de VWF e proteína FVIII, em que uma ou mais XTENs são inseridas ou ligadas, através de uma ligação direta (por exemplo, uma ligação peptídica) ou um ligante, uma ligação enzimática (por exemplo, sortase) pode ser empregue. Por exemplo, sortase refere-se a um grupo de enzimas procarióticas que modificam proteínas de superfície através do reconhecimento e clivagem de um sinal de ordenação do terminal carboxil. Para a maioria dos substratos de enzimas sortase, o sinal de reconhecimento consiste no motif LPXTG (Leu-Pro-qualquer-Thr-Gly (SEQ ID NO: 51), em seguida, uma sequência transmembrana altamente hidrofóbica, em seguida, um conjunto de resíduos básicos, como arginina. A clivagem ocorre entre o Thr e Gly, com a ligação transitória através do resíduo de Thr para resíduo de Cys do sítio ativo de um parceiro de ligação, seguido por transpeptidação que liga a proteína covalentemente à parede da célula. Em algumas modalidades, o parceiro de ligação contém Gly(n). Em outras modalidades, a proteína quimérica compreende ainda um motif de reconhecimento sortase. Em algumas modalidades, o fragmento de VWF está ligado ao FVIII, compreendendo uma ou mais XTENs inseridas dentro ou ligadas a utilizando sortase mediada em ligação de proteínas in vitro.

[000136] Em uma modalidade, um fragmento de VWF ligado a um motif de reconhecimento sortase por um ligante opcional pode ser fundido com uma proteína FVIII ligada a Gly (n) por um sortase, em que n pode ser qualquer número inteiro e em que uma ou mais XTENs são inseridas dentro ou ligadas à proteína FVIII. Um constructo de ligação compreende o fragmento de VWF (porção N-terminal do constructo) e da proteína FVIII, em que uma ou mais XTENs são inseridas ou ligadas

(fração terminal-C do constructo), em que o motif de reconhecimento sortase é inserido dentre. Outro constructo de ligação compreende o fragmento de VWF (fração N-terminal do constructo, ligante, motif de reconhecimento sortase, e a proteína FVIII, em que uma ou mais XTENs são inseridas ou ligadas (fração de terminal-C do constructo). Em outra modalidade, uma proteína FVIII ligada a um motif de reconhecimento sortase por um ligante opcional pode ser fundida com um fragmento de VWF ligado a Gly (n) por um sortase, em que n é um número inteiro qualquer. Um constructo de ligação resultante compreende a proteína FVIII(fração N-terminal do constructo), em que uma ou mais XTENs são inseridas ou ligadas, e o fragmento de VWF (fração C-terminal do constructo), em que o motif de reconhecimento sortase é inserido dentre. Outro constructo de ligação resultante compreende a proteína FVIII(fração N-terminal do constructo), em que uma ou mais XTENs são inseridas ou ligadas, o ligante, o motif de reconhecimento sortase, e o fragmento de VWF (fração de C-terminal do constructo). Em outras modalidades, um fragmento de VWF ligado a um motif de reconhecimento sortase por um primeiro ligante opcional pode ser fundido com uma fração heteróloga, por exemplo, uma região constante de imunoglobulina ou uma fração da mesma, por exemplo, uma região Fc, ligada a um sítio de clivagem de trombina por um segundo ligante opcional. Um constructo resultante pode compreender o fragmento de VWF (fração N-terminal), o primeiro ligante, o motif de reconhecimento sortase, o sítio de clivagem de protease, o segundo ligante opcional, e a fração heteróloga.

[000137] Em algumas modalidades, o fragmento de VWF está associado com a proteína FVIII. A associação entre o fragmento de VWF e proteína FVIII pode ser uma associação química ou uma associação física. A associação química pode ser uma interação não covalente, por exemplo, uma interação iônica, uma interação hidrofóbica, uma interação hidrofílica, uma interação de Van der Waals, ou uma ligação

de hidrogênio. Em ainda outras modalidades, a associação entre a proteína FVIII e fragmento de VWF é uma associação física entre duas sequências, por exemplo, devido a uma associação adicional entre a sequência possuindo a proteína FVIII e a sequência possuindo o fragmento de VWF, em que uma fração de um primeira sequência está em estreita proximidade a uma segunda sequência de tal modo que a primeira sequência protege ou bloqueia uma fração da segunda sequência de interagir com outra fração molecular.

[000138] Como resultado da prevenção ou inibição da interação de VWF endógeno com a proteína FVIII pelo fragmento de VWF, a proteína quimérica aqui descrita tem uma meia-vida estendida em comparação com tipo selvagem do FVIII ou a proteína quimérica correspondente sem o fragmento de VWF. Em uma modalidade, a meia-vida da proteína FVIII é estendida pelo menos cerca de 1,5 vezes, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 2,5 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 6 vezes, pelo menos cerca de 7 vezes, pelo menos cerca de 8 vezes, pelo menos cerca de 9 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 11 vezes, ou pelo menos cerca de 12 vezes mais do que uma proteína FVIII sem fragmento de VWF. Em outra modalidade, a meia-vida da proteína FVIII é pelo menos cerca de 10 horas, pelo menos cerca de 11 horas, pelo menos cerca de 12 horas, pelo menos cerca de 13 horas, pelo menos cerca de 14 horas, pelo menos cerca de 15 horas, pelo menos cerca de 16 horas, pelo menos cerca de 17 horas, pelo menos cerca de 18 horas, pelo menos cerca de 19 horas, pelo menos cerca de 20 horas, pelo menos cerca de 21 horas, pelo menos cerca de 22 horas, pelo menos cerca de 23 horas, pelo menos cerca de 24 horas, pelo menos cerca de 36 horas, pelo menos cerca de 48 horas, pelo menos cerca de 60 horas, pelo menos cerca de 72 horas, pelo menos cerca de 84 horas, pelo menos cerca de 96 horas, ou pelo menos cerca de 108



horas. Em uma modalidade particular, a meia-vida da proteína FVIII é estendida pelo menos 10 horas, pelo menos cerca de 11 horas, pelo menos cerca de 12 horas, pelo menos cerca de 13 horas, pelo menos cerca de 14 horas, pelo menos cerca de 15 horas, pelo menos cerca de 16 horas, pelo menos cerca de 17 horas, pelo menos cerca de 18 horas, pelo menos cerca de 19 horas, pelo menos cerca de 20 horas, pelo menos cerca de 21 horas, pelo menos cerca de 22 horas, pelo menos cerca de 23 horas, pelo menos cerca de 24 horas, pelo menos cerca de 25 horas, pelo menos cerca de 26 horas, ou pelo menos cerca de 27 horas em camundongos HemA.

#### A) Fragmentos Fator de von Willebrand (vWF)

[000139] VWF (também conhecido como F8VWF) é uma glicoproteína grande multimérica presente no plasma sanguíneo e constitutivamente produzido no endotélio (nos corpos de Weibel-Palade), megacariócitos ( $\alpha$ -grânulos de plaquetas), e tecido conjuntivo subendotelial. O monômero básico VWF é uma proteína de 2813 aminoácidos. Cada monômero contém um número de domínios específicos com uma função específica, o domínio D'/D3 (que se liga ao Fator VIII), o domínio A1 (que se liga ao receptor de plaquetas GPIIb, heparina, e/ou, eventualmente, colágeno), o domínio A3 (que se liga ao colágeno), o domínio C1 (em que o domínio de RGD se liga à integrina de plaqueta IIb $\beta$ 3 quando este é ativado), e o domínio "nó de cisteína" na extremidade C-terminal final da proteína (cujo VWF compartilha com o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF $\beta$ ) e gonadotrofina  $\beta$ -coriônica humana ( $\beta$ HCG)).

[000140] O termo "um fragmento de VWF" como aqui utilizado inclui, entre outros, fragmentos de VWF funcionais compreendendo um domínio D' e um domínio D3, que são capazes de inibir a ligação do VWF endógeno a FVIII. Em uma modalidade, o fragmento de VWF liga-se à proteína FVIII. Em outra modalidade, o fragmento de VWF

bloqueia o sítio de ligação do VWF na proteína FVIII, inibindo assim a interação da proteína FVIII com VWF endógeno. Os fragmentos VWF incluem derivados, variantes, mutantes, ou análogos que retêm estas atividades de VWF.

[000141] A sequência de aminoácidos 2813 monômero para o VWF humano é relatada como Número de Acesso \_NP\_000543.2\_ no Genbank. A sequência de nucleotídeos que codifica para o VWF humano é relatada como o Número de Acesso em \_NM\_000552.3\_ no Genbank. A sequência de nucleotídeos de VWF humano é designada como SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2 é a sequência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 1. Cada domínio de VWF está listado na Tabela 1.

**TABELA 1.** Sequências VWF

DOMÍNIOS DE	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDO
PEPTÍDEO SINAL DE VWF (AMINOÁCIDOS 1 A 22 DE SEQ ID NO: 2)	1 <u>MIPARFAGVL LALALILPGT LC</u> 22
REGIÃO D1D2 DE VWF (AMINOÁCIDOS 23 A 763 DE SEQ ID NO: 2)	23 <b>AEGTRGRS</b>  51 <b>STARCSLFGS DFNVTFDGSM</b> <b>YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK</b> <b>RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG</b> 101 <b>TVTQGDQRVSPYASKGLYL ETEAGYYKLS</b> <b>GEAYGFVARI DGSGNFQVLL</b> 151 <b>SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL</b> <b>TSDPYDFANS WALSSGEQWC</b> 201 <b>ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS</b> <b>TSVFARCHPL VDPEPFVALC</b> 251 <b>EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM</b> <b>VLYGWTDHSA CSPVCPAGME</b> 301 <b>YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS</b> <b>CPEGQLLDEG LCVESTECPC</b> 351 <b>VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS</b> <b>NEECPGECCLV TGQSHFKSFD</b> 401 <b>NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV</b>

	451	QCADDRDAVC	TRSVTVRLPG	
		LHNSLVKLKH	GAGVAMDGQD	IQLPLLKGD
		RIQHTVTASV	RLSYGEDLQM	
	501	DWDGRGRLLV	KLSPVYAGKT	CGLCGNYNGN
		QGDDFLTPSG	LAEPRVEDFG	
	551	NAWKLGDCQ	DLQKQHSDDPC	ALNPRMTRFS
		EEACAVLTSP	TFEACHRAVS	
	601	PLPYLRNCRY	DVCSCSDGRE	CLCGALASYA
		AACAGRGVRV	AWREPGRCEL	
	651	NCPKGQVYLQ	CGTPCNLTCT	SLSYPDEECN
		EACLEGCFCP	PGLYMDERGD	
	701	CVPKAQCPCY	YDGEIFQPED	IFSDHHTMCY
		CEDGFMHCTM	SGVPGSLLPD	
	751	AVLSSPLSHR		SKR
	763			
DOMÍNIO D' DE VWF	764		SLSCRPP	MVKLVCPADN
		LRAEGLECTK		
		TCQNYDLECM		
	801	SMGCVSGCLC	PPGMVRHENR	CVALERCPCF
		HQKEYAPGE	TVKIGCNTCV	
	851	CRDRKWNCTD		HVCDAT
	866			
DOMÍNIO D3 DE VWF	867		CSTI	GMAHYLTDFG
		LKYLFPGEQ	YVLVQDYCGS	
	901	NPGTFRILVG	NKGCSHPSVK	CKKRVTLVE
		GGEIELFDGE	VNVKRPMKDE	
	951	THFEVVESGR	YIILLGKAL	SVVWDRHLSI
		SVVLKQTYQE	KVCGLCGNFD	
	1001	GIONNDLTSS	NLQVEEDPVD	FGNSWKVSSQ
		CADTRKVPLD	SSPATCHNNI	
	1051	MKQTMVDSSC	RILTSDVFQD	CNKLVDPEPY
		LDVCIYDTCS	CESIGDCACF	
	1101	CDTIAAYAHV	CAQHKGKVVW	RTATLCPQSC
		EERNLRENGY	ECEWRYNSCA	
	1151	PACQVTCQHP	EPLACPVQCV	EGCHAHCPPG
		KILDELLQTC	VDPEDCPVCE	
	1201	VAGRRFASGK	KVTLNPSDPE	HCQICHCDVV
		NLTCEACQEP		
	1240			
DOMÍNIO A1 DE VWF	1241	GGLVVPPTDA		
	1251	PVSPTTLYVE	DISEPPLHDF	YCSRLLDLVF
		LLDGSSRLSE	AEFEVLKAFV	
	1301	VDMMERLRIS	QKWVRVAVVE	YHDGSHAYIG
		LKDRKRPSEL	RRIASQVKYA	
	1351	GSQVASTSEV	LKYTLFQIFS	KIDRPEASRI
		ALLLMASQEP	QRMSRNFVRY	
	1401	VQGLKKKKVI	VIPVGIGPHA	NLKQIRLIEK

	1451	QAPENKAFVL SSVDELEQQR DEIVSYLCDL APEAPPPTLP PDMAQVTVG 1479	
	1480		P
		GLLGVSTLGP KRNSMVLDDVA	
	1501	FVLEGSDKIG EADFNRSEKEF MEEVIQRMVDV GQDSIHVTVL QYSYMTVEY	
	1551	PFSEAQSKGD ILQRVREIRY QGGNRTNTGL ALRYLSDHSF LVSQGDREQA 1600	
	1601	PNLVYMTGN PASDEIKRLP GDIQVVPIGV GPNANVQELE RIGWPNAPIL	
	1651	IQDFETLPRE APDLVLQRCR SGEGLQIPTL SPAPDCSQPL DVILLLDGSS	
	1701	SFPASYFDEM KSFAKAFISK ANIGPRLTQV SVLQYGSITT IDVPWNVPE	
	1751	KAHLLSLVDV MQREGGPSQI GDALGFAVRY LTSEMHGARP GASKAVVILV	
	1801	TDVSVDSDVA AADAARSNRV TVFPIGIGDR YDAAQLRILA GPAGDSNVVK	
	1851	LQRIEDLPTM VTLGNSFLHK LCSGFVRICM DEDGNEKRPD DVWTLPDQCH	
	1901	TVTCQPDGQT LLKSHRVNCD RGLRPSCPNS QSPVKVEETC GCRWTCPCVC	
	1951	TGSSTRHIVT FDGQNFKLTV SCSYVLFQNK EQDLEVILHN GACSPGARQG	
	2001	CMKSIEVKHS ALSVEXHSDM EVTVNGRLVS VPYVGGNMEV NVYGAIMHEV	
	2051	RFNHLGHIFT FTPQNNEFQL QLSPKTFASK TYGLCGICDE NGANDFMLRD	
	2101	GTVTTDWKTL VQEWTVQRPD QTCQPILEEQ CLVPDSSHQ VLLLPLFAEC	
	2151	HKVLAPATFY AICQQDSCHQ EQVCEVIASY AHLCRTNGVC VDWRTPDFCA	
	2201	MSCPPSLVYN HCEHGCPRHC DGNVSSCGDH PSEGCFPCPD KVMLEGSCVP	
	2251	EEACTQCIGE DGVQHGFLEA WVPDHPQCI CTCLSGRKVN CTTQPCPTAK	
	2301	APTCGLCEVA RLRQNADQCC PEYECVCDPV SCDLPPVPHC ERGLQPTLTN	
	2351	PGECPNFTC ACRKEECKRV SPPSCPPHRL PTLRKTQCCD EYECACNCVN	
	2401	STVSCPLGYL ASTATNDCGC TTTTCLPDKV CVHRSTIYPV GQFWEEGCDV	
	2451	CTCTDMEDAV MGLRVAQCSQ KPCEDSCRSG FTYVLHEGEC CGRCLPSACE	
	2501	VVTGSPRGDS QSSWKSQVSG WASPENPLI NECVRVKEEV FIQQRNVSCP	
	2551	QLEVPVCPSP FQLSCKTSAC CPSCRCERME ACMLNGTVIG PGKTVMIDVC	

	2601 TTCRCMVQVG VISGFKLECR KTTNCPCLG YKEENNTGEC CGRCLPTACT 2651 IQLRGGQIMT LKRDETLQDG CDTHFCKVNE RGEYFWEKRV TGCPFFDEHK 2701 CLAEKGKIMK IPGTCCDTCE EPECNDITAR LQYVKVGSCK SEVEVDIHYC 2751 QGKCASKAMY SIDINDVQDQ CSCCSPTRTE PMQVALHCTN GSVVYHEVLN 2801 AMECKCSPRK CSK
	SEQUENCIA DE NUCLEOTIDEO (SEQ ID NO: 1)
VWF DE COMPRI- MENTO COMPELTO	1 ATGATTCCTG CCAGATTTGC CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTT 51 GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACTCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC 101 GATGCAGCCT TTTCGGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG 151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA 201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC 251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTTTGACA TCCATTTGTT TGTCAATGGT 301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG 351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT 401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCCTGCTG 451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT 501 CTTTGCTGAA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC 551 CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT 601 GAACGGGCAT CTCCTCCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT 651 GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT 701 TTGCCCCTG CCACCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT 751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCCTGC 801 CCTCCTGGAG TACGCCCGGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG 851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG 901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT 951 CAATGAAATG TGTCAGGAGC

	<p>             GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG              1001 GACAGCTCCT GGATGAAGGC              CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC              1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA              CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG              1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA              ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT              1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTC              ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC              1201 AACAGATACT TCACCTTCAG              TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCGGGA              1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT              CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG              1301 ATGACCGCGA CGCTGTGTGC              ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCTGGC              1351 CTGCACAACA GCCTTGTGAA              ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA              1401 TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC              CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC              1451 ATACAGTGAC GGCCTCCGTG              CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG              1501 GACTGGGATG GCCGCGGGAG              GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC              1551 CGGGAAGACC TGCGGCCTGT              GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG              1601 ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG              CTGGCRGAGC CCCGGGTGGA GGACTTCGGG              1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG              GGA CTGCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG              1701 CGATCCCTGC GCCCTCAACC              CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT              1751 GCGCGGTCTT GACGTCCCCC              ACATTCGAGG CCTGCCATCG TGCCGTCAGC              1801 CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA              CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA              1851 CGGCCGCGAG TGCCTGTGCG              GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCCTGCG              1901 CGGGGAGAGG CGTGCGCGTC              GCGTGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG              1951 AACTGCCCCA AAGGCCAGGT              GTACCTGCAG TGCGGGACCC CCTGCAACCT              2001 GACCTGCCGC TCTCTCTCTT              ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCTGCC              2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC              CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC              2101 TGCGTGCCCA AGGCCAGTG              CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA              2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG              ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG              2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG              AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC           </p>
--	--

2251	GCTGTCCTCA GCAGTCCCCT
	GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCCTG
2301	TCGGCCCCC ATGGTCAAGC
	TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG
2351	AAGGGCTCGA GTGTACCAA
	ACGTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG
2401	AGCATGGGCT GTGTCTCTGG
	CTGCCTCTGC CCCCCGGGCA TGGTCCGGCA
2451	TGAGAACAGA TGTGTGGCCC
	TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA
2501	AGGAGTATGC CCCTGGAGAA
	ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC
2551	TGTCGGGACC GGAAGTGGAA
	CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG
2601	CTCCACGATC GGCATGGCCC
	ACTACCTCAC CTTGACGGG CTCAAATACC
2651	TGTTCCCCGG GGAGTGCCAG
	TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT
2701	AACCCTGGGA CCTTTCGGAT
	CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC
2751	CTCAGTGAAA TGCAAGAAAC
	GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA
2801	TTGAGCTGTT TGACGGGGAG
	GTGAATGTGA AGAGGCCCCAT GAAGGATGAG
2851	ACTCACTTG AGGTGGTGGA
	GTCTGGCCGG TACATCATTC TGCTGCTGGG
2901	CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT
	GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC
2951	TGAAGCAGAC ATACCAGGAG
	AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGAT
3001	GGCATCCAGA ACAATGACCT
	CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA
3051	CCCTGTGGAC TTTGGGAACT
	CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA
3101	CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC
	TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC
3151	ATGAAGCAGA CGATGGTGGA
	TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT
3201	CTTCCAGGAC TGCAACAAGC
	TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT
3251	GCATTTACGA CACCTGCTCC
	TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCTGCTTC
3301	TGCGACACCA TTGCTGCCTA
	TGCCCACGTG TGTGCCCAGC ATGGCAAGGT
3351	GGTGACCTGG AGGACGGCCA
	CATTGTGCCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA
3401	ATCTCCGGGA GAACGGGTAT
	GAGTGTGAGT GGCGCTATAA CAGCTGTGCA
3451	CCTGCCTGTC AAGTCACGTG
	TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT
3501	GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC

	<p>             ATGCCCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG              3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC              GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG              3601 GTGGCTGGCC GCGTTTTTGC              CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCCAG              3651 TGACCCTGAG CACTGCCAGA              TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT              3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG              GGAGGCCTGG TGGTGCTCC CACAGATGCC              3751 CCGGTGAGCC CCACCACTCT              GTATGTGGAG GACATCTCGG AACCGCCGTT              3801 GCACGATTTC TACTGCAGCA              GGCTACTGGA CCTGGTCTTC CTGCTGGATG              3851 GCTCCTCCAG GCTGTCCGAG              GCTGAGTTTG AAGTGCTGAA GGCCTTTGTG              3901 GTGGACATGA TGGAGCGGCT              GCGCATCTCC CAGAAGTGGG TCCGCGTGGC              3951 CGTGGTGGAG TACCACGACG              GCTCCCACGC CTACATCGGG CTCAAGGACC              4001 GGAAGCGACC GTCAGAGCTG              CGGCGCATTG CCAGCCAGGT GAAGTATGCG              4051 GGCAGCCAGG TGGCCTCCAC              CAGCGAGGTC TTGAAATACA CACTGTTCCA              4101 AATCTTCAGC AAGATCGACC              GCCCTGAAGC CTCCCGCATC GCCCTGCTCC              4151 TGATGGCCAG CCAGGAGCCC              CAACGGATGT CCCGGAACCT TGTCCGCTAC              4201 GTCCAGGGCC TGAAGAAGAA              GAAGGTCATT GTGATCCCGG TGGGCATTGG              4251 GCCCCATGCC AACCTCAAGC              AGATCCGCCT CATCGAGAAG CAGGCCCCCTG              4301 AGAACAAAGC CTTCGTGCTG              AGCAGTGTGG ATGAGCTGGA GCAGCAAAGG              4351 GACGAGATCG TTAGCTACCT              CTGTGACCTT GCCCTGAAG CCCCTCCTCC              4401 TACTCTGCCC CCCGACATGG              CACAAGTCAC TGTGGGCCCC GGGCTCTTGG              4451 GGGTTTCGAC CCTGGGGCCC              AAGAGGAACT CCATGGTTCT GGATGTGGCG              4501 TTCGTCCTGG AAGGATCGGA              CAAAATTGGT GAAGCCGACT TCAACAGGAG              4551 CAAGGAGTTC ATGGAGGAGG              TGATTACGCG GATGGATGTG GGCCAGGACA              4601 GCATCCACGT CACGGTGCTG              CAGTACTCCT ACATGGTGAC CGTGGAGTAC              4651 CCCTTCAGCG AGGCACAGTC              CAAAGGGGAC ATCCTGCAGC GGGTGCGAGA              4701 GATCCGCTAC CAGGGCGGCA              ACAGGACCAA CACTGGGCTG GCCCTGCGGT              4751 ACCTCTCTGA CCACAGCTTC              TTGGTCAGCC AGGGTGACCG GGAGCAGGCG           </p>
--	---



4801	CCCAACCTGG TCTACATGGT
	CACCGGAAAT CCTGCCTCTG ATGAGATCAA
4851	GAGGCTGCCT GGAGACATCC
	AGGTGGTGCC CATTGGAGTG GGCCCTAATG
4901	CCAACGTGCA GGAGCTGGAG
	AGGATTGGCT GGCCCAATGC CCCTATCCTC
4951	ATCCAGGACT TTGAGACGCT
	CCCCGAGAG GCTCCTGACC TGGTGCTGCA
5001	GAGGTGCTGC TCCGGAGAGG
	GGCTGCAGAT CCCCACCCTC TCCCCTGCAC
5051	CTGACTGCAG CCAGCCCCTG
	GACGTGATCC TTCTCCTGGA TGGCTCCTCC
5101	AGTTTCCCAG CTTCTTATTT
	TGATGAAATG AAGAGTTTCG CCAAGGCTTT
5151	CATTTCAAAA GCCAATATAG
	GGCCTCGTCT CACTCAGGTG TCAGTGCTGC
5201	AGTATGGAAG CATCACCACC
	ATTGACGTGC CATGGAACGT GTCCCGGAG
5251	AAAGCCCATT TGCTGAGCCT
	TGTGGACGTC ATGCAGCGGG AGGGAGGCCC
5301	CAGCCAAATC GGGGATGCCT
	TGGGCTTTGC TGTGCGATAC TTGACTTCAG
5351	AAATGCATGG TGCCAGGCCG
	GGAGCCTCAA AGGCGGTGGT CATCCTGGTC
5401	ACGGACGTCT CTGTGGATTC
	AGTGGATGCA GCAGCTGATG CCGCCAGGTC
5451	CAACAGAGTG ACAGTGTTCC
	CTATTGGAAT TGGAGATCGC TACGATGCAG
5501	CCCAGCTACG GATCTTGGCA
	GGCCCAGCAG GCGACTCCAA CGTGGTGAAG
5551	CTCCAGCGAA TCGAAGACCT
	CCCTACCATG GTCACCTTGG GCAATTCCTT
5601	CCTCCACAAA CTGTGCTCTG
	GATTTGTTAG GATTTGCATG GATGAGGATG
5651	GGAATGAGAA GAGGCCCGGG
	GACGTCTGGA CCTTGCCAGA CCAGTGCCAC
5701	ACCGTGAATT GCCAGCCAGA
	TGGCCAGACC TTGCTGAAGA GTCATCGGGT
5751	CAACTGTGAC CGGGGGCTGA
	GGCCTTCGTG CCCTAACAGC CAGTCCCCTG
5801	TTAAAGTGGA AGAGACCTGT
	GGCTGCCGCT GGACCTGCCC CTGYGTGTGC
5851	ACAGGCAGCT CCACTCGGCA
	CATCGTGACC TTTGATGGGC AGAATTTCAA
5901	GCTGACTGGC AGCTGTTCTT
	ATGTCCTATT TCAAAACAAG GAGCAGGACC
5951	TGGAGGTGAT TCTCCATAAT
	GGTGCCCTGCA GCCCTGGAGC AAGGCAGGGC
6001	TGCATGAAAT CCATCGAGGT
	GAAGCACAGT GCCCTCTCCG TCGAGSTGCA
6051	CAGTGACATG GAGGTGACGG

	<p> TGAATGGGAG ACTGGTCTCT GTTCCTTACG  6101 TGGGTGGGAA CATGGAAGTC  AACGTTTATG GTGCCATCAT GCATGAGGTC  6151 AGATTCAATC ACCTTGGTCA  CATCTTCACA TTCACTCCAC AAAACAATGA  6201 GTTCCAACCTG CAGCTCAGCC  CCAAGACTTT TGCTTCAAAG ACGTATGGTC  6251 TGTGTGGGAT CTGTGATGAG  AACGGAGCCA ATGACTTCAT GCTGAGGGAT  6301 GGCACAGTCA CCACAGACTG  GAAAACACTT GTTCAGGAAT GGAAGTGTGCA  6351 GCGGCCAGGG CAGACGTGCC  AGCCCATCCT GGAGGAGCAG TGTCTTGTCC  6401 CCGACAGCTC CCACTGCCAG  GTCCTCCTCT TACCACTGTT TGCTGAATGC  6451 CACAAGGTCC TGGCTCCAGC  CACATTCTAT GCCATCTGCC AGCAGGACAG  6501 TTGCCACCAG GAGCAAGTGT  GTGAGGTGAT CGCCTCTTAT GCCCACCTCT  6551 GTCGGACCAA CGGGGTCTGC  GTTGACTGGA GGACACCTGA TTTCTGTGCT  6601 ATGTCATGCC CACCATCTCT  GGTCTACAAC CACTGTGAGC ATGGCTGTCC  6651 CCGGCACTGT GATGGCAACG  TGAGCTCCTG TGGGGACCAT CCCTCCGAAG  6701 GCTGTTTCTG CCCTCCAGAT  AAAGTCATGT TGGAAGGCAG CTGTGTCCCT  6751 GAAGAGGCCT GCACTCAGTG  CATTGGTGAG GATGGAGTCC AGCACCAGTT  6801 CCTGGAAGCC TGGGTCCCGG  ACCACCAGCC CTGTCAGATC TGCACATGCC  6851 TCAGCGGGCG GAAGGTCAAC  TGCACAACGC AGCCCTGCCC CACGGCCAAA  6901 GCTCCACAGT GTGGCCTGTG  TGAAGTAGCC CGCCTCCGCC AGAATGCAGA  6951 CCAGTGCTGC CCCGAGTATG  AGTGTGTGTG TGACCCAGTG AGCTGTGACC  7001 TGCCCCCAGT GCCTCACTGT  GAACGTGGCC TCCAGCCCAC ACTGACCAAC  7051 CCTGGCGAGT GCAGACCCAA  CTTCACCTGC GCCTGCAGGA AGGAGGAGTG  7101 CAAAAGAGTG TCCCCACCCT  CCTGCCCCC GCACCGTTT CCCACCCTTC  7151 GGAAGACCCA GTGCTGTGAT  GAGTATGAGT GTGCCTGCAA CTGTGTCAAC  7201 TCCACAGTGA GCTGTCCCCT  TGGGTACTTG GCCTCAACCG CCACCAATGA  7251 CTGTGGCTGT ACCACAACCA  CCTGCCTTCC CGACAAGGTG TGTGTCCACC  7301 GAAGCACCAT CTACCCTGTG  GGCCAGTTCT GGGAGGAGGG CTGCGATGTG </p>
--	---

	7351 TGCACCTGCA CCGACATGGA GGATGCCGTG ATGGGCCTCC GCGTGGCCCA 7401 GTGCTCCCAG AAGCCCTGTG AGGACAGCTG TCGGTCGGGC TTCACTTACG 7451 TTCTGCATGA AGGCGAGTGC TGTGGAAGGT GCCTGCCATC TGCCTGTGAG 7501 GTGGTGACTG GCTCACC GCG GGGGGACTCC CAGTCTTCCT GGAAGAGTGT 7551 CGGCTCCCAG TGGGCCTCCC CGGAGAACCC CTGCCTCATC AATGAGTGTG 7601 TCCGAGTGAA GGAGGAGGTC TTTATACAAC AAAGGAACGT CTCCTGCCCC 7651 CAGCTGGAGG TCCCTGTCTG CCCCTCGGGC TTTCAGCTGA GCTGTAAGAC 7701 CTCAGCGTGC TGCCCAAGCT GTCGCTGTGA GCGCATGGAG GCCTGCATGC 7751 TCAATGGCAC TGTCATTGGG CCCGGGAAGA CTGTGATGAT CGATGTGTGC 7801 ACGACCTGCC GCTGCATGGT GCAGGTGGGG GTCATCTCTG GATTCAAGCT 7851 GGAGTGCAGG AAGACCACCT GCAACCCCTG CCCCCTGGGT TACAAGGAAG 7901 AAAATAACAC AGGTGAATGT TGTGGGAGAT GTTTGCCTAC GGCTTGCACC 7951 ATTCAGCTAA GAGGAGGACA GATCATGACA CTGAAGCGTG ATGAGACGCT 8001 CCAGGATGGC TGTGATACTC ACTTCTGCAA GGTCAATGAG AGAGGAGAGT 8051 ACTTCTGGGA GAAGAGGGTC ACAGGCTGCC CACCCTTTGA TGAACACAAG 8101 TGTCTTGCTG AGGGAGGTAA AATTATGAAA ATTCCAGGCA CCTGCTGTGA 8151 CACATGTGAG GAGCCTGAGT GCAACGACAT CACTGCCAGG CTGCAGTATG 8201 TCAAGGTGGG AAGCTGTAAG TCTGAAGTAG AGGTGGATAT CCACTACTGC 8251 CAGGGCAAAT GTGCCAGCAA AGCCATGTAC TCCATTGACA TCAACGATGT 8301 GCAGGACCAG TGCTCCTGCT GCTCTCCGAC ACGGACGGAG CCCATGCAGG 8351 TGGCCCTGCA CTGCACCAAT GGCTCTGTTG TGTACCATGA GGTTCCTCAAT 8401 GCCATGGAGT GCAAATGCTC CCCCAGGAAG TGCAGCAAGT GA
--	--

[000142] O fragmento de VWF como aqui utilizado pode ser um fragmento que compreende um domínio D1 e um domínio D3 de VWF,

em que o fragmento de VWF liga-se ao Fator VIII (FVIII) e inibe a ligação de VWF endógeno (VWF de comprimento completo) para o FVIII. O fragmento de VWF que compreende o domínio D' e o domínio D3 pode ainda compreender um domínio de VWF selecionado a partir do grupo que consiste em um domínio A1, um domínio A2, um domínio A3, um domínio D1, um domínio D2, um domínio D4, um domínio B1, um domínio B2, um domínio B3, um domínio C1, um domínio C2, um domínio CK, um ou mais fragmentos dos mesmos, e quaisquer combinações dos mesmos. Em uma modalidade, um fragmento de VWF compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em: (1) os domínios D' e D3 de VWF ou fragmentos dos mesmos; (2) os domínios D1, D', e D3 de VWF ou fragmentos dos mesmos; (3) os domínios D2, D', e D3 de VWF ou fragmentos dos mesmos; (4) os domínios D1, D2, D', e D3 de VWF ou fragmentos dos mesmos; ou (5) os domínios D1, D2, D', D3, e A1 de VWF ou fragmentos dos mesmos. O fragmento de VWF aqui descrito não contém um sítio de ligação para um receptor de eliminação de VWF. Em outra modalidade, o fragmento de VWF aqui descrito não é os aminoácidos 764 a 1274 da SEQ ID NO: 2. O fragmento de VWF da presente invenção pode compreender quaisquer outras sequências ligadas ou fundidas com o fragmento de VWF. Por exemplo, um fragmento de VWF aqui descrito pode ainda compreender um peptídeo de sinal.

[000143] Em uma modalidade, o fragmento de VWF liga-se a, ou está associada com uma proteína FVIII. Ao ligar-se ou associar com uma proteína FVIII, um fragmento de VWF da invenção protege FVIII da protease de clivagem e ativação do FVIII, estabiliza a cadeia pesada e cadeia leve do FVIII, e impede eliminação do FVIII por receptores limpadores. Em outra modalidade, o fragmento de VWF liga-se a ou se associa com uma proteína FVIII e bloqueia ou impede a ligação da proteína FVIII ao fosfolípídeo e proteína C ativada por prevenção ou

inibição da ligação da proteína FVIII com VWF endógeno, de comprimento completo, o fragmento de VWF da invenção reduz a eliminação do FVIII por receptores de eliminação de VWF e, portanto, estende a meia-vida da proteína FVIII. Em uma modalidade, a extensão da meia-vida de uma proteína FVIII é assim devido à ligação de ou associação com o fragmento de VWF desprovido de um sítio de ligação ao receptor de eliminação VWF à proteína FVIII e blindando ou protegendo a proteína FVIII pelo fragmento de VWF do VWF endógeno, o qual contém o sítio de ligação do receptor de eliminação de VWF. A proteína FVIII ligada ou protegida pelo fragmento de VWF também pode permitir a reciclagem de uma proteína FVIII. Ao eliminar os sítios de ligação ao receptor da via de eliminação de VWF contidos na molécula de VWF de comprimento completo, os heterodímeros do FVIII/VWF da invenção são protegidos a partir da via de eliminação de VWF, que se estende além da meia-vida do FVIII.

[000144] Em uma modalidade, um fragmento de VWF da presente invenção compreende domínio D' e o domínio D3 de VWF, em que o domínio D' é, pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntico aos aminoácidos 764 a 866 da SEQ ID NO: 2, em que o fragmento de VWF impede a ligação do VWF a FVIII endógeno. Em outra modalidade, um fragmento de VWF compreende o domínio D' e o domínio D3 de VWF, em que o domínio D3 é pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica aos aminoácidos 867 a 1240 da SEQ ID NO: 2, em que o fragmento de VWF impede a ligação do VWF endógeno a FVIII. Em algumas modalidades, um fragmento de VWF aqui descrito compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em domínio D' e o domínio D3 de VWF, que são, pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idênticos aos aminoácidos 764 a 1240 da SEQ ID NO: 2, em que o fragmento de VWF impede a

ligação do VWF endógeno a FVIII. Em outras modalidades, um fragmento de VWF compreende, consiste essencialmente em, ou consiste nos domínios D1, D2, D', e D3, pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idênticos aos aminoácidos 23 a 1240 de SEQ ID NO: 2, em que o fragmento de VWF impede a ligação do VWF endógeno a FVIII. Em ainda outras modalidades, o fragmento de VWF compreende ainda um peptídeo de sinal ligado operativamente à mesma.

[000145] Em algumas modalidades, um fragmento de VWF da invenção consiste essencialmente em ou consiste em (1) o domínio D'D3, o domínio D1D'D3, domínio D2D'D3, ou domínio D1D2D'D3 e (2) uma sequência adicional de VWF até cerca de 10 aminoácidos (por exemplo, a partir de quaisquer sequências de aminoácidos 764 a 1240 de SEQ ID NO: 2 de aminoácidos 764 a 1250 da SEQ ID NO: 2), até cerca de 15 aminoácidos (por exemplo, quaisquer sequências de aminoácidos 764 a 1240 da SEQ ID NO: 2 aos aminoácidos 764 a 1255 da SEQ ID NO: 2), até cerca de 20 aminoácidos (por exemplo, quaisquer sequências de aminoácidos 764 a 1240 da SEQ ID NO: 2 para os aminoácidos 764-1260 da SEQ ID NO: 2), até cerca de 25 aminoácidos (por exemplo, quaisquer sequências de aminoácidos 764 a 1240 da SEQ ID NO: 2 aos aminoácidos 764-1265 da SEQ ID NO: 2), ou até cerca de 30 aminoácidos (por exemplo, quaisquer sequências de aminoácidos 764 a 1240 da SEQ ID NO: 2 aos aminoácidos 764-1260 da SEQ ID NO: 2). Em uma modalidade particular, o fragmento de VWF que compreende ou consiste essencialmente em domínio D' e o domínio D3 não é nem aminoácidos 764 a 1274 da SEQ ID NO: 2, nem VWF maduro de comprimento total. Em algumas modalidades, o domínio D1D2 é expresso em trans com o domínio D'D3. Em algumas modalidades, o domínio D1D2 é expresso em cis com o domínio D'D3.

[000146] Em outras modalidades, o fragmento de VWF compreen-

dendo os domínios D'D3 ligados aos domínios D1D2 compreendem ainda um sítio de clivagem intracelular, por exemplo, (um sítio de clivagem por PACE (furina) ou PC5), permitindo a clivagem dos domínios de D1D2 dos domínios D'D3 após a expressão. Exemplos não limitantes do sítio de clivagem intracelular são divulgadas em outra parte aqui.

[000147] Em ainda outras modalidades, um fragmento de VWF compreende o domínio D' e o domínio D3, mas não compreendem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em (1) aminoácidos 1241 a 2813 de SEQ ID NO: 2, (2) os aminoácidos 1270 aos aminoácidos 2813 de SEQ ID NO: 2, (3) os aminoácidos 1271 aos aminoácidos 2813 de SEQ ID NO: 2, (4) os aminoácidos 1272 aos aminoácidos 2813 de SEQ ID NO: 2, (5) os aminoácidos 1273 aos aminoácidos 2813 de SEQ ID NO: 2, (6) os aminoácidos 1274 aos aminoácidos 2813 de SEQ ID NO: 2, e quaisquer combinações dos mesmos.

[000148] Em ainda outras modalidades, um fragmento de VWF da presente invenção compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em uma sequência de aminoácidos correspondente ao domínio D', domínio D3, e domínio A1, em que a sequência de aminoácidos é pelo menos 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica aos aminoácidos 764 a 1479 da SEQ ID NO: 2, em que o fragmento de VWF impede a ligação do VWF endógeno a FVIII. Em uma modalidade particular, o fragmento de VWF não é os aminoácidos 764 a 1274 da SEQ ID NO: 2.

[000149] Em algumas modalidades, um fragmento de VWF da invenção compreende o domínio D' e o domínio D3, mas não compreende pelo menos um domínio de VWF selecionado a partir do grupo que consiste em (1) um domínio A1, (2) um domínio A2, (3) um domínio A3, (4) um domínio D4, (5) um domínio B1, (6) um domínio B2, (7) um

domínio B3, (8) um domínio C1, (9) um domínio C2, (10) um domínio CK, (11) um domínio CK e o domínio C2, (12) um domínio CK, um domínio C2, e um domínio C1, (13) um domínio CK, um domínio C2, um domínio C1, um domínio B3, (14) um domínio CK, um domínio C2, um domínio C1, um domínio B3, um domínio B2, (15) um domínio CK, um domínio C2, um domínio C1, um domínio B3, um domínio B2, e um domínio B1, (16) um domínio CK, um domínio C2, um domínio C1, um domínio B3, um domínio B2, um domínio B1, e um domínio D4, (17) um domínio CK, um domínio C2, um domínio C1, um domínio B3, um domínio B2, um domínio B1, um domínio D4, e um domínio A3, (18) um domínio CK, um domínio C2, um domínio C1, um B3 domínio, um domínio B2, um domínio B1, um domínio D4, um domínio A3, e um domínio A2, (19) um domínio CK, um domínio C2, um domínio C1, um domínio B3, um domínio B2, um domínio B1, um domínio D4, um domínio A3, um domínio A2, e um domínio A1, e (20) quaisquer combinações dos mesmos.

[000150] Ainda em outras modalidades, o fragmento VWF compreende os domínios D'D3 e um ou mais domínios ou módulos. Exemplos de tais domínios ou módulos incluem, entre outros, os domínios e módulos descritos em Zhou et al., Blood publicado online em 06 de abril de 2012: DOI 10.1182/blood-2012-01-405134. Por exemplo, o fragmento de VWF pode compreender o domínio D'D3 e um ou mais domínios ou módulos selecionados a partir do grupo que consiste em domínio A1, domínio A2, domínio A3, módulo D4N, módulo VWD4, módulo C8-4, módulo TIL-4, módulo C1, módulo C2, módulo C3, módulo C4, módulo C5, módulo C5, módulo C6, e quaisquer combinações dos mesmos.

[000151] Em ainda outras modalidades, o fragmento de VWF está ligado a uma fração heteróloga, em que a fração heteróloga é ligada ao N-terminal ou o C-terminal do fragmento de VWF ou inserido imedi-



atamente a jusante de um ou mais aminoácidos (por exemplo, um ou mais sítios de inserção XTEN) na proteína FVIII no fragmento de VWF. Por exemplo, os sítios de inserção para a fração heteróloga no fragmento de VWF podem ser no domínio D', domínio D3, ou ambos. A fração heteróloga pode ser um extensor da meia-vida.

[000152] Em certas modalidades, um fragmento de VWF da invenção forma um multímero, por exemplo, dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero, hexâmero, heptâmero, ou os multímeros de ordem superior. Em outras modalidades, o fragmento de VWF é um monômero que tem apenas um fragmento de VWF. Em algumas modalidades, o fragmento de VWF da presente invenção pode ter uma ou mais substituições, deleções, adições ou modificações de aminoácidos. Em uma modalidade, o fragmento de VWF pode incluir substituições, deleções, adições ou modificações de aminoácidos de tal modo que o fragmento de VWF não é capaz de formar uma ligação dissulfeto ou formando um dímero ou um multímero. Em outra modalidade, a substituição de aminoácidos está dentro do domínio D' e o domínio D3. Em uma modalidade particular, um fragmento de VWF da invenção contém, pelo menos uma substituição de aminoácido em um resíduo correspondente ao resíduo 1099, resíduo 1142, ou em ambos os resíduos 1099 e 1142 da SEQ ID NO: 2. A substituição de pelo menos um aminoácido pode ser quaisquer aminoácidos que não ocorrem naturalmente no VWF tipo selvagem. Por exemplo, a substituição de aminoácidos pode ser qualquer outro aminoácido além de cisteína, por exemplo, isoleucina, alanina, leucina, asparagina, lisina, ácido aspártico, metionina, fenilalanina, ácido glutâmico, treonina, glutamina, triptofano, glicina, valina, prolina, serina, tirosina, arginina, ou histidina. Em outro exemplo, a substituição de aminoácidos tem um ou mais aminoácidos que impedem ou inibem os fragmentos de VWF de formarem multímeros.

[000153] Em certas modalidades, o fragmento de VWF útil aqui pode

ainda ser modificado para melhorar a sua interação com o FVIII, por exemplo, para melhorar a afinidade de ligação ao FVIII. Como um exemplo não limitante, o fragmento de VWF compreende um resíduo serina no resíduo correspondente ao aminoácido 764 de SEQ ID NO: 2 e um resíduo de lisina no resíduo correspondente ao aminoácido 773 de SEQ ID NO: 2. Os resíduos 764 e/ou 773 podem contribuir para a afinidade de ligação dos fragmentos de VWF para o FVIII. Em outras modalidades, os fragmentos de VWF úteis para a invenção pode ter outras modificações, por exemplo, a proteína pode ser peguilada, glicosilada, hesilada, ou polissialiladas.

#### B) Sequências XTEN

[000154] Como usado aqui "sequência XTEN" refere-se aos polipeptídeos de comprimento estendido, com sequências que não ocorrem naturalmente substancialmente não repetitivas que são compostas principalmente de pequenos aminoácidos hidrofílicos, com a sequência possuindo um baixo grau ou nenhuma estrutura secundária ou terciária sob condições fisiológicas. Como parceiro da proteína quimérica, XTENS podem servir como um transportador, que confere certas propriedades farmacocinéticas, físico-químicas e farmacêuticas desejáveis, quando ligadas a um fragmento de VWF ou uma sequência FVIII da invenção para criar uma proteína quimérica. Tais propriedades desejáveis incluem, entre outras, parâmetros farmacocinéticos melhorados e características de solubilidade. Como aqui utilizado, "XTEN" exclui especificamente anticorpos ou fragmentos de anticorpos, como anticorpos de cadeia única ou fragmentos Fc de uma cadeia leve ou uma cadeia pesada.

[000155] Em algumas modalidades, a sequência XTEN da invenção é um peptídeo ou um polipeptídeo tendo mais do que cerca de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600,

1800, ou 2000 resíduos de aminoácidos. Em certas modalidades, XTEN é um peptídeo ou um polipeptídeo possuindo mais de cerca de 20 a cerca de 3000 resíduos de aminoácidos, mais do que 30 a cerca de 2500 resíduos, mais do que 40 a cerca de 2000 resíduos, mais do que 50 a cerca de 1500 resíduos, mais do que cerca de 60 a 1000 resíduos, mais do que 70 até cerca de 900 resíduos, mais do que 80 até cerca de 800 resíduos, mais do que 90 até cerca de 700 resíduos, mais do que 100 a cerca de 600 resíduos, mais do que 110 a cerca de 500 resíduos, ou mais do que 120 a cerca de 400 resíduos.

[000156] A sequência XTEN da invenção pode compreender um ou mais motif de sequência de 9 a 14 resíduos de aminoácidos ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntica ao motif de sequência, em que o motif compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em 4 a 6 tipos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em glicina (g), alanina (a), serina (S), treonina (T), glutamato (e) e prolina (P). Ver US 2010- 0239554 A1.

[000157] Em algumas modalidades, a XTEN compreende motifs de sequências não sobrepostas em que cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 85%, ou pelo menos cerca de 90%, ou cerca de 91%, ou cerca de 92%, ou cerca de 93%, ou cerca de 94%, ou cerca de 95%, ou cerca de 96%, ou cerca de 97%, ou cerca de 98%, ou cerca de 99% ou cerca de 100% da sequência consiste em várias unidades de sequências não sobrepostas selecionadas a partir de um família de motif único selecionada a partir da Tabela 2A, o que resulta em uma sequência família. Como aqui utilizado, "família" significa que a XTEN tem motifs selecionados apenas a partir de uma única categoria motif da Tabela 2A; ou seja, AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC, BD ou XTEN, e que quaisquer outros aminoácidos na XTEN não a partir de um motif família são selecionados para atingir uma propriedade necessária,

como para permitir a incorporação de um sítio de restrição pelos nucleotídeos de codificação, incorporação de uma sequência de clivagem, ou para alcançar uma melhor ligação com FVIII ou VWF. Em algumas modalidades de famílias XTEN, uma sequência XTEN compreende múltiplas unidades de motifs de sequências não sobrepostas da família motif AD, ou a família de motif AE, ou da família motif AF, ou a família motif AG, ou família motif AM, ou da família motif AQ, ou família BC, ou família BD, com a XTEN resultante exibindo a faixa de homologia descrita acima. Em outras modalidades, a XTEN compreende múltiplas unidades de sequências do motif de duas ou mais das famílias motif da Tabela 2A. Estas sequências podem ser selecionadas para se conseguir características físicas/químicas desejadas, incluindo tais propriedades, como carga líquida, hidrofiliabilidade, falta de estrutura secundária, ou a falta de repetição que são conferidas pela composição de aminoácidos dos motifs, descrito mais completamente abaixo. Nas modalidades aqui anteriormente descritas neste parágrafo, os motifs incorporados na XTEN podem ser selecionados e montada utilizando os métodos aqui descritos para alcançar uma XTEN de cerca de 36 a cerca de 3000 resíduos de aminoácidos.

**Tabela 2A. Motivos de Sequência XTEN de 12 Aminoácidos e Famílias de Motivos**

<b>Família de Motivos*</b>	<b>Sequência do motivo</b>
AD	GESPGGSSGSES
AD	GSEGSSGPGESS
AD	GSSESGSSEGGP
AD	GSGGEPSESGSS
AE, AM	GSPAGSPTSTEE
AE, AM, AQ	GSEPATSGSETP
AE, AM, AQ	GTSESATPESGP
AE, AM, AQ	GTSTEPSEGSAP

<b>Família de Motivos*</b>	<b>Sequência do motivo</b>
AF, AM	GSTSESPSGTAP
AF, AM	GTSTPESGSASP
AF, AM	GTSPSGESSTAP
AF, AM	GSTSSTAESPGP
AG, AM	GTPGSGTASSSP
AG, AM	GSSTPSGATGSP
AG, AM	GSSPSASTGTGP
AG, AM	GASPGTSSTGSP
AQ	GEPAGSPTSTSE
AQ	GTGEPSTPASE
AQ	GSGPSTESAPTE
AQ	GSETPSGPSETA
AQ	GPSETSTSEPGA
AQ	GSPSEPTGEGTSA
BC	GSGASEPTSTEP
BC	GSEPATSGTEPS
BC	GTSEPSTSEPGA
BC	GTSTEPSEPGSA
BD	GSTAGSETSTEA
BD	GSETATSGSETA
BD	GTSESATSESGA
BD	GTSTEASEGSAS

\*Denota sequências individuais de motif que, quando usadas em conjunto em várias permutações, resulta em uma "sequência de família" [000158] XTEN pode ter diferentes comprimentos para inserção ou ligação com FVIII ou VWF. Em uma modalidade, o comprimento das sequências de XTEN é escolhido com base na propriedade ou função a ser conseguida na proteína de fusão. Dependendo da propriedade ou função pretendida, XTEN pode ser uma sequência de comprimento

curto ou intermediário ou sequência mais longa que podem servir como transportadores. Em certas modalidades, a XTEN incluiu segmentos curtos de cerca de 6 a cerca de 99 resíduos de aminoácidos, os comprimentos intermediários de cerca de 100 a cerca de 399 resíduos de aminoácidos, e comprimentos mais longos de cerca de 400 a cerca de 1000 e até cerca de 3000 resíduos de aminoácidos. Assim, a XTEN inseridas ou ligada a FVIII ou VWF pode ter comprimentos de cerca de 6, cerca de 12, cerca de 36, cerca de 40, cerca de 42, cerca de 72, cerca de 96, cerca de 144, cerca de 288, cerca de 400, cerca de 500, cerca de 576, cerca de 600, cerca de 700, cerca de 800, cerca de 864, cerca de 900, cerca de 1000, cerca de 1500, cerca de 2000, cerca de 2500, ou a cerca de 3000 resíduos de aminoácidos de comprimento. Em outras modalidades, as sequências XTEN são de cerca de 6 a cerca de 50, cerca de 50 a cerca de 100, cerca de 100 a 150, cerca de 150 a 250, cerca de 250 a 400, cerca de 400 a cerca de 500, cerca de 500 a cerca de 900, cerca de 900 a 1500, cerca de 1500 a 2000, ou cerca de 2000 a cerca de 3000 resíduos de aminoácidos de comprimento. O comprimento exato de uma XTEN inserida ou ligada a FVIII ou VWF pode variar sem afetar adversamente a atividade do FVIII ou VWF. Em uma modalidade, uma ou mais das XTEN aqui utilizadas têm 36 aminoácidos, 42 aminoácidos, 72 aminoácidos, 144 aminoácidos, 288 aminoácidos, 576 aminoácidos, ou 864 aminoácidos de comprimento e podem ser selecionadas a partir de uma ou mais das sequências familiares XTEN; ou seja, AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC ou BD.

[000159] Em algumas modalidades, a sequência XTEN utilizado na invenção é pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a uma sequência selecionado a partir do grupo que consiste em AE42, AG42, AE48, AM48, AE72, AG72, AE108, AG108, AE144, AF144, AG144, AE180, AG180, AE216, AG216, AE252, AG252, AE288, AG288, AE324,

AG324, AE360, AG360, AE396, AG396, AE432, AG432, AE468, AG468, AE504, AG504, AF504, AE540, AG540, AF540, AD576, AE576, AF576, AG576, AE612, AG612, AE624, AE648, AG648, AG684, AE720, AG720, AE756, AG756, AE792, AG792, AE828, AG828, AD836, AE864, AF864, AG864, AM875, AE912, AM923, AM1318, BC864, BD864, AE948, AE1044, AE1140, AE1236, AE1332, AE1428, AE1524, AE1620, AE1716, AE1812, AE1908, AE2004A, AG948, AG1044, AG1140, AG1236, AG1332, AG1428, AG1524, AG1620, AG1716, AG1812, AG1908, e AG2004. Ver US 2010-0239554 A1.

[000160] Em uma modalidade, a sequência XTEN é pelo menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo de AE42 (SEQ ID NO: 36), AE72 (SEQ ID NO: 127), AE144\_2A (SEQ ID NO: 128), AE144\_3B (SEQ ID NO: 129), AE144\_4A (SEQ ID NO: 130), AE144\_5A (SEQ ID NO: 131), AE144\_6B (SEQ ID NO: 132), AG144\_A (SEQ ID NO: 133), AG144\_B (SEQ ID NO: 134), AG144\_C (SEQ ID NO: 135), AG144\_F (SEQ ID NO: 136), AE864 (SEQ ID NO: 43), AE576 (SEQ ID NO: 41), AE288 (SEQ ID NO: 39), AE288\_2 (SEQ ID NO: 137), AE144 (SEQ ID NO: 37), AG864 (SEQ ID NO: 44), AG576 (SEQ ID NO: 42), AG288 (SEQ ID NO: 40), AG144 (SEQ ID NO: 38), e quaisquer combinações dos mesmos.

[000161] Em algumas modalidades, menos do que 100% de aminoácidos de uma XTEN são selecionados a partir de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) e prolina (P), ou menos do que 100% da sequência consiste nos motivos da sequência da Tabela 2A ou as sequências XTEN da Tabela 2B. Em tais modalidades, os restantes resíduos de aminoácidos da XTEN são selecionados a partir de qualquer um dos outros 14 L-aminoácidos naturais, mas podem ser preferencialmente selecionados a partir de aminoácidos hidrofílicos, de

modo que a sequência XTEN contém pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou pelo menos cerca de 99% de aminoácidos hidrofílicos. O teor de aminoácidos hidrofóbicos na XTEN utilizada nos constructos de conjugação pode ser de menos do que 5%, ou menos do que 2%, ou menos do que 1% de conteúdo em aminoácido hidrofóbico. Resíduos hidrofóbicos que são menos favorecidos no constructo de XTEN incluem triptofano, fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina, valina, metionina e. Além disso, as sequências XTEN podem conter menos de 5% ou menos do que 4% ou menos de 3% ou menos do que 2% ou menos do que 1% ou nenhum dos seguintes aminoácidos: metionina (por exemplo, para evitar a oxidação), ou asparagina e glutamina (para evitar desamidação).

[000162] Em outra modalidade, a sequência XTEN é selecionada a partir do grupo que consiste em AE42 (SEQ ID NO: 36), AE72 (SEQ ID NO: 127), AE144\_2A (SEQ IDNO: 128), AE144\_3B (SEQ ID NO: 129), AE144\_4A (SEQ ID NO: 130), AE144\_5A (SEQ IDNO: 131), AE144\_6B (SEQ IDNO: 132), AG144\_A (SEQ ID NO: 133), AG144\_B (SEQ IDNO: 134), AG144\_C (SEQ ID NO: 135), AG144\_F (SEQ IDNO: 136), AE864 (SEQ ID NO: 43), AE576 (SEQ ID NO: 41), AE288 (SEQ IDNO: 39), AE288\_2 (SEQ ID NO: 137), AE144 (SEQ ID NO: 37), AG864 (SEQ ID NO: 44), AG576 (SEQ ID NO: 42), AG288 (SEQ ID NO: 40), AG144 (SEQ ID NO: 38), e quaisquer combinações dos mesmos. Em uma modalidade específica, a sequência XTEN é AE288. As sequências de aminoácidos para certas sequências XTEN da invenção são mostradas na Tabela 2B.



**TABELA 2B.** Sequências XTEN

XTEN	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDO
AE42 SEQ ID NO: 36	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS
AE72 SEQ ID NO: 127	GAPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGASS
AE144 SEQ ID NO:37	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSESA PESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144_2A (SEQ ID NO: 128)	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPG
AE144_3B (SEQ ID NO: 129)	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APG
AE144_4A (SEQ ID NO: 130)	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APG
AE144_5A (SEQ ID NO:	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST

131)	EEG
AE144_6B (SEQ ID NO: 132)	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APG
AG144 SEQ ID NO:38	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS TGSPGSSPSA STGTGPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP
AG144_A (SEQ ID NO: 133)	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSP
AG144_B (SEQ ID NO: 134)	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSP
AG144_C (SEQ ID NO: 135)	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGSSPSASTGTGPGTTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST GSP
AG144_F (SEQ ID NO: 136)	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT GPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST GSP
AE288 SEQ ID NO:39	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAP
AE288_2 (SEQ ID NO: 137)	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAP
AG288	PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG

SEQ NO:40	ID	SPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTG TGPSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGPSSPSAST GTGPSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGS
AE576 SEQ NO:41	ID	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG576 SEQ NO:42	ID	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAST GTGPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS
AE864		GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGS

SEQ NO:43	ID	PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSPAGSP TSTEETSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAG SPTSTEETSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG864 SEQ NO:44	ID	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTP SGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP PSGATGSPGSSTP PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGAS PGTSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSP

	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
--	--

[000163] De acordo com outras modalidades, a sequência XTEN utilizada na invenção afeta a propriedade física ou química, por exemplo, farmacocinética da proteína quimérica da presente invenção. A sequência XTEN utilizada na presente invenção pode exibir uma ou mais das seguintes propriedades vantajosas: flexibilidade conformacional, solubilidade aquosa melhorada, elevado grau de resistência a proteases, baixa imunogenicidade, baixa ligação aos receptores de mamíferos, ou raios hidrodinâmicos aumentados (ou Stokes). Em uma modalidade específica, a sequência XTEN ligada a uma proteína FVIII na presente invenção aumenta as propriedades farmacocinéticas como a meia-vida de eliminação mais longa ou aumento da área sob a curva (AUC), de modo que a proteína quimérica aqui descrita permanece *in vivo* durante um período de tempo aumentado em comparação com o tipo selvagem do FVIII. Em outras modalidades, a sequência XTEN utilizada na presente invenção aumenta as propriedades farmacocinéticas, como meia-vida de eliminação mais longa ou aumento da área sob a curva (AUC), de modo que a proteína FVIII permanece *in vivo* por um período de aumentado tempo em comparação com o tipo selvagem do FVIII.

[000164] Uma variedade de métodos e ensaios podem ser utilizados para determinar as propriedades físico/química de proteínas que compõem a sequência XTEN. Tais métodos incluem, entre outros, centrifugação analítica, EPR, HPLC de troca iônica, HPLC de exclusão de tamanho, a HPLC de fase reversa, dispersão de luz, eletroforese capilar, dicroísmo circular, calorimetria de varrimento diferencial, fluorescência, HPLC de troca iônica, HPLC por exclusão de tamanho, IR,

RMN, espectroscopia Raman, refratometria, e espectroscopia UV/visível. Métodos adicionais estão descritos na Amau et al., Prot Expr Purif e 48, 1-13 (2006).

[000165] Outros exemplos de sequências de XTEN que podem ser utilizadas de acordo com a presente invenção e são divulgados nas Publicações de Patentes US 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1, ou 2011/0172146 A1, ou Publicação de Patente Internacional WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1, ou WO 2011028344 A2.

#### C) Proteína de Fator VIII (FVIII)

[000166] "Uma proteína FVIII", como aqui utilizado, significa um polipeptídeo funcional do FVIII no seu papel normal de coagulação, a menos que especificado de outra forma. O termo uma proteína FVIII inclui um fragmento funcional, variante, análogo, ou derivado do mesmo que mantém a função de comprimento total do tipo selvagem do Fator VIII na via de coagulação. "Uma proteína FVIII" é utilizado alternadamente com polipeptídeo FVIII (ou proteína) ou FVIII. Exemplos de funções do FVIII incluem, entre outras, uma capacidade para ativar a coagulação, uma capacidade para atuar como um cofator para o fator IX, ou uma capacidade para formar um complexo de tenase com o fator IX na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolipídeos, que, em seguida, convertem o Fator X em forma ativada Xa. A proteína FVIII pode ser um ser proteína FVIII humana, porcina, canina, de rato ou murina. Além disso, comparações entre os FVIII de seres humanos e outras espécies foram identificadas resíduos conservados que são susceptíveis de serem necessários para a função (Cameron et al., Thromb Haemost 79: 317-22 (1998); US 6.251.632).

[000167] Um número de testes está disponível para avaliar a função do sistema de coagulação: teste de tempo de tromboplastina parcial

ativada (aPTT), ensaio cromogênico, ensaio ROTEM, ensaio do tempo de protrombina (PT) (também utilizada para determinar INR), testes de fibrinogênio (muitas vezes pelo método de Clauss), contagem de plaquetas, os ensaios da função plaquetária (frequentemente por PFA-100), TCT, tempo de sangramento, teste misto (quando uma anormalidade corrige se o plasma do paciente é misturado com plasma normal), ensaios de fator de coagulação, anticorpos antifosfolipídicos), dímero-D, testes genéticos (por exemplo, fator V Leiden, mutação da protrombina G20210A), tempo veneno de víbora de Russell diluído (dRVVT), testes variados de função plaquetária, tromboelastografia (TEG ou Sonoclot), tromboelastometria (TEM®, por exemplo, Rotem®), ou tempo de lise de euglobina (ELT).

[000168] O ensaio do aPTT é um indicador de desempenho da medição da eficácia de ambas as vias "intrínseca" (também referida a via de ativação de contato) e a coagulação comum. Este teste é comumente usado para medir a atividade de coagulação dos fatores de coagulação recombinantes comercialmente disponíveis, por exemplo, FVIII ou FIX. Ele é utilizado em conjunto com o tempo de protrombina (PT), que mede a via extrínseca.

[000169] A análise de Rotem fornece informações sobre toda a cinética de hemostase: tempo de coagulação, a formação do coágulo, a estabilidade do coágulo e de lise. Os diferentes parâmetros em tromboelastometria são dependentes da atividade do sistema de coagulação plasmática, a função plaquetária, a fibrinólise, ou muitos fatores que influenciam essas interações. Este ensaio pode fornecer uma visão completa da hemostase secundária.

[000170] As sequências de polinucleotídeos e polipeptídeo do FVIII e são conhecidas, como são muitos fragmentos funcionais, mutantes e versões modificadas. Exemplos de sequências do FVIII humano (comprimento total) são mostrados abaixo.

**TABELA 3.** Sequência de aminoácidos de Fator VIII de comprimento total (FVIII de comprimento completo (peptídeo sinal de FVIII sublinhado; cadeia pesado de FVIII é duplo sublinhado; domínio B está em itálico, e cadeia leve FVIII é em texto simples)

Peptídeo sinal (SEQ ID NO: 3)
<u><u>MQIELSTCFFLCLLRFCFS</u></u>
Fator VIII maduro I (SEQ ID NO: 4)*
<u>ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSPFNTSVVYKKTLEFVEFT</u> <u>DHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYD TVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASE</u> <u>GAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSH TYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLV</u> <u>KDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDR</u> <u>DAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTP EVHSIFLEGHT</u> <u>FLVRNHRQASLEISPI TELTAQTLLMDLGQFLLEFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCP</u> <u>EEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHY</u> <u>IAAEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTRE</u> <u>AIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGV</u> <u>KHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLASGLIGP</u> <u>LLICYKESVDQRGNOIMSDKRN VILFSVFDENRSWYLTENIQRF LNPAGVOLED</u> <u>PEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTEKH</u> <u>KMVYEDTLTLFPFSGETVFM SMENPGLWILGCHNSDFERNRGMTALLKVSSCDKNT</u> <u>GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSONSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD</u> <u>PWFAHRTFMPKIQNVSSDDLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEA KYETFSDDPSPGAI</u> <u>DSNNSLSEMTHFRPQLHHS GDMVFTPESEGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSS</u> <u>TSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLD TTLFGKKSSPLTESGGP</u> <u>LSLSEENND SKLLESGLMNSQESSWGKNVSSSTESGRLFKGKRAHG PALLT KDNAL</u> <u>FKVSI SLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENS PSVWQNI LESDTEFKVTPL</u> <u>IHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQ QKKEGPIPPDAQNPDMSFFKML</u> <u>FLPESARWIQORTHGKNSLNSGQGPS PKQLVSLGPEKSV EQNFLSEKNKV VVGKG</u> <u>EFTKDVGLKEMVFPSSRNLF LTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENNV</u> <u>LPQIHTVTGTKNFEMKNL FLLSTRQNVESGYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNR TKKHT</u> <u>AHFSKKGEEENLEGLGNQTKQ IVEKYACTTRISPNTSQQN FVTQRSKRALKQFRL</u> <u>PLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAI TQSP LSDCLT</u> <u>RSHSIPQANRSP LPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRK KDSGVQE</u> <u>SSHFLQGA KKNLSLAILTLEMTGDQREV GSLGTSATNSVTYKKVENTVLPK PDL</u> <u>PKTSGKV ELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEG SLLQGTEGAIKWNEANR</u> <u>PGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQ I PKEEWKSQEKSP EKTAFKKK</u> <u>DTILSLNACESNHAI AAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREI</u> <u>TRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDE DENQSPRSFQKKTRHYFIAAVER</u> <u>LWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLG</u>
PYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLI SYEEDQRQGAEP RKNFVKPNETKTY FWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQ VTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYI MDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYP GVFEETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDF QITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHGIKTQGAR QKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPII ARYIRLHPHTYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMF ATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSM YVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHP QSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY



**TABELA 4. Sequência de nucleotídeos de codificação FVIII de comprimento total (SEQ ID NO 5)\***

---

661	CAAATAGAGC TCTCCACCTG	ATG
721	CTTCTTTCTG TGCCTTTTGC GATTCTGCTT TAGTGCCACC	
	AGAAGATACT ACCTGGGTGC	
781	AGTGGAAGCTG TCATGGGACT ATATGCAAAG TGATCTCGGT	
	GAGCTGCCTG TGGACGCAAG	
841	ATTCCTCCT AGAGTGCCAA AATCTTTTCC ATTCAACACC	
	TCAGTCGTGT ACAAAAAGAC	
901	TCTGTTTGTA GAATTCACGG ATCACCTTTT CAACATCGCT	
	AAGCCAAGGC CACCCTGGAT	
961	GGGTCTGCTA GGTCTACCA TCCAGGCTGA GGTTTATGAT	
	ACAGTGGTCA TTACACTTAA	
1021	GAACATGGCT TCCCATCCTG TCAGTCTTCA TGCTGTTGGT	
	GTATCCTACT GGAAAGCTTC	
1081	TGAGGGAGCT GAATATGATG ATCAGACCAG TCAAAGGGAG	
	AAAGAAGATG ATAAAGTCTT	
1141	CCCTGGTGGA AGCCATACAT ATGTCTGGCA GGTCCTGAAA	
	GAGAATGGTC CAATGGCCTC	
1201	TGACCCACTG TGCCTTACCT ACTCATATCT TTCTCATGTG	
	GACCTGGTAA AAGACTTGAA	
1261	TTCAGGCCTC ATTGGAGCCC TACTAGTATG TAGAGAAGGG	
	AGTCTGGCCA AGGAAAAGAC	
1321	ACAGACCTTG CACAAATTTA TACTACTTTT TGCTGTATTT	
	GATGAAGGGA AAAGTTGGCA	
1381	CTCAGAAACA AAGAACTCCT TGATGCAGGA TAGGGATGCT	
	GCATCTGCTC GGCCTGGCC	
1441	TAAAATGCAC ACAGTCAATG GTTATGTAAA CAGGTCTCTG	
	CCAGGTCTGA TTGGATGCCA	
1501	CAGGAAATCA GTCTATTGGC ATGTGATTGG AATGGGCACC	
	ACTCCTGAAG TGCACTCAAT	

1561 ATTCCTCGAA GGTCACACAT TTCTTGTGAG GAACCATCGC  
 CAGGCGTCCT TGGAAATCTC  
 1621 GCCAATAACT TTCCTTACTG CTCAAACACT CTTGATGGAC  
 CTTGGACAGT TTCTACTGTT  
 1681 TTGTCATATC TCTTCCCACC AACATGATGG CATGGAAGCT  
 TATGTCAAAG TAGACAGCTG  
 1741 TCCAGAGGAA CCCCACACTAC GAATGAAAAA TAATGAAGAA  
 GCGGAAGACT ATGATGATGA  
 1801 TCTTACTGAT TCTGAAATGG ATGTGGTCAG GTTTGATGAT  
 GACAACTCTC CTTCCCTTTAT  
 1861 CCAAATTCGC TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAAACTTGG  
 GTACATTACA TTGCTGCTGA  
 1921 AGAGGAGGAC TGGGACTATG CTCCTTAGT CCTCGCCCCC  
 GATGACAGAA GTTATAAAAG  
 1981 TCAATATTTG AACAATGGCC CTCAGCGGAT TGGTAGGAAG  
 TACAAAAAAG TCCGATTTAT  
 2041 GGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTATT  
 CAGCATGAAT CAGGAATCTT  
 2101 GGGACCTTTA CTTTATGGGG AAGTTGGAGA CACACTGTTG  
 ATTATATTTA AGAATCAAGC  
 2161 AAGCAGACCA TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT  
 GTCCGTCCTT TGTATTCAAG  
 2221 GAGATTACCA AAAGGTGTAA AACATTTGAA GGATTTTCCA  
 ATTCTGCCAG GAGAAATATT  
 2281 CAAATATAAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT  
 AAATCAGATC CTCGGTGCCT  
 2341 GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATAT GGAGAGAGAT  
 CTAGCTTCAG GACTCATTGG  
 2401 CCCTCTCCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGA  
 GGAAACCAGA TAATGTCAGA  
 2461 CAAGAGGAAT GTCATCCTGT TTTCTGTATT TGATGAGAAC  
 CGAAGCTGGT ACCTCACAGA  
 2521 GAATATACAA CGCTTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCAG  
 CTTGAGGATC CAGAGTTCCA  
 2581 AGCCTCCAAC ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTT  
 GATAGTTTGC AGTTGTCAGT  
 2641 TTGTTTGCAT GAGGTGGCAT ACTGGTACAT TCTAAGCATT  
 GGAGCACAGA CTGACTTCCT  
 2701 TTCTGTCTTC TTCTCTGGAT ATACCTTCAA ACACAAAATG  
 GTCTATGAAG ACACACTCAC  
 2761 CCTATTCCCA TTCTCAGGAG AAACTGTCTT CATGTGCATG  
 GAAAACCCAG GTCTATGGAT  
 2821 TCTGGGGTGC CACAACCTAG ACTTTCGGAA CAGAGGCATG  
 ACCGCCTTAC TGAAGGTTTC  
 2881 TAGTTGTGAC AAGAACACTG GTGATTATTA CGAGGACAGT  
 TATGAAGATA TTTCAGCATA  
 2941 CTTGCTGAGT AAAAACAATG CCATTGAACC AAGAAGCTTC  
 TCCCAGAATT CAAGACACCC  
 3001 TAGCACTAGG CAAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTCCA  
 GAAAATGACA TAGAGAAGAC

3061 TGACCCTTGG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAATA  
 CAAAATGTCT CCTCTAGTGA  
 3121 TTTGTTGATG CTCTTGCGAC AGAGTCCTAC TCCACATGGG  
 CTATCCTTAT CTGATCTCCA  
 3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT  
 GGAGCAATAG ACAGTAATAA  
 3241 CAGCCTGTCT GAAATGACAC ACTTCAGGCC ACAGCTCCAT  
 CACAGTGGGG ACATGGTATT  
 3301 TACCCCTGAG TCAGGCCTCC AATTAAGATT AAATGAGAAA  
 CTGGGGACAA CTGCAGCAAC  
 3361 AGAGTTGAAG AAACCTTGATT TCAAAGTTTC TAGTACATCA  
 AATAATCTGA TTTCAACAAT  
 3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTACTGA TAATACAAGT  
 TCCTTAGGAC CCCCAAGTAT  
 3481 GCCAGTTCAT TATGATAGTC AATTAGATAC CACTCTATTT  
 GGCAAAAAGT CATCTCCCCT  
 3541 TACTGAGTCT GGTGGACCTC TGAGCTTGAG TGAAGAAAAT  
 AATGATTCAA AGTTGTTAGA  
 3601 ATCAGGTTTA ATGAATAGCC AAGAAAGTTC ATGGGGAAAA  
 AATGTATCGT CAACAGAGAG  
 3661 TGGTAGGTTA TTAAAGGGA AAAGAGCTCA TGGACCTGCT  
 TTGTTGACTA AAGATAATGC  
 3721 CTTATTCAAA GTTAGCATCT CTTTGTAAA GACAAACAAA  
 ACTTCCAATA ATTCAGCAAC  
 3781 TAATAGAAAG ACTCACATTG ATGGCCCATC ATTATTAATT  
 GAGAATAGTC CATCAGTCTG  
 3841 GCAAAATATA TTAGAAAGTG ACACTGAGTT TAAAAAAGTG  
 ACACCTTTGA TTCATGACAG  
 3901 AATGCTTATG GACAAAAATG CTACAGCTTT GAGGCTAAAT  
 CATATGTCAA ATAAACTAC  
 3961 TTCATCAAAA AACATGGAAA TGGTCCAACA GAAAAAAGAG  
 GGCCCCATTC CACCAGATGC  
 4021 ACAAATCCA GATATGTCGT TCTTTAAGAT GCTATTCTTG  
 CCAGAATCAG CAAGGTGGAT  
 4081 ACAAAGGACT CATGGAAAGA ACTCTCTGAA CTCTGGGCAA  
 GGCCCCAGTC CAAAGCAATT  
 4141 AGTATCCTTA GGACCAGAAA AATCTGTGGA AGGTCAGAAT  
 TTCTTGTCTG AGAAAAACAA  
 4201 AGTGGTAGTA GGAAAGGGTG AATTTACAAA GGACGTAGGA  
 CTCAAAGAGA TGGTTTTTCC  
 4261 AAGCAGCAGA AACCTATTTT TACTAAGTT GGATAATTTA  
 CATGAAAATA ATACACACAA  
 4321 TCAAGAAAAA AAAATTTCAGG AAGAAATAGA AAAGAAGGAA  
 ACATTAATCC AAGAGAATGT  
 4381 AGTTTTGCCT CAGATACATA CAGTGACTGG CACTAAGAAT  
 TTCATGAAGA ACCTTTTCTT  
 4441 ACTGAGCACT AGGCAAAATG TAGAAGGTTC ATATGACGGG  
 GCATATGCTC CAGTACTTCA  
 4501 AGATTTTAGG TCATTAAATG ATTCAACAAA TAGAACAAAG  
 AAACACACAG CTCATTTCTC

4561 AAAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGGAAGG CTTGGGAAAT  
 CAAACCAAGC AAATTGTAGA  
 4621 GAAATATGCA TGCACCACAA GGATATCTCC TAATACAAGC  
 CAGCAGAATT TTGTCACGCA  
 4681 ACGTAGTAAG AGAGCTTTGA AACAAATTCAG ACTCCCCTA  
 GAAGAAACAG AACTTGAAAA  
 4741 AAGGATAATT GTGGATGACA CCTCAACCCA GTGGTCCAAA  
 AACATGAAAC ATTTGACCCC  
 4801 GAGCACCTC ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA  
 GGGGCCATTA CTCAGTCTCC  
 4861 CTTATCAGAT TGCCTTACGA GGAGTCATAG CATCCCTCAA  
 GCAAATAGAT CTCCATTACC  
 4921 CATTGCAAAG GTATCATCAT TTCCATCTAT TAGACCTATA  
 TATCTGACCA GGGTCCTATT  
 4981 CCAAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA  
 AAGAAAGATT CTGGGGTCCA  
 5041 AGAAAGCAGT CATTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAAC  
 CTTTCTTTAG CCATTCTAAC  
 5101 CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGAGAGGT TGGCTCCCTG  
 GGGACAAGTG CCACAAATTC  
 5161 AGTCACATAC AAGAAAGTTG AGAACACTGT TCTCCCGAAA  
 CCAGACTTGC CCAAAACATC  
 5221 TGGCAAAGTT GAATTGCTTC CAAAAGTTCA CATTTATCAG  
 AAGGACCTAT TCCCTACGGA  
 5281 AACTAGCAAT GGGTCTCCTG GCCATCTGGA TCTCGTGGA  
 GGGAGCCTTC TTCAGGGAAC  
 5341 AGAGGGAGCG ATTAAGTGGA ATGAAGCAAA CAGACCTGGA  
 AAAGTTCCCT TTCTGAGAGT  
 5401 AGCAACAGAA AGCTCTGCAA AGACTCCCTC CAAGCTATTG  
 GATCCTCTTG CTTGGGATAA  
 5461 CCACTATGGT ACTCAGATAC CAAAAGAAGA GTGGAAATCC  
 CAAGAGAAGT CACCAGAAAA  
 5521 AACAGCTTTT AAGAAAAAGG ATACCATTTT GTCCCTGAAC  
 GCTTGTGAAA GCAATCATGC  
 5581 AATAGCAGCA ATAAATGAGG GACAAAATAA GCCCGAAATA  
 GAAGTCACCT GGGCAAAGCA  
 5641 AGGTAGGACT GAAAGGCTGT GCTCTCAAAA CCCACCAGTC  
 TTGAAACGCC ATCAACGGGA  
 5701 AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAATT  
 GACTATGATG ATACCATATC  
 5761 AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT TTATGATGAG  
 GATGAAAATC AGAGCCCCCG  
 5821 CAGCTTTCAA AAGAAAACAC GACACTATTT TATTGCTGCA  
 GTGGAGAGGC TCTGGGATTA  
 5881 TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG AAACAGGGCT  
 CAGAGTGGCA GTGTCCCTCA  
 5941 GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC TGATGGCTCC  
 TTTACTCAGC CCTTATACCG  
 6001 TGGAGAACTA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT  
 ATAAGAGCAG AAGTTGAAGA

6061 TAATATCATG GTAAC TTTC A GAAATCAGGC CTCTCGTCCC  
 TATTCCTTCT ATTCTAGCCT  
 6121 TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT  
 AGAAAAAACT TTGTCAAGCC  
 6181 TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT  
 ATGGCACCCA CTAAAGATGA  
 6241 GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC  
 CTGGAAAAAG ATGTGCACTC  
 6301 AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA  
 CTGAACCCTG CTCATGGGAG  
 6361 ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTCACCATC  
 TTTGATGAGA CCAAAGCTG  
 6421 GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAACTG CAGGGCTCCC  
 TGCAATATCC AGATGGAAGA  
 6481 TCCCCTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT  
 GGCTACATAA TGGATACACT  
 6541 ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTGATGG  
 TATCTGCTCA GCATGGGCAG  
 6601 CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCA TGGACATGTG  
 TTTACTGTAC GAAAAAAGA  
 6661 GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT  
 TTTGAGACAG TGGAAATGTT  
 6721 ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGCGGGTGGG ATGCCTTATT  
 GGCGAGCATC TACATGCTGG  
 6781 GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTGAG  
 ACTCCCCTGG GAATGGCTTC  
 6841 TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA  
 TATGGACAGT GGGCCCCAAA  
 6901 GCTGGCCAGA CTTATTATT CCGGATCAAT CAATGCCTGG  
 AGCACCAAGG AGCCCTTTTC  
 6961 TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACC AAT GATTATTCAC  
 GGCATCAAGA CCCAGGGTGC  
 7021 CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC  
 ATCATGTATA GTCTTGATGG  
 7081 GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC  
 TTAATGGTCT TCTTTGGCAA  
 7141 TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCT  
 CCAATTATTG CTCGATACAT  
 7201 CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT  
 CGCATGGAGT TGATGGGCTG  
 7261 TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT  
 AAAGCAATAT CAGATGCACA  
 7321 GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC  
 TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG  
 7381 ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG  
 GTGAATAATC CAAAAGAGTG  
 7441 GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA  
 GTAAC TACTC AGGGAGTAAA  
 7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC  
 TCCAGCAGTC AAGATGGCCA

```

7561 TCAGTGGACT CTCTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT
      TTTCAGGGAA ATCAAGACTC
7621 CTTCACACCT GTGGTGAAC CTCTAGACCC ACCGTTACTG
      ACTCGCTACC TTCGAATTCA
7681 CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG
      GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
7741 GGACCTCTAC

```

---

\* Os ácidos nucleicos sublinhados codificam um peptídeo sinal.

[000171] Os polipeptídeos de FVIII incluem FVIII de comprimento completo, FVIII de comprimento completo menos Met no N-terminal, o FVIII maduro (menos a sequência sinal), FVIII madura com uma Met adicional na extremidade N-terminal, e/ou o FVIII com uma eliminação total ou parcial do domínio B. Em certas modalidades, as variantes do FVIII incluem deleções do domínio B, deleções parciais ou completas.

[000172] A sequência do Fator FVIII humano maduro nativo é apresentada como SEQ ID NO: 4. Uma proteína FVIII nativa tem a seguinte fórmula: A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2, em que A1, A2, e A3 são as relacionadas estruturalmente aos "domínios A", B é o "domínio B", C1 e C2 são os relacionados estruturalmente aos "domínios C", e a1, a2 e a3 são regiões espaçadoras ácidas. Referindo-se à posição amino primária da sequência de aminoácido na SEQ ID NO: 4, o domínio A1 do Fator VIII humano estende-se desde Ala1 a cerca de Arg336, a região espaçadora estende-se desde a1 de cerca de Met337 a cerca de Val374, o domínio A2 estende-se desde cerca de Ala375 a cerca de Tyr719, a região a2 espaçador estende-se desde cerca de Glu720 para cerca de Arg740, o domínio B estende-se desde cerca de Ser741 a cerca de Arg 1648, a região a3 espaçadora estende-se desde cerca de Glu1649 a cerca de Arg1689, o domínio A3 estende-se desde cerca de Ser1690 a cerca de Leu2025, o domínio C1 estende-se desde cerca de Gly2026 a cerca de Asn2072, e o domínio C2 estende-se desde cerca de Ser2073 para Tyr2332. Diferente de sítios específicos de clivagem

proteolítica, a designação dos locais dos limites entre os domínios e regiões do FVIII pode variar em diferentes referências da literatura. Os limites aqui mencionados são, portanto, designados como aproximado pelo uso do termo "cerca de".

[000173] O gene FVIII humano foi isolado e expresso em células de mamíferos (Toole, J. J., *et al.*, *Nature* 312:342-347 (1984); Gitschier, J., *et al.*, *Nature* 312:326-330 (1984); Wood, W. I., *et al.*, *Nature* 312:330-337 (1984); Vehar, G. A., *et al.*, *Nature* 312:337-342 (1984); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; e Patente US 4.757.006). A sequência de aminoácidos do FVIII foi deduzida a partir do cDNA, como mostrado na Patente US 4.965.199. Além disso, o FVIII com domínio B eliminado totalmente ou parcialmente é mostrado nas Patentes US 4.994.371 e 4.868.112. Em algumas modalidades, o FVIII humano com o domínio B é substituído com domínio B do fator V humano como mostrado na Patente US 5.004.803. A sequência de cDNA que codifica a sequência do Fator VIII humano e de aminoácidos são mostradas em SEQ ID NOs: 4 e 5, respectivamente, da publicação de pedido US 2005/0100990.

[000174] A sequência do FVIII de porcino foi publicada em Toole, J.J., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5939-5942 (1986). Além disso, a sequência de cDNA completa de porcino obtida a partir de amplificação por PCR de sequências do FVIII a partir de uma biblioteca de cDNA de baço de porco foi relatada em Healey, J.F., *et al.*, *Blood* 88: 4209-4214 (1996). Híbrido de FVIII humano/porcino possuindo substituições de todos os domínios, todas as subunidades, e sequências de aminoácidos específicas foram reveladas na Patente US 5.364.771 por Lollar e Runge, e em WO 93/20093. Mais recentemente, as sequências de nucleotídeos e sequências de aminoácidos correspondentes aos domínios A1 e A2 do Fator VIII suíno e um Fator VIII quimérico com domínios porcinos A1 e/ou A2 substituídos pelos domínios cor-

respondentes humanos foram relatados em WO 94/11503. Patente US 5.859.204, Lollar, J.S., também divulga o cDNA porcino e sequências de aminoácidos deduzidas. Patente US 6.458.563 divulga um FVIII porcino excluído de domínio B.

[000175] Patente US 5.859.204 para Lollar, J.S. relata mutantes funcionais do FVIII com antigenicidade reduzida e imunorreatividade reduzida. Patente US 6.376.463 para Lollar, J.S. também relata mutantes do FVIII tendo imunorreatividade reduzida. Publicação de pedido US 2005/0100990 para Saenko et al. reporta mutações funcionais no domínio A2 do FVIII.

[000176] Em uma modalidade, o Fator VIII (FVIII ou fração de uma proteína quimérica) pode ser, pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos do FVIII de aminoácidos 1 a 1438 da SEQ ID NO: 6 ou os aminoácidos 1 a 2332 da SEQ ID NO: 4 (sem uma sequência de sinal) ou uma sequência de aminoácidos de FVIII dos aminoácidos 1 a 19 da SEQ ID NO: 3 e 1 a 1438 de SEQ ID NO: 6 ou aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 3 e aminoácidos 1 a 2332 da SEQ ID NO: 4 (com uma sequência de sinal), em que o FVIII tem uma atividade de coagulação, por exemplo, ativa o Fator IX como um cofator para converter o Fator X ao Fator X ativado. O FVIII (ou fração FVIII de uma proteína quimérica) pode ser idêntico a uma sequência de aminoácidos do FVIII de aminoácidos 1 a 1438 da SEQ ID NO: 6 ou os aminoácidos 1 a 2332 da SEQ ID NO: 4 (sem uma sequência de sinal). O FVIII pode ainda compreender uma sequência sinal.

[000177] O "domínio B" do FVIII, como aqui utilizado, é o mesmo que o domínio B conhecido na técnica, que é definido pela identidade de sequência de aminoácido interna e sítios de clivagem proteolítica, por exemplo, resíduos Ser741-Arg1648 de FVIII humano de comprimento completo. Os outros domínios do FVIII humanos são definidos pelos



seguintes resíduos de aminoácidos: A1, resíduos Ala1-Arg372; A2, resíduos Ser373-Arg740; A3, resíduos Ser1690- Asn2019; C1, resíduos Lys2020-Asn2172; C2, resíduos Ser2173-Tyr2332. A sequência A3-C1-C2 inclui resíduos Ser1690-Tyr2332. A sequência restante, resíduos Glu1649-Arg1689, é normalmente referida como a região ácida a3. As localizações dos limites para todos os domínios, incluindo os domínios B, para FVIII porcino, de rato e canino também são conhecidas na técnica. Em uma modalidade, o domínio B do FVIII é deletado ("Fator FVIII sem o domínio B" ou "BDD FVIII"). Um exemplo de um BDD FVIII é REFACTO® (BDD FVIII recombinante), que tem a mesma sequência que a fração de Fator VIII da sequência na Tabela 5. (cadeia pesada BDD FVIII é sublinhada dupla; domínio B está em itálico; e BDD FVIII de cadeia leve está em texto simples) Uma sequência de nucleotídeos que codifica a sequência de aminoácidos apresentada na Tabela 5 (SEQ ID NO: 7) é mostrada na Tabela 6.

**TABELA 5. Sequência de aminoácido de fator VIII sem domínio B (BDD FVIII)**

**BDD FVIII (SEQ ID NO: 6)**

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRPVPSFPEFNTSVVYKKTLEVEFT  
 DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASE  
 GAHEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLV  
 KDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDR  
 DAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHT  
 FLVRNHRQASLEISPITFLTAOTLLMDLGOFLLEFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCP  
 EEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHY  
 IAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQORIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR  
 AIOHESGILGPLYGEVGDTLIIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKG  
 KHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGP  
 LLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLLPNPAGVQLED  
 PEFOASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAOTDFLSVFFSGYTFKH  
 KMYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT  
 GDYYEDSYEDI SAYLLSKNNAIEPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRL

NRAQSGSVPQFKKVVFQEFDTGDSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT  
 FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKKNFVKPNETKTYFWKVQHMAPTKDE  
 FDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLLIGPLLCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFD  
 ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQR  
 IRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAG  
 IWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDQITASGQYQGWAPK  
 LARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGKIQGARQKFSSLYISQFIIM  
 YSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPHTHSIR  
 STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQG  
 RSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLLTSMYVKEFLISSQDGH  
 QWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVL  
 GCEAQDLY

**TABELA 6.** Sequência de nucleotídeo que codifica BDD FVIII (SEQ ID NO: 7)\*

661	<u>A TGCAATAGA</u>		
	<u>GCTCTCCACC TGCTTCTTTC</u>		
721	<u>TGTGCCTTTT GCGATTCTGC</u>	<u>TTTAGTGCCA</u>	<u>CCAGAAGATA</u>
	CTACCTGGGT GCAGTGGAAC		
781	TGTCATGGGA CTATATGCAA	AGTGATCTCG	GTGAGCTGCC
	TGTGGACGCA AGATTTCTCT		
841	CTAGAGTGCC AAAATCTTTT	CCATTCAACA	CCTCAGTCGT
	GTACAAAAAG ACTCTGTTTG		
901	TAGAATTCAC GGATCACCTT	TTCAACATCG	CTAAGCCAAG
	GCCACCCTGG ATGGGTCTGC		
961	TAGGTCCTAC CATCCAGGCT	GAGGTTTATG	ATACAGTGGT
	CATTACACTT AAGAACATGG		
1021	CTTCCCATCC TGTCAGTCTT	CATGCTGTTG	GTGTATCCTA
	CTGGAAAGCT TCTGAGGGAG		
1081	CTGAATATGA TGATCAGACC	AGTCAAAGGG	AGAAAGAAGA
	TGATAAAGTC TTCCCTGGTG		
1141	GAAGCCATAC ATATGTCTGG	CAGGTCCTGA	AAGAGAATGG
	TCCAATGGCC TCTGACCCAC		
1201	TGTGCCTTAC CTAATCATAT	CTTTCTCATG	TGGACCTGGT
	AAAAGACTTG AATTCAGGCC		
1261	TCATTGGAGC CCTACTAGTA	TGTAGAGAAG	GGAGTCTGGC
	CAAGGAAAAG ACACAGACCT		
1321	TGCACAAATT TATACTACTT	TTTGCTGTAT	TTGATGAAGG
	GAAAAGTTGG CACTCAGAAA		
1381	CAAAGAACTC CTTGATGCAG	GATAGGGATG	CTGCATCTGC
	TCGGGCCTGG CCTAAAATGC		
1441	ACACAGTCAA TGGTTATGTA	AACAGGTCTC	TGCCAGGTCT
	GATTGGATGC CACAGGAAAT		
1501	CAGTCTATTG GCATGTGATT	GGAATGGGCA	CCACTCCTGA
	AGTGCACTCA ATATTCCTCG		
1561	AAGGTCACAC ATTTCTTGTG	AGGAACCATC	GCCAGGCGTC
	CTTGGAATC TCGCCAATAA		
1621	CTTTCCTTAC TGCTCAAACA	CTCTTGATGG	ACCTTGACAA
	GTTTCTACTG TTTTGTGATA		

1681 TCTCTTCCCA CCAACATGAT GGCATGGAAG CTTATGTCAA  
 AGTAGACAGC TGTCCAGAGG  
 1741 AACCCCAACT ACGAATGAAA AATAATGAAG AAGCGGAAGA  
 CTATGATGAT GATCTTACTG  
 1801 ATTCTGAAAT GGATGTGGTC AGGTTTGATG ATGACAACTC  
 TCCTTCCTTT ATCCAAATTC  
 1861 GCTCAGTTGC CAAGAAGCAT CCTAAAACCTT GGGTACATTA  
 CATTGCTGCT GAAGAGGAGG  
 1921 ACTGGGACTA TGCTCCCTTA GTCCTCGCCC CCGATGACAG  
 AAGTTATAAA AGTCAATATT  
 1981 TGAACAATGG CCCTCAGCGG ATTGGTAGGA AGTACAAAAA  
 AGTCCGATTT ATGGCATAACA  
 2041 CAGATGAAAC CTTTAAGACT CGTGAAGCTA TTCAGCATGA  
 ATCAGGAATC TTGGGACCTT  
 2101 TACTTTATGG GGAAGTTGGA GACACACTGT TGATTATATT  
 TAAGAATCAA GCAAGCAGAC  
 2161 CATATAACAT CTACCCTCAC GGAATCACTG ATGTCCGTCC  
 TTTGTATTCA AGGAGATTAC  
 2221 CAAAAGGTGT AAAACATTTG AAGGATTTTC CAATTCTGCC  
 AGGAGAAATA TTCAAATATA  
 2281 AATGGACAGT GACTGTAGAA GATGGGCCAA CTAAATCAGA  
 TCCTCGGTGC CTGACCCGCT  
 2341 ATTACTCTAG TTTCGTTAAT ATGGAGAGAG ATCTAGCTTC  
 AGGACTCATT GGCCCTCTCC  
 2401 TCATCTGCTA CAAAGAATCT GTAGATCAAA GAGGAAACCA  
 GATAATGTCA GACAAGAGGA  
 2461 ATGTCATCCT GTTTTCTGTA TTTGATGAGA ACCGAAGCTG  
 GTACCTCACA GAGAATATAC  
 2521 AACGCTTTCT CCCCAATCCA GCTGGAGTGC AGCTTGAGGA  
 TCCAGAGTTC CAAGCCTCCA  
 2581 ACATCATGCA CAGCATCAAT GGCTATGTTT TTGATAGTTT  
 GCAGTTGTCA GTTTGTTTGC  
 2641 ATGAGGTGGC ATACTGGTAC ATTCTAAGCA TTGGAGCACA  
 GACTGACTTC CTTTCTGTCT  
 2701 TCTTCTCTGG ATATACCTTC AAACACAAAA TGGTCTATGA  
 AGACACACTC ACCCTATTCC  
 2761 CATTCTCAGG AGAAACTGTC TTCATGTCGA TGGAAAACCC  
 AGGTCTATGG ATTCTGGGGT  
 2821 GCCACAACTC AGACTTTCGG AACAGAGGCA TGACCGCCTT  
 ACTGAAGGTT TCTAGTTGTG  
 2881 ACAAGAACAC TGGTGATTAT TACGAGGACA GTTATGAAGA  
 TATTTTCAGCA TACTTGCTGA  
 2941 GTAAAAACAA TGCCATTGAA CCAAGAAGCT TCTCTCAAAA  
 CCCACCAGTC TTGAAACGCC  
 3001 ATCAACGGGA AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA  
 AGAGGAAATT GACTATGATG  
 3061 ATACCATATC AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT  
 TTATGATGAG GATGAAAATC  
 3121 AGAGCCCCCG CAGCTTTCAA AAGAAAACAC GACACTATTT  
 TATTGCTGCA GTGGAGAGGC

3181 TCTGGGATTA TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG  
AAACAGGGCT CAGAGTGGCA  
3241 GTGTCCCTCA GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC  
TGATGGCTCC TTTACTCAGC  
3301 CCTTATACCG TGGAGAACTA AATGAACATT TGGGACTCCT  
GGGGCCATAT ATAAGAGCAG  
3361 AAGTTGAAGA TAATATCATG GTAACCTTCA GAAATCAGGC  
CTCTCGTCCC TATTCCTTCT  
3421 ATTCTAGCCT TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG  
AGCAGAACCT AGAAAAAAGT  
3481 TTGTCAAGCC TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT  
GCAACATCAT ATGGCACCCA  
3541 CTAAAGATGA GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC  
TGATGTTGAC CTGGAAAAAG  
3601 ATGTGCACTC AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA  
CACTAACACA CTGAACCCTG  
3661 CTCATGGGAG ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT  
TTTCACCATC TTTGATGAGA  
3721 CCAAAGCTG GTAACCTTACT GAAAATATGG AAAGAACTG  
CAGGGCTCCC TGCAATATCC  
3781 AGATGGAAGA TCCCACCTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA  
TGCAATCAAT GGCTACATAA  
3841 TGGATACACT ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG  
GATTCGATGG TATCTGCTCA  
3901 GCATGGGCAG CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCAG  
TGGACATGTG TTCCTGTGAC  
3961 GAAAAAAGA GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA  
TCCAGGTGTT TTTGAGACAG  
4021 TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GCGGGGTGGA  
ATGCCTTATT GCGGAGCATC  
4081 TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA  
TAAGTGTCAG ACTCCCCTGG  
4141 GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC  
TTCAGGACAA TATGGACAGT  
4201 GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTTATTATT CCGGATCAAT  
CAATGCCTGG AGCACCAAGG  
4261 AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT  
GATTATTCAC GGCATCAAGA  
4321 CCCAGGGTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC  
TCAGTTTATC ATCATGTATA  
4381 GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC  
CACTGGAACC TTAATGGTCT  
4441 TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT  
TTTTAACCCCT CCAATTATTG  
4501 CTCGATACAT CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG  
CAGCACTCTT CGCATGGAGT  
4561 TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG  
AATGGAGAGT AAAGCAATAT  
4621 CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT  
GTTTGCCACC TGGTCTCCTT

```

4681  CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG
      GAGACCTCAG GTGAATAATC
4741  CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA
      AGTCACAGGA GTAACCTACTC
4801  AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA
      GTTCCTCATC TCCAGCAGTC
4861  AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA
      AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA
4921  ATCAAGACTC CTTACACCT GTGGTGAACCT CTCTAGACCC
      ACCGTTACTG ACTCGCTACC
4981  TTCGAATTCA CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT
      GAGGATGGAG GTTCTGGGCT
5041  GCGAGGCACA GGACCTCTAC

```

---

\*Os ácidos nucleicos sublinhados codificam um peptídeo sinal.

[000178] Um "FVIII sem domínio B" pode ter as deleções totais ou parciais divulgadas nas Patentes US 6.316.226, 6.346.513, 7.041.635, 5.789.203, 6.060.447, 5.595.886, 6.228.620, 5.972.885, 6.048.720, 5.543.502, 5.610.278, 5.171.844, 5.112.950, 4.868.112, e 6.458.563. Em algumas modalidades, uma sequência do FVIII sem domínio B da presente invenção compreende qualquer uma das deleções descritas na col. 4, linha 4 para col. 5, linha 28 e Exemplos 1-5 de Patente US 6.316.226 (também em US 6.346.513). Em outra modalidade, um FVIII sem domínio B é S743/Q1638 do FVIII sem domínio B (SQ BDD FVIII) (por exemplo, o Fator VIII tendo uma deleção desde o aminoácido 744 até ao aminoácido 1637, por exemplo, o Fator VIII tendo aminoácidos 1 a 743 e aminoácidos 1638 a 2332 de SEQ ID NO: 4, ou seja, SEQ ID NO: 6). Em algumas modalidades, um FVIII sem domínio B da presente invenção tem uma deleção divulgada na col. 2, linhas 26-51 e exemplos 5-8 da Patente US 5.789.203 (também US 6.060.447, US 5.595.886, e US 6.228.620). Em algumas modalidades, um FVIII sem domínio B tem uma deleção descrita na col. 1, linhas 25 a col. 2, linha 40 da Patente US 5.972.885; col. 6, linhas 1-22 e exemplo 1 da Patente US 6.048.720; col. 2, linhas 17-46 da Patente US 5.543.502; col. 4, linha 22 a col. 5, linha 36 da patente US 5.171.844; col. 2, linhas 55-

68, Figura 2, e exemplo 1 da Patente US 5.112.950; col. 2, a linha 2 para col. 19, linha 21 e tabela 2 da patente US 4.868.112; col. 2, linha 1 a col. 3, linha 19, col. 3, linha 40 e col.4, linha 67, col. 7, linha 43 para col. 8, linha 26, e col. 11, linha 5 a col. 13, linha 39 da patente US 7.041.635; ou col. 4, linhas 25-53, da Patente US 6.458.563. Em algumas modalidades, FVIII sem domínio B possui uma deleção da maior parte do domínio B, mas ainda contém sequências amino-terminal do domínio B que são essenciais para o processamento proteolítico *in vivo* do produto de tradução primário em duas cadeias de polipeptídeos, divulgado no documento WO 91/09122. Em algumas modalidades, um FVIII sem domínio B é construído com uma deleção de aminoácidos 747-1638, isto é praticamente uma deleção completa do domínio B. Hoebein R.C., et al., J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990). Um Fator VIII sem domínio B também pode conter uma deleção de aminoácidos 771-1666 ou os aminoácidos 868-1562 do FVIII. Meulien P., et al. Protein Eng. 2 (4): 301-6 (1988). Deleções adicionais do domínio B que fazem parte da invenção incluem: deleção dos aminoácidos 982 a 1562 ou 760 a 1639 (Toole et al., Proc Natl Acad Sci USA (1986) 83, 5939-5942)), 797 a 1562 Eaton, et al., Biochemistry (1986) 25: 8343-8347)), 741 a 1646 (Kaufman (publicação do pedido PCT N.º WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, et al., DNA (1987) 6: 553-564)), 741 a 1648 (Pasek (pedido PCT N.º88/00831)), ou de 816 a 1598 ou 741 a 1648 (Lagner (Behring Inst Mitt (1988) No 82: 16-25, EP 295597)). Em outras modalidades, o BDD FVIII inclui um polipeptídeo FVIII contendo fragmentos do domínio B que retêm um ou mais locais de glicosilação N-ligados, por exemplo, os resíduos 757, 784, 828, 900, 963, ou opcionalmente 943, o que corresponde à sequência de aminoácidos da sequência do FVIII de comprimento completo. Exemplos de fragmentos de domínio B incluem 226 aminoácidos ou 163 aminoácidos do domínio B como foi descrito em Miao, H.Z., et al., Blo-

od 103 (a): 3412-3419 (2004), Kasuda, A, et al., J. Thromb. Haemost. 6: 1352-1359 (2008), e Pipe, S.W., et al., J. Thromb. Haemost. 9: 2235-2242 (2011) (ou seja, os primeiros 226 aminoácidos ou 163 aminoácidos do domínio B são retidos). Em ainda outras modalidades, o BDD FVIII compreende ainda um ponto de mutação no resíduo 309 (a partir de Phe para Ser) para melhorar a expressão da proteína de BDD FVIII. Ver Miao, H.Z., et al., Blood 103 (a): 3412-3419 (2004). Em ainda outras modalidades, o BDD FVIII inclui um polipeptídeo FVIII contendo uma fração do domínio B, mas não contendo um ou mais sítios de clivagem de furina (por exemplo, Arg1313 e Arg 1648). Ver Pipe, S.W., et al., J. Thromb. Haemost. 9: 2235-2242 (2011). Cada uma das deleções anteriores pode ser feita em qualquer sequência do FVIII.

[000179] Em algumas modalidades, o Fator VIII tem um domínio B parcial. Em algumas modalidades, a proteína FVIII com um domínio B parcial é FVIII 198 (SEQ ID NO: 89). FVIII198 é um domínio B parcial contendo cadeia única de FVIII Fc molécula-226N6. 226 representa o aminoácido 226 N-terminal do domínio B do FVIII, e N6 representa seis locais de N-glicosilação no domínio B.

[000180] Em uma modalidade, o FVIII é clivado à direita após arginina no aminoácido 1648 (em Fator VIII de comprimento completo ou SEQ ID NO: 4), aminoácido 754 (no fator FVIII sem domínio B S743/Q1638 ou SEQ ID NO: 6), ou o correspondente resíduo de arginina (ou variantes), resultando assim em uma cadeia pesada e uma cadeia leve. Em outra modalidade, o FVIII compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, que estão ligados ou associados por uma ligação não covalente mediada por íon metálico.

[000181] Em outras modalidades, o FVIII é um FVIII de cadeia única que não foi clivado logo após Arginina no aminoácido 1648 (em FVIII de comprimento completo ou SEQ ID NO: 4), aminoácido 754 (no FVIII sem domínio B S743 /Q1638 ou SEQ ID NO: 6), ou o resíduo de argi-

nina correspondentes (em outras variantes). Um FVIII de cadeia única pode compreender uma ou mais substituições de aminoácidos. Em uma modalidade, a substituição de aminoácido é um resíduo correspondente ao resíduo 1648, resíduo 1645, ou ambos polipeptídeo de Fator VIII maduro de comprimento total (SEQ ID NO: 4) ou o resíduo 754, resíduo 751, ou ambos de SQ BDD Fator VIII (SEQ ID NO: 6). A substituição de aminoácidos pode ser qualquer outro além de arginina, por exemplo, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, glicina, prolina, selenocisteína, serina, tirosina, histidina, ornitina, pirrolisina, ou taurina.

[000182] FVIII pode ainda ser clivado pela trombina e, em seguida, ativado como FVIIIa, que serve como um cofator para o Fator IX ativado (FIXa). E o FIX ativado juntamente com FVIII ativado forma um complexo Xase complexo e converte Fator X para Fator X ativado (FXa). Para ativação, o FVIII é clivado pela trombina após três resíduos de arginina, nos aminoácidos 372, 740, e 1689 (que corresponde aos aminoácidos 372, 740, e 795 na sequência de FVIII sem domínio B), a clivagem gerando FVIIIa tendo cadeias 50 kDa A1, 43kDa A2 e 73kDa A3-C1-C2. Em uma modalidade, a proteína FVIII útil para a presente invenção é FVIII não ativo. Em outra modalidade, a proteína FVIII é um FVIII ativado.

[000183] A proteína FVIII tendo polipeptídeo ligado ou associado com o fragmento VWF pode compreender uma sequência de pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 4 ou 6, em que a sequência tem a atividade de coagulação do FVIII, por exemplo, a ativação do Fator IX, como um cofator para converter Fator X em fator X ativado (FXa).

[000184] "Híbrido" ou polipeptídeos e proteínas "quiméricos", como aqui utilizado, inclui uma combinação de uma primeira cadeia de poli-



peptídeos, por exemplo, o fragmento de VWF, opcionalmente fundido com uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma, com uma segunda cadeia de polipeptídeo, por exemplo, uma proteína FVIII ligada a uma sequência XTEN, opcionalmente fundida a uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma, formando assim um heterodímero. Em uma modalidade, o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo em um híbrido estão associados um com o outro através de interações proteína-proteína, como a carga-carga ou interações hidrofóbicas. Em outra modalidade, o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo em um híbrido são associados uns com os outros através de ligação dissulfeto ou outras ligações covalentes. Os híbridos são descritos, por exemplo, no documento US 2004/101740 e US 2006/074199. O segundo polipeptídeo pode ser uma cópia idêntica do primeiro polipeptídeo ou um polipeptídeo não idêntico. Em uma modalidade, o primeiro polipeptídeo é uma proteína de fusão proteína FVIII(X)-Fc, e o segundo polipeptídeo é um polipeptídeo que compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em uma região Fc, em que o primeiro polipeptídeo e segundo polipeptídeo estão associados com cada outro. Em outra modalidade, o primeiro polipeptídeo compreende uma proteína de fusão fragmento VWF-XTEN-Fc, e o segundo polipeptídeo compreende a proteína de fusão FVIII-Fc, fazendo com que o híbrido de um heterodímero. Em outras modalidades, o primeiro polipeptídeo compreende uma proteína de fusão fragmento VWF-Fc, e o segundo polipeptídeo compreendendo proteína de fusão FVIII(X)-Fc, gerando o híbrido de um heterodímero. Em ainda outras modalidades, o primeiro polipeptídeo compreende uma proteína de fusão de fragmento VWF-XTEN-Fc, e o segundo polipeptídeo compreendendo a proteína de fusão FVIII(X)-Fc. O primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo podem ser associados, através de uma ligação covalente, por exemplo, uma ligação dissulfeto, entre a primeira região

Fc e a segunda região Fc. O primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo podem ainda ser associados uns aos outros por meio da ligação entre o fragmento de VWF e a proteína FVIII.

[000185] Uma proteína FVIII útil na presente invenção pode incluir FVIII possuindo uma ou mais sequências adicionais de XTEN, que não afetam a atividade do FVIII de coagulação. Tais sequências XTEN podem ser fundidas com a extremidade C-terminal ou N-terminal da proteína FVIII ou inseridas entre um ou mais dos dois resíduos de aminoácidos na proteína FVIII, em que as inserções não afetam a atividade de coagulação de FVIII ou função de FVIII. Em uma modalidade, as inserções melhoram as propriedades farmacocinéticas da proteína FVIII (por exemplo, meia-vida). Em outra modalidade, as inserções podem ser múltiplas inserções, por exemplo, mais de duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, ou dez inserções. Exemplos dos sítios de inserção incluem, entre outros, os sítios listados nas Tabelas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou quaisquer combinações.

[000186] A proteína FVIII ligada a uma ou mais sequências XTEN pode ser representada como o FVIII(X), FVIII(X1), FVIII<sub>(a→b)</sub>-X-FVIII<sub>(c→d)</sub>, em que FVIII<sub>(a→b)</sub> compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em uma primeira fração de uma proteína FVIII a partir de resíduo "a" de aminoácido a um resíduo de aminoácido "b"; X ou X1, compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em uma ou mais sequências de XTEN, FVIII<sub>(c→d)</sub> compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em uma segunda fração de uma proteína FVIII a partir de resíduo de aminoácido "c" ao resíduo de aminoácido "d";

a é o resíduo de aminoácido N-terminal da primeira fração da proteína FVIII,

b é o resíduo de aminoácido C-terminal da primeira fração da proteína FVIII, mas também é o N-terminal de resíduos de aminoácidos dos dois aminoácidos de um sítio de inserção em que a sequên-

cia XTEN é inserida,

c é o resíduo de aminoácido N-terminal da segunda fração da proteína FVIII, mas é também o resíduo de aminoácido C-terminal dos dois aminoácidos de um sítio de inserção em que se insere a sequência XTEN, e

d é o resíduo de aminoácido C-terminal da proteína FVIII, e [000187] em que a primeira fração da proteína FVIII e a segunda fração da proteína FVIII não são idênticas uma a outra e têm um comprimento suficiente de tal modo que o conjunto de proteína FVIII tem uma atividade de coagulação do FVIII.

[000188] Em uma modalidade, a primeira fração da proteína FVIII e a segunda fração da proteína FVIII são fragmentos de SEQ ID NO: 4 [sequência de FVIII maduro de comprimento completo] ou SEQ ID NO: 6 [FVIII sem domínio B], por exemplo, fração N-terminal e fração C-terminal, respectivamente. Em certas modalidades, a primeira fração da proteína FVIII compreende o domínio A1 e o domínio A2 do Fator VIII de proteína. A segunda fração da proteína FVIII compreende o domínio A3, domínio C1 e, opcionalmente, o domínio C2. Em ainda outras modalidades, a primeira fração da proteína FVIII compreende o domínio A1 e domínio A2, e a segunda fração da proteína FVIII compreende uma fração do domínio B, o domínio A3, domínio C1 e, opcionalmente, o domínio C2. Em ainda outras modalidades, a primeira fração da proteína FVIII compreende o domínio A1, domínio A2, e uma fração do domínio B da proteína FVIII, e a segunda fração da proteína FVIII compreende o domínio A3, domínio C1, e opcionalmente o domínio C2. Em ainda outras modalidades, a primeira fração da proteína FVIII compreende o domínio A1, domínio A2, e uma primeira fração do domínio B da proteína FVIII. A segunda fração da proteína FVIII compreende uma segunda fração do domínio B, o domínio A3, domínio C1, e, opcionalmente, o domínio C2. Em algumas modalidades, os

dois aminoácidos ("b" e "c") podem ser qualquer um ou mais dos sítios de inserção de resíduos de aminoácidos apresentados nas Tabelas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 15. Por exemplo, "b" pode ser o resíduo de aminoácido imediatamente a montante do local em que uma ou mais sequências de XTEN são inseridas ou ligadas, e "c" pode ser o resíduo de aminoácido imediatamente a jusante do local em que a uma ou mais sequências XTEN são inseridas ou ligadas. Em algumas modalidades, "a" é a primeira sequência de aminoácidos madura de uma proteína FVIII, e "d" é a última sequência de aminoácidos de uma proteína FVIII. Por exemplo, FVIII<sub>(a→b)</sub> pode ser uma sequência de aminoácidos pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica aos aminoácidos 1 a 745 da SEQ ID NO: 6 [sequência de aminoácidos de FVIII sem domínio B] ou SEQ ID NO: 4 [FVIII de comprimento completo] FVIII<sub>(c→d)</sub> pode ser os aminoácidos 746 a 1438 da SEQ ID NO: 6 ou os aminoácidos 1641 a 2332 de SEQ ID NO: 4, respectivamente.

[000189] Em alguns aspectos, o sítio de inserção na proteína FVIII está localizado em um ou mais domínios da proteína FVIII, que é a extremidade N-terminal, o domínio A1, o domínio A2, domínio A3, domínio B, o domínio C1, o domínio C2, o C-terminal, ou dois ou mais dos mesmos ou diferentes entre os dois domínios da proteína FVIII, que são domínio A1 e região ácida a1, e região ácida a1 e domínio A2, o domínio A2 e a região ácida a2, a região ácida a2 e domínio B, o domínio B e domínio A3, e o domínio A3 e domínio C1, domínio C1 e domínio C2, ou quaisquer combinações dos mesmos. Por exemplo, os sítios de inserção no qual a sequência XTEN pode ser inserida são selecionados do grupo que consiste em N-terminal e domínio A1, o N-terminal e domínio A2, o N-terminal e o domínio A3, o N-terminal e o domínio B, o N-terminal e domínio C1, o N-terminal e o domínio C2, o N-terminal e o C-terminal, os domínios A1 e A2, os domínios A1 e A3,

os domínios A1 e B, os domínios A1 e C1, os domínios A1 e C2, o domínio A1 e o C-terminal, os domínios A2 e A3, os domínios A2 e B, os domínios A2 e C1, os domínios A2 e C2, o domínio A2 e o C-terminal, os domínios A3 e B, domínios A3 e C 1, os domínios A3 e C2, o domínio A3 e o C-terminal, o domínio B e C1, os domínios B e C2, o domínio B e o C-terminal, domínios C1 e C2, o C1 e o C-terminal, o domínio C2, e o C-terminal, e combinações de dois ou mais dos mesmos. Exemplos não limitantes dos sítios de inserção estão listados nas Tabelas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15.

[000190] A proteína FVIII, em que a sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos (por exemplo, um ou mais sítios de inserção XTEN) na proteína FVIII ou ligada em C-terminal ou N-terminal, retém a atividade de FVIII após a ligação a ou inserção pela sequência XTEN. A sequência XTEN pode ser inserida na proteína FVIII, uma vez ou mais do que uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes ou seis vezes de modo a que as inserções não afetam a atividade do FVIII(isto é a proteína FVIII ainda mantém a propriedade de coagulação).

[000191] A proteína FVIII útil na presente invenção pode ser ligada a um ou mais polipeptídeos XTEN em N-terminal ou C-terminal da proteína FVIII por um ligante opcional ou inserido imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos (por exemplo, um ou mais sítios de inserção XTEN) na proteína FVIII por um ou mais ligantes opcionais. Em uma modalidade, os dois resíduos de aminoácidos em que sequência XTEN está inserida ou o resíduo de aminoácido em que a sequência XTEN está ligada correspondem aos dois ou um resíduos de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 [FVIII maduro de comprimento completo] selecionado a partir do grupo que consiste nos resíduos na Tabela 7, Tabela 8, Tabela 9 e na Tabela 10 e quaisquer combinações dos mesmos.

[000192] Em outras modalidades, pelo menos uma sequência XTEN é inserida em qualquer um ou mais sítios de inserção XTEN aqui descritos ou quaisquer combinações dos mesmos. Em um aspecto, pelo menos uma sequência XTEN é inserida em um ou mais sítios de inserção XTEN divulgados em um ou mais aminoácidos apresentados na Tabela 7.

**TABELA 7:** Sítios de inserção de XTEN exemplares

N.º	Ponto de inserção XTEN *	Resíduo de inserção	Sequência a jusante FVIII BDD	Domínio FVIII
1	0	(N-terminal)	ATR	A1
2	3	R	RYY	A1
3	17	M	QSD	A1
4	18	Q	SDL	A1
5	22	G	ELP	A1
6	24	L	PVD	A1
7	26	V	DAR	A1
8	28	A	RFP	A1
9	32	P	RVP	A1
10	38	F	PFN	A1
11	40	F	NTS	A1
12	41	N	TSV	A1
13	60	N	IAK	A1
14	61	I	AKP	A1
15	65	R	PPW	A1
16	81	Y	DTV	A1
17	111	G	AEY	A1
18	116	D	QTS	A1
19	119	S	QRE	A1
20	120	Q	REK	A1
21	128	V	FPG	A1
22	129	F	PGG	A1
23	130	P	GGG	A1
24	182	G	SLA	A1
25	185	A	KEK	A1

N.º	Ponto de inserção XTEN *	Resíduo de inserção	Sequência a jusante FVIII BDD	Domínio FVIII
26	188	K	TQT	A1
27	205	G	KSW	A1
28	210	S	ETK	A1
29	211	E	TKN	A1
30	216	L	MQD	A1
31	220	R	DAA	A1
32	222	A	ASA	A1
33	223	A	SAR	A1
34	224	S	ARA	A1
35	230	K	MHT	A1
36	243	P	GLI	A1
37	244	G	LIG	A1
38	250	R	KSV	A1
39	318	D	GME	A1
40	333	P	QLR	A1
42	334	Q	LRM	A1
43	336	R	MKN	a1
44	339	N	NEE	a1
45	345	D	YDD	a1
46	357	V	VRF	a1
47	367	S	FIQ	a1
48	370	S	RPY	a1
49	375	A	KKH	A2
50	376	K	KHP	A2
51	378	H	PKT	A2
52	399	V	LAP	A2
53	403	D	DRS	A2
54	405	R	SYK	A2
55	409	S	QYL	A2
56	416	P	QRI	A2
57	434	E	TFK	A2
58	438	T	REA	A2
59	441	A	IQH	A2

N.º	Ponto de inserção XTEN *	Resíduo de inserção	Sequência a jusante FVIII BDD	Domínio FVIII
60	442	I	QHE	A2
61	463	I	IFK	A2
62	487	Y	SRR	A2
63	490	R	LPK	A2
64	492	P	KGV	A2
65	493	K	GVK	A2
66	494	G	VKH	A2
67	500	D	FPI	A2
68	506	G	EIF	A2
69	518	E	DGP	A2
70	556	K	ESV	A2
71	565	Q	IMS	A2
72	566	I	MSD	A2
73	598	P	AGV	A2
74	599	A	GVQ	A2
75	603	L	EDP	A2
76	616	S	ING	A2
77	686	G	LWI	A2
78	713	K	NTG	A2
79	719	Y	EDS	A2
80	730	L	LSK	A2
81	733	K	NNA	A2
82	745	N	PPV**	B
83	1640	P	PVL	B
84	1652	R	TTL	B
85	1656	Q	SDQ	A3
86	1685	N	QSP	A3
87	1711	M	SSS	A3
88	1713	S	SPH	A3
89	1720	N	RAQ	A3
90	1724	S	GSV	A3
91	1725	G	SVP	A3
92	1726	S	VPQ	A3



N.º	Ponto de inserção XTEN *	Resíduo de inserção	Sequência a jusante FVIII BDD	Domínio FVIII
93	1741	G	SFT	A3
94	1744	T	QPL	A3
95	1749	R	GEL	A3
96	1773	V	TFR	A3
97	1792	Y	EED	A3
98	1793	E	EDQ	A3
99	1796	Q	RQG	A3
100	1798	Q	GAE	A3
101	1799	G	AEP	A3
102	1802	P	RKN	A3
103	1803	R	KNF	A3
104	1807	V	KPN	A3
105	1808	K	PNE	A3
106	1827	K	DEF	A3
107	1844	E	KDV	A3
108	1861	N	TLN	A3
109	1863	L	NPA	A3
110	1896	E	RNC	A3
111	1900	R	APC	A3
112	1904	N	IQM	A3
113	1905	I	QME	A3
114	1910	P	TFK	A3
115	1920	A	ING	A3
116	1937	D	QRI	A3
117	1981	G	VFE	A3
118	2019	N	KCQ	A3
119	2020	K	CQT	C1
120	2044	G	QWA	C1
121	2068	F	SWI	C1
122	2073	V	DLL	C1
123	2090	R	QKF	C1
124	2092	K	FSS	C1
125	2093	F	SSL	C1

N.º	Ponto de inserção XTEN *	Resíduo de inserção	Sequência a jusante FVIII BDD	Domínio FVIII
126	2111	K	WQT	C1
127	2115	Y	RGN	C1
128	2120	T	GTL	C1
129	2125	V	FFG	C1
130	2171	L	NSC	C1
131	2173	S	CSM	C2
132	2188	A	QIT	C2
133	2223	V	NNP	C2
134	2224	N	NPK	C2
135	2227	K	EWL	C2
136	2268	G	HQW	C2
137	2277	N	GKV	C2
138	2278	G	KVK	C2
139	2290	F	TPV	C2
140	2332	Y	C terminus of FVIII	CT

\* Indica um ponto de inserção para XTEN com base no número de aminoácidos de FVIII maduro de comprimento completo humano, em que a inserção pode ser do lado da N- ou C-terminal do aminoácido indicado.

[000193] Em algumas modalidades, uma ou mais sequências de XTEN são inseridas dentro de cerca de seis aminoácidos para cima ou para baixo a partir de aminoácidos 32, 220, 224, 336, 339, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905, ou 1910, correspondendo a SEQ ID NO: 4 ou quaisquer combinações dos mesmos.

**Tabela 8.** Faixas de inserção de XTEN exemplares

N.º	Ponto de inserção XTEN	Resíduo de inserção	Sequência a jusante FVIII BDD	Domínio FVIII	Distância do resíduo de inserção*
9	32	P	RVP	A1	-3, +6
31	220	R	DAA	A1	-
34	224	S	ARA	A1	+5

N.º	Ponto de inserção XTEN	Resíduo de inserção	Sequência a jusante FVIII BDD	Domínio FVIII	Distância do resíduo de inserção*
43	336	R	MKN	a1	-1, +6
44	339	N	NEE	a1	-4, +5
52	399	V	LAP	A2	-6, +3
56	416	P	QRI	A2	+6
75	603	L	EDP	A2	_6, +6
85	1656	Q	SDQ	B	-3, +6
87	1711	M	SSS	A3	-6, +1
91	1725	G	SVP	A3	+6
113	1905	I	QME	A3	+6
114	1910	P	TFK	A3	-5, +6

\* Distância de resíduo de inserção refere-se ao número relativo de aminoácidos afastados a partir do N-terminal (números negativos) ou C-terminal (números positivos) do resíduo de inserção designado (resíduo "0"), onde uma inserção pode ser feita. A designação "-x" refere-se a um sítio de inserção que consiste nos aminoácidos x afastados do lado N-terminal do resíduo de inserção designado. Do mesmo modo, a designação "+ x" refere-se a um sítio de inserção que é x aminoácidos de distância no lado do C-terminal do resíduo de inserção designado.

Por exemplo, "-1,+2" indica que a inserção é feita na extremidade N-terminal ou C-terminal de resíduos de aminoácidos designados, -1, 0, +1 ou +2.

[000194] Em outras modalidades, uma ou mais sequências XTEN são inseridas imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos correspondentes para o FVIII humano maduro de comprimento completo selecionado a partir do grupo que consiste em um ou mais sítios de inserção na Tabela 9.

**Tabela 9.** Sítios ou faixas de inserção de XTEN exemplares

<b>N.º</b>	<b>Faixa de ponto de inserção XTEN*</b>	<b>Primeiro resíduo de inserção</b>	<b>Domínio FVIII</b>
3	18-32	Q	A1
8	40	F	A1
18	211-224	E	A1
27	336-403	R	A1, A2
43	599	A	A2
47	745-1640	N	B
50	1656-1728	Q	B, a3, A3
57	1796-1804	R	A3
65	1900-1912	R	A3
81	2171-2332	L	C1, C2

\* Indica faixa de sítios de inserção numerados em relação ao número de aminoácidos do Fator VIII humano maduro

[000195] Ainda em outras modalidades, uma ou mais XTENs são inseridas no domínio B do FVIII. Em um exemplo, uma XTEN é inserida entre os aminoácidos 740 e 1640 correspondem à SEQ ID NO: 4, em que a sequência do FVIII entre os aminoácidos 740 e 1640 não está opcionalmente presente. Em outro exemplo, uma XTEN é inserida entre os aminoácidos 741 e 1690 correspondem à SEQ ID NO: 4, em que a sequência do FVIII entre os aminoácidos 740 e 1690 não está opcionalmente presente. Em outros exemplos, uma XTEN é inserida entre os aminoácidos 741 e 1648 correspondente à SEQ ID NO: 4, em que a sequência do FVIII entre os aminoácidos 741 e 1648 não está opcionalmente presente. Em ainda outros exemplos, uma XTEN é inserida entre os aminoácidos 743 e 1638 correspondente à SEQ ID NO: 4, em que a sequência do FVIII entre os aminoácidos 743 e 1638 não está opcionalmente presente. Em ainda outros exemplos, uma XTEN é inserida entre os aminoácidos 745 e 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4, em que a sequência do FVIII entre os aminoácidos 745 e 1656 não está opcionalmente presente. Em alguns exemplos, uma XTEN é

inserida entre os aminoácidos 745 e 1657 correspondente à SEQ ID NO: 4, em que a sequência do FVIII entre os aminoácidos 745 e 1657 não está opcionalmente presente. Em certos exemplos, uma XTEN é inserida entre os aminoácidos 745 e 1667 correspondente à SEQ ID NO: 4, em que a sequência do FVIII entre os aminoácidos 745 e 1667 não está opcionalmente presente. Em ainda outros exemplos, uma XTEN é inserida entre os aminoácidos 745 e 1686 correspondente à SEQ ID NO: 4, em que a sequência de FVIII entre os aminoácidos 745 e 1686 não está opcionalmente presente. Em outros exemplos, uma XTEN é inserida entre os aminoácidos 747 e 1642 correspondente à SEQ ID NO: 4, em que a sequência do FVIII entre os aminoácidos 747 e 1642 não está opcionalmente presente. Em ainda outros exemplos, uma XTEN é inserida entre os aminoácidos 751 e 1667 correspondente à SEQ ID NO: 4, em que a sequência do FVIII entre os aminoácidos 751 e 1667 não está opcionalmente presente.

[000196] Em algumas modalidades, uma ou mais XTENs são inseridas em um ou mais aminoácidos imediatamente a jusante de um aminoácido de um sítio de inserção selecionado a partir do grupo que consiste nos resíduos de aminoácido na Tabela 10.

**Tabela 10:** FVIII sítios de inserção de XTEN e designações de constructo

Número do constructo	domínio	Resíduo a montante N.º*	Resíduo a jusante N.º*	Sequência a montante	Sequência a jusante
F8X-1	A1	3	4	ATR	RYY
F8X-2	A1	18	19	YMQ	SDL
F8X-3	A1	22	23	DLG	ELP
F8X-4	A1	26	27	LPV	DAR
F8X-5	A1	40	41	FPF	NTS
F8X-6	A1	60	61	LFN	IAK
F8X-7	A1	116	117	YDD	QTS
F8X-8	A1	130	131	VFP	GGG
F8X-9	A1	188	189	KEK	TQT

Número do constructo	domínio	Resíduo a montante N.º*	Resíduo a jusante N.º*	Sequência a montante	Sequência a jusante
F8X-10	A1	216	217	NSL	MQD
F8X-11	A1	230	231	WPK	MHT
F8X-12	A1	333	334	EEP	QLR
F8X-13	A2	375	376	SVA	KKH
F8X-14	A2	403	404	APD	DRS
F8X-15	A2	442	443	EAI	QHE
F8X-16	A2	490	491	RRL	PKG
F8X-17	A2	518	519	TVE	DGP
F8X-18	A2	599	600	NPA	GVQ
F8X-19	A2	713	714	CDK	NTG
F8X-20	BD	745	746	SQN	PPV
F8X-21	BD	745	746	SQN	PPV
F8X-22	BD**	745	746	SQN	PPV
F8X-23	A3	1720	1721	APT	KDE
F8X-24	A3	1796	1797	EDQ	RQG
F8X-25	A3	1802	1803	AEP	RKN
F8X-26	A3	1827	1828	PTK	DEF
F8X-27	A3	1861	1862	HTN	TLN
F8X-28	A3	1896	1897	NME	RNC
F8X-29	A3	1900	1901	NCR	APC
F8X-30	A3	1904	1905	PCN	IQM
F8X-31	A3	1937	1938	AQD	QRI
F8X-32	C1	2019	2020	YSN	KCQ
F8X-33	C1	2068	2069	EPF	SWI
F8X-34	C1	2111	2112	GKK	WQT
F8X-35	C1	2120	2121	NST	GTL
F8X-36	C2	2171	2172	CDL	NSC
F8X-37	C2	2188	2189	SDA	QIT
F8X-38	C2	2227	2228	NPK	EWL
F8X-39	C2	2277	2278	FQN	GKV
F8X-40	CT	2332	NA	DLY	NA
F8X-41	CT	2332	NA	DLY	NA
F8X-42	A1	3	4	ATR	ATR

Número do constructo	domínio	Resíduo a montante N.º*	Resíduo a jusante N.º*	Sequência a montante	Sequência a jusante
pSD0001	A2	403	404		
pSD0002	A2	599	600		
pSD0021	N-term.	0	1		
pSD0022	A1	32	33		
pSD0023	A1	65	66		
pSD0024	A1	81	82		
pSD0025	A1	119	120		
pSD0026	A1	211	212		
pSD0027	A1	220	221		
pSD0028	A1	224	225		
pSD0029	A1	336	337		
pSD0030	A1	339	340		
pSD0031	A2	378	379		
pSD0032	A2	399	400		
pSD0033	A2	409	410		
pSD0034	A2	416	417		
pSD0035	A2	487	488		
pSD0036	A2	494	495		
pSD0037	A2	500	501		
pSD0038	A2	603	604		
pSD0039	A3	1656	1657		
pSD0040	A3	1711	1712		
pSD0041	A3	1725	1726		
pSD0042	A3	1749	1750		
pSD0043	A3	1905	1906		
pSD0044	A3	1910	1911		
pDS0062	A3	1900	1901		

\* Indica o número de aminoácidos da proteína madura FVIII

[000197] Em uma modalidade, o um ou mais sítios de inserção de XTEN estão localizados dentro de uma ou mais estrutura em alça flexível exposta na superfície da proteína FVIII (por exemplo, uma alça permissiva). Por exemplo, pelo menos uma sequência XTEN pode ser

inserida em cada FVIII domínio "A" que compreende pelo menos duas "alças permissivas" em que pelo menos um polipeptídeo XTEN pode ser inserido sem eliminar a atividade pró-coagulante da proteína recombinante, ou a capacidade de a proteína recombinantes ser expressa *in vivo* ou *in vitro* em uma célula hospedeira. As alças permissivas são regiões que permitem a inserção de pelo menos uma sequência de XTEN com, entre outros atributos, superfície elevada, ou a exposição a solventes e uma elevada flexibilidade conformacional. O domínio A1 compreende uma região de alça permissiva-1 (A1-1) e uma região de alça permissiva-2 (A1-2), o domínio A2 compreende uma região alça permissiva-1 (A2-1) e uma região de alça permissiva-2 (A2-2), o domínio A3 compreende uma alça permissiva- 1 (A3-1) e uma região alça permissiva -2 (A3 -2).

[000198] Em um aspecto, uma primeira alça permissiva no domínio A1 do FVIII (A1-1) situa-se entre a cadeia beta 1 e cadeia beta 2, e uma segunda alça permissiva no domínio A2 do FVIII (A1-2) situa-se entre cadeia beta 11 e a cadeia beta 12. Uma primeira alça permissiva no domínio A2 do FVIII (A2-1) está localizada entre a cadeia beta 22 e a cadeia beta 23, e uma segunda alça permissiva no domínio A2 do FVIII (A2-2) está localizada entre a cadeia beta 32 e a cadeia beta 33. Uma primeira alça permissiva no domínio A3 do FVIII (A3-1) está localizada entre a cadeia beta 38 e a cadeia beta 39, e uma segunda alça permissiva no FVIII A3 (A3 -2) está localizada entre a cadeia beta 45 e a cadeia beta 46. Em certos aspectos, a estrutura de alça flexível exposta na superfície, compreendendo A1-1 corresponde a uma região em FVIII humano nativo maduro de cerca do aminoácido 15 até cerca do aminoácido 45 de SEQ IDNO: 4, por exemplo, de cerca do aminoácido 18 até cerca do aminoácido 41 de SEQ ID NO: 4. Em outros aspectos, a estrutura de alça flexível exposta na superfície, compreendendo A1-2 corresponde a uma região em FVIII humano nativo madu-



ro de cerca do aminoácido 201 a cerca do aminoácido 232 da SEQ ID NO: 4, por exemplo, de cerca do aminoácido 218 a cerca do aminoácido 229 de SEQ ID NO: 4. Em ainda outros aspectos, a estrutura de alça flexível exposta na superfície, compreendendo A2-1 corresponde a uma região no FVIII humano nativo maduro de cerca do aminoácido 395 a cerca do aminoácido 421 de SEQ ID NO: 4, por exemplo, de cerca do aminoácido 397 a cerca do aminoácido 418 de SEQ ID NO: 4. Em ainda outras modalidades, a estrutura de superfície exposta em alça flexível compreendendo A2-2 corresponde a uma região em FVIII humano nativo maduro de cerca do aminoácido 577 a cerca do aminoácido 635 de SEQ ID NO: 4, por exemplo, de cerca do aminoácido 595 a cerca do aminoácido 607 de SEQ ID NO: 4. Em certos aspectos da estrutura de alça flexível exposta na superfície, compreendendo A3-1 corresponde a uma região em FVIII humano nativo maduro de cerca do aminoácido 1705 até cerca do aminoácido 1732 de SEQ ID NO: 4, por exemplo, de cerca do aminoácido 1711 até cerca do aminoácido 1725 de SEQ ID NO: 4. Em ainda outros aspectos, a estrutura de alça flexível exposta na superfície, compreendendo A3 -2 corresponde a uma região em FVIII humano nativo maduro de cerca do aminoácido 1884 a cerca do aminoácido 1917 de SEQ ID NO: 4, por exemplo, de cerca do aminoácido 1899 até cerca do aminoácido 1911 de SEQ ID NO: 4.

[000199] Em outra modalidade, o um ou mais aminoácidos, em que pelo menos uma sequência XTEN está inserida está localizado dentro do domínio a3, por exemplo, aminoácidos 1649 a 1689, que corresponde ao polipeptídeo FVIII maduro de comprimento completo. Em uma modalidade particular, uma sequência de XTEN é inserida entre os aminoácidos 1656 e 1657 de SEQ ID NO: 4 (FVIII maduro de comprimento completo). Em uma modalidade específica, uma proteína FVIII compreendendo uma sequência XTEN inserida imediatamente a

jusante do aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4 compreende ainda uma deleção desde o aminoácido 745 até ao aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4.

[000200] Em algumas modalidades, o um ou mais sítios de inserção de uma ou mais inserções XTEN são imediatamente a jusante de um ou mais aminoácidos selecionados do grupo consistindo em:

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

[000201] Em uma modalidade, uma proteína FVIII útil para a invenção compreende duas sequências XTEN, uma primeira sequência XTEN inserida em um sítio de inserção da primeira e uma segunda XTEN inserida em um segundo sítio de inserção XTEN. Exemplos do primeiro sítio de inserção XTEN e o segundo sítio de inserção XTEN não limitantes estão listados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Exemplos de sítios de inserção para duas XTENS

Inserção 1		Inserção 2	
Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio
745	B	2332	CT
26	A1	403	A2
40	A1	403	A2
18	A1	403	A2
26	A1	599	A2
40	A1	599	A2
18	A1	599	A2
1720	A3	1900	A3
1725	A3	1900	A3
1711	A3	1905	A3
1720	A3	1905	A3
1725	A3	1905	A3
1656	A3	26	A1
1656	A3	18	A1
1656	A3	40	A1
1656	A3	399	A2
1656	A3	403	A2
1656	A3	1725	A3
1656	A3	1720	A3
1900	A3	18	A1
1900	A3	26	A1
1900	A3	40	A1
1905	A3	18	A1
1905	A3	40	A1
1905	A3	26	A1
1910	A3	26	A1
18	A1	399	A2
26	A1	399	A2
40	A1	399	A2
18	A1	403	A2
1656	A3	1900	A3
1656	A3	1905	A3

Inserção 1		Inserção 2	
Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio
1711	A3	40	A1
1711	A3	26	A1
1720	A3	26	A1
1720	A3	40	A1
1720	A3	18	A1
1725	A3	26	A1
1725	A3	40	A1
1725	A3	18	A1
1720	A3	403	A2
1720	A3	399	A2
1711	A3	403	A2
1720	A3	403	A2
1725	A3	403	A2
1725	A3	399	A2
1711	A3	403	A2
1900	A3	399	A2
1900	A3	403	A2
1905	A3	403	A2
1905	A3	399	A2
1910	A3	403	A2

[000202] As duas XTENs inseridas ou ligadas à proteína FVIII podem ser idênticas ou diferentes. Em algumas modalidades, uma proteína FVIII útil para a invenção compreende duas sequências XTEN inseridas na proteína FVIII, uma primeira sequência XTEN inserida imediatamente a jusante do aminoácido 745 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda sequência de XTEN inserida imediatamente a jusante do aminoácido 2332 correspondente à SEQ ID NO: 4 (C-terminal). Em outras modalidades, a primeira sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 18, 26, 40, 1656, ou 1720 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda sequência de XTEN inserida imediatamente a jusante do aminoácido 403 correspondente à SEQ ID

NO: 4. Em ainda outras modalidades, a primeira sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 18, 26 ou 40 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda sequência de XTEN inserida imediatamente a jusante do aminoácido 599 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em ainda outras modalidades, a primeira sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda sequência de XTEN inserida imediatamente a jusante do aminoácido 18, 26, 40, 399, 403, 1725, 1720, 1900, 1905, ou 2332 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em determinadas modalidades, a primeira sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1900 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda sequência de XTEN inserida imediatamente a jusante de aminoácido 18, 26, ou 40 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, a primeira sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 18, 26 ou 40 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda sequência de XTEN inserida imediatamente a jusante do aminoácido 399 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em outras modalidades, a primeira sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1720 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda sequência de XTEN inserida imediatamente a jusante do aminoácido 18, 26 ou 40 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em ainda outras modalidades, a primeira sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1720 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda sequência de XTEN inserida imediatamente a jusante do aminoácido 18, correspondente à SEQ ID NO: 4. Em uma modalidade particular, a proteína FVIII que compreende duas sequências XTEN, uma primeira sequência XTEN inserida imediatamente a jusante do aminoácido 745 correspondente à SEQ ID NO: 4 e uma segunda sequência XTEN inserida imediatamente a jusante do aminoácido 2332 correspondente à SEQ ID NO: 4, em que a proteína FVIII ainda

tem uma deleção desde o aminoácido 745 correspondente à SEQ ID NO: 4 até ao aminoácido 1685 correspondente à SEQ ID NO: 4, ou uma mutação ou substituição no aminoácido 1680 correspondente à SEQ ID NO: 4, por exemplo, Y1680F, uma mutação ou substituição no aminoácido 1648 correspondente à SEQ ID NO: 4, por exemplo, R1648A, ou pelo menos duas mutações ou substituições no aminoácido 1648 correspondente à SEQ ID NO: 4, por exemplo, R1648A, e aminoácido 1680 correspondente à SEQ ID NO: 4, por exemplo, Y1680F. Em uma modalidade específica, a proteína FVIII compreende duas sequências XTEN, uma primeira XTEN inserida imediatamente a jusante do aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4 e uma segunda sequência XTEN inserida imediatamente a jusante do aminoácido 2332 de SEQ ID NO: 4, em que a proteína FVIII ainda tem uma deleção desde o aminoácido 745 até o aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4.

[000203] Em determinadas modalidades, uma proteína FVIII compreende três sequências XTEN, uma primeira sequência XTEN inserida em um primeiro sítio de inserção XTEN, uma segunda sequência de XTEN inserida em uma segunda sequência XTEN, e uma terceira sequência XTEN inserida em um terceiro sítio de inserção XTEN. A primeira, segunda ou terceira sequências XTEN podem ser iguais ou diferentes. O primeiro, segundo, terceiro e sítios de inserção podem ser selecionados a partir do grupo de qualquer um dos sítios de inserção aqui divulgados. Em algumas modalidades, a proteína de Fator VIII que compreende três sequências XTEN pode ainda compreender uma mutação ou substituição, por exemplo, aminoácido 1648 correspondente à SEQ ID NO: 4, por exemplo, R1648A. Por exemplo, os exemplos não limitantes do primeiro, segundo, e terceiros sítios de inserção XTEN estão listados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Exemplos de sítios de inserção para Três XTENs

Inserção 1		Inserção 2		Inserção 3	
Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio
26	A1	403	A2	1656	A3
26	A1	403	A2	1720	A3
26	A1	403	A2	1900	A3
26	A1	1656	A3	1720	A3
26	A1	1656	A3	1900	A3
26	A1	1720	A3	1900	A3
403	A2	1656	A3	1720	A3
403	A2	1656	A3	1900	A3
403	A2	1720	A3	1900	A3
1656	A3	1720	A3	1900	A3
745	B	1900		2332	
18	A1	745	B	2332	CT
26	A1	745	B	2332	CT
40	A1	745	B	2332	CT
18	A1	745	B	2332	CT
40	A1	745	B	2332	CT
403	A2	745	B	2332	CT
399	A2	745	B	2332	CT
1725	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	745	B	2332	CT
1711	A3	745	B	2332	CT
1900	A3	745	B	2332	CT
1905	A3	745	B	2332	CT
1910	A3	745	B	2332	CT

[000204] Em algumas modalidades, uma proteína FVIII compreende três sequências XTEN, uma primeira sequência XTEN inserida imediatamente a jusante do aminoácido 26, correspondente à SEQ ID NO: 4, uma segunda sequência de XTEN inserida a jusante do aminoácido 403 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira sequência XTEN inserida a jusante do aminoácido 1656, 1720, ou 1900 correspondente

à SEQ ID NO: 4. Em outras modalidades, a primeira sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 26, correspondente à SEQ ID NO: 4, uma segunda sequência de XTEN é inserida a jusante do aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira XTEN sequência é inserida a jusante do aminoácido 1720 a 1900 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em ainda outras modalidades, a primeira sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 26, correspondente à SEQ ID NO: 4, uma segunda sequência de XTEN é inserida a jusante do aminoácido 1720 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira sequência XTEN é inserida a jusante do aminoácido 1900 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em ainda outras modalidades, a primeira sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 403 correspondendo a SEQ ID NO: 4, uma segunda sequência de XTEN é inserida a jusante do aminoácido 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira sequência XTEN é inserida a jusante do aminoácido 1720 a 1900 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em outras modalidades, a primeira sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 403 ou 1656 correspondente à SEQ ID NO: 4, uma segunda sequência de XTEN é inserida a jusante do aminoácido 1720 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira sequência XTEN é inserida a jusante do aminoácido 1900 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em outras modalidades, a primeira sequência XTEN é inserida imediatamente a jusante do aminoácido 18, 26, 40, 399, 403, 1711, 1720, 1725, 1900, 1905, ou 1910 correspondente à SEQ ID NO: 4, uma segunda sequência de XTEN é inserida a jusante do aminoácido 745 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira sequência XTEN é inserida a jusante do aminoácido 2332 correspondente à SEQ ID NO: 4.

[000205] Em outras modalidades, uma proteína FVIII na invenção compreende quatro sequências XTEN, uma primeira sequência XTEN



inserida em um primeiro sítio de inserção, uma segunda sequência de XTEN inserida em um segundo sítio de inserção, uma terceira sequência XTEN inserida em um terceiro sítio de inserção, e uma quarta sequência de XTEN inserida em um quarto sítio de inserção. A primeira, segunda, terceira e quarta sequências XTEN podem ser idênticas, diferentes, ou combinações das mesmas. Em algumas modalidades, a proteína de FVIII que compreende quatro sequências XTEN pode ainda compreender uma mutação ou substituição, por exemplo, aminoácidos 1648 correspondente à SEQ ID NO: 4, por exemplo, R1648A. Exemplos não limitantes do primeiro, segundo, terceiro e quarto sítios de inserção XTEN estão listados na Tabela 13.

Tabela 13. Exemplos de sítios de inserção de Quatro XTENS

Inserção 1		Inserção 2		Inserção 3		Inserção 4	
Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio
26	A1	403	A2	1656	a3	1720	A3
26	A1	403	A2	1656	a3	1900	A3
26	A1	403	A2	1720	A3	1900	A3
26	A1	1656	a3	1720	A3	1900	A3
403	A2	1656	a3	1720	A3	1900	A3
0040	A1	0403	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0403	A2	745	B	2332	CT
0018	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0018	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1900	A3	745	B	2332	CT

Inserção 1		Inserção 2		Inserção 3		Inserção 4	
Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio
0040	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT

Inserção 1		Inserção 2		Inserção 3		Inserção 4	
Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio
0409	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1900	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1905	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1910	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1656	a3	1720	A3	2332	CT
0403	A2	1656	a3	1900	A3	2332	CT
0403	A2	1720	A3	1900	A3	2332	CT

Inserção 1		Inserção 2		Inserção 3		Inserção 4	
Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio	Sítio de inserção	Domínio
1656	a3	1720	A3	1900	A3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	1656	a3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	1720	A3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	1900	A3	2332	CT
0018	A1	1656	a3	1720	A3	2332	CT
0018	A1	1656	a3	1900	A3	2332	CT
0018	A1	1720	A3	1900	A3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	0745	B	2332	CT
0018	A1	0745	B	1720	A3	2332	CT
0018	A1	0745	B	1900	A3	2332	CT
0403	A2	0745	B	1720	A3	2332	CT
0403	A2	0745	B	1900	A3	2332	CT
0745	B	1720	A3	1900	A3	2332	CT
0188	A1	1900	A3	0745	B	2332	CT
0599		1900	A3	0745	B	2332	CT
2068		1900	A3	0745	B	2332	CT
2171		1900	A3	0745	B	2332	CT
2227		1900	A3	0745	B	2332	CT
2277		1900	A3	0745	B	2332	CT

[000206] Em algumas modalidades, uma proteína FVIII compreende cinco sequências XTEN, uma primeira sequência XTEN inserida em um primeiro sítio de inserção, uma segunda sequência de XTEN inserida em um segundo sítio de inserção, uma terceira sequência XTEN inserida em um sítio de inserção XTEN terceira, uma quarta sequência XTEN inserida em um quarto sítio de inserção XTEN, e uma quinta sequência XTEN inserida em um quinto sítio de inserção XTEN. A primeira, segunda, terceira, quarta, quinta sequências XTEN podem ser idênticas, diferentes, ou combinações das mesmas. Exemplos não limitantes dos primeiro, segundo, terceiro, quarto, e quinto sítios de inserção estão listados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Exemplos de sítios de inserção para cinco XTENs

XTEN Inserção 1	XTEN inserção 2	XTEN Inserção 3	XTEN Inserção 4	XTEN Inserção 5
0403	1656	1720	1900	2332
0018	0403	1656	1720	2332
0018	0403	1656	1900	2332
0018	0403	1720	1900	2332
0018	1656	1720	1900	2332
0018	0403	0745	1720	2332
0018	0403	0745	1900	2332
0018	0745	1720	1900	2332
0403	0745	1720	1900	2332

[000207] Em certas modalidades, uma proteína FVIII compreende seis sequências XTEN, uma primeira sequência XTEN inserida em um primeiro sítio de inserção XTEN, uma segunda sequência de XTEN inserida em um segundo sítio de inserção XTEN, uma terceira sequência XTEN inserida em um terceiro sítio de inserção XTEN, uma quarta sequência XTEN inserida em um quarto sítio de inserção XTEN, uma quinta sequência de XTEN inserida em um quinto sítio de inserção XTEN, e uma sexta sequência XTEN inserida em um sexto sítio de inserção XTEN. As primeira, segunda, terceira, quarta, quinta,

ou sexta sequências XTEN podem ser idênticas, diferentes, ou combinações das mesmas. Exemplos dos seis sítios de inserção XTEN incluem, entre outros, os sítios de inserção listados na Tabela 15.

**Tabela 15.** Exemplos de sítios de inserção XTEN para Seis XTENs

XTEN Inserção 1	XTEN inserção 2	XTEN Inserção 3	XTEN Inserção 4	XTEN Inserção 5	XTEN Inserção 6
0018	0403	1656	1720	1900	2332
0018	0403	0745	1720	1900	2332

[000208] Em um exemplo particular, uma primeira XTEN é inserida entre os aminoácidos 26 e 27, correspondentes à SEQ ID NO: 4, e é inserida uma segunda XTEN entre aminoácidos 1720 e 1721 correspondente à SEQ ID NO: 4 (FVIII maduro de comprimento completo). Em outro exemplo, uma primeira XTEN é inserida entre os aminoácidos 403 e 404 correspondentes às SEQ ID NO: 4, e uma segunda XTEN é inserida entre os aminoácidos 1720 e 1721 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em alguns exemplos, uma primeira XTEN é inserida entre os aminoácidos 1656 e 1657 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma segunda XTEN é inserida entre os aminoácidos 1720 e 1721 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em outros exemplos, uma primeira XTEN é inserida entre os aminoácidos 26 e 27 correspondente à SEQ ID NO: 4, uma segunda XTEN é inserida entre os aminoácidos 1656 e 1657 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira XTEN é inserida entre os aminoácidos 1720 e 1721 correspondente à SEQ ID NO: 4. Ainda em outras modalidades, uma primeira XTEN é inserida entre os aminoácidos 403 e 404 correspondente à SEQ ID NO: 4, uma segunda XTEN é inserida entre os aminoácidos 1656 e 1657 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira XTEN é inserida entre os aminoácidos 1720 e 1721 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em ainda outras modalidades, uma primeira XTEN é inserida entre os aminoácidos 403 e 404 correspondente à SEQ ID NO: 4, uma segunda XTEN é inserida entre os aminoácidos 1656 e 1657 correspondente à SEQ ID NO: 4, e

uma terceira XTEN é inserida entre os aminoácidos 1720 e 1721 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em determinadas modalidades, uma primeira XTEN é inserida entre os aminoácidos 26 e 27, correspondentes a SEQ ID NO: 4, uma segunda XTEN é inserida entre os aminoácidos 1720 e 1721 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma terceira XTEN é inserida entre os aminoácidos 1900 e 1901 correspondente à SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma primeira XTEN é inserida entre os aminoácidos 26 e 27 correspondente à SEQ ID NO: 4, uma segunda XTEN é inserida entre os aminoácidos 1656 e 1657 correspondente à SEQ ID NO: 4, uma terceira XTEN é inserida entre os aminoácidos 1720 e 1721 correspondente à SEQ ID NO: 4, e uma quarta XTEN é inserida entre 1900 e 1901 correspondente à SEQ ID NO: 4.

[000209] Em uma modalidade particular, uma sequência de XTEN é inserida entre os aminoácidos 745 e 746 de um Fator VIII de comprimento completo ou o sítio de inserção correspondente do Fator VIII sem domínio B.

[000210] Em algumas modalidades, uma proteína quimérica da invenção compreende duas sequências de polipeptídeos, uma primeira sequência de polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de pelo menos cerca de 80%, 90%, 95%, ou 100% idêntica a uma sequência selecionada a partir FVIII-161 (SEQ ID NO: 101), FVIII-169 (SEQ ID NO: 103), FVIII-170 (SEQ ID NO: 102), FVIII-173 (SEQ ID NO: 104); FVIII-195 (SEQ ID NO: 105); FVIII-196 (SEQ ID NO: 106), FVIII-199 (SEQ ID NO: 107), FVIII-201 (SEQ ID NO: 108); FVIII-203 (SEQ ID NO: 109), FVIII-204 (SEQ ID NO: 110), FVIII-205 (SEQ ID NO: 111), FVIII-266 (SEQ ID NO: 112), FVIII-267 (SEQ ID NO: 113), FVIII-268 (SEQ ID NO: 114), FVIII-269 (SEQ ID NO: 115), FVIII-271 (SEQ ID NO: 116), ou do FVIII-272 (SEQ ID NO: 117) e uma segunda sequência de polipeptídeo compreendendo uma sequência de



aminoácidos de pelo menos cerca de 80%, 90%, 95%, ou 100% idêntica a uma sequência selecionada a partir VWF031 (SEQ ID NO: 118), VWF034 (SEQ ID NO: 119), ou VWF-036 (SEQ ID NO: 120).

D) Região constante de Ig ou uma fração da mesma

[000211] O fragmento de VWF ou a proteína FVIII ligada a uma sequência XTEN na presente invenção pode ainda compreender uma região constante de Ig ou uma fração da mesma. A região constante de Ig ou uma fração da mesma pode melhorar propriedades farmacocinéticas ou farmacodinâmicas do VWF ou fragmento da proteína FVIII, em combinação com a sequência XTEN. Em certas modalidades, a região constante de Ig ou uma fração da mesma estende uma meia-vida de uma molécula fundida com a região constante de Ig ou uma fração da mesma.

[000212] Uma região constante de Ig é constituída por domínios denotados CH (pesado constante) (CH1, CH2, etc.). Dependendo do isotipo, (ou seja, IgG, IgM, IgA, IgD, ou IgE), a região constante pode ser constituída por três ou quatro domínios CH. Algumas regiões constantes (por exemplo, os isotipos IgG) de isotipos também contêm uma região em dobradiça. Ver Janeway et al. 2001, Immunobiology, Garland Publishing, NY, NY.

[000213] Uma região constante de Ig ou uma fração da mesma para a produção da proteína quimérica da presente invenção pode ser obtida a partir de um número de diferentes fontes. Em algumas modalidades, uma região constante de Ig ou uma fração da mesma é derivada de uma Ig humana. Entende-se, no entanto, que a região constante de Ig ou uma fração da mesma pode ser derivada a partir de uma Ig de outra espécie de mamífero, incluindo, por exemplo, um roedor (por exemplo, um camundongo, rato, coelho, cobaia) ou espécies de primatas não humanos (por exemplo, chimpanzé, macacos). Além disso, a região constante de Ig ou uma fração da mesma pode ser derivada a

partir de qualquer classe de Ig, incluindo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, e qualquer isotipo de Ig, incluindo IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Em uma modalidade, o isotipo IgG1 humano é usado.

[000214] Uma variedade de sequências do gene da região constante de Ig (por exemplo, as sequências dos genes das regiões constantes humanas) estão disponíveis sob a forma de depósitos acessíveis ao público. A sequência de domínios da região constante pode ser selecionada tendo uma função efetora particular (ou falta uma função efetora particular) ou com uma determinada modificação para reduzir a imunogenicidade. Muitas sequências de anticorpos e genes que codificam anticorpos foram publicadas e sequências da região constante de Ig adequadas (por exemplo, sequências em dobradiça, CH2, e/ou CH3, ou frações das mesmas) podem ser derivadas a partir destas sequências, utilizando técnicas reconhecidas. O material genético obtido utilizando qualquer um dos métodos anteriores pode então ser alterado ou sintetizado para obter os polipeptídeos da presente invenção. Será ainda apreciado que o escopo da presente invenção engloba alelos, variantes e mutações de sequências de DNA da região constante.

[000215] As sequências da região constante de Ig ou uma fração da mesma podem ser clonadas, por exemplo, utilizando a reação em cadeia da polimerase e iniciadores que são selecionados para amplificar o domínio de interesse. Para clonar uma sequência da região constante de Ig ou uma fração da mesma a partir de um anticorpo, o mRNA pode ser isolado a partir do hibridoma, baço ou células linfáticas, transcrito de forma reversa em DNA, e os genes de anticorpos amplificados por PCR. Os métodos de amplificação por PCR são descritos em detalhe nas Patentes US 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; 4.965.188; e em, por exemplo, "PCR Protocolos: A Guide to Methods and Applications" Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, CA

(1990); Ho et al. 1989. Gene 77:51; Horton et al., 1993. Methods Enzymol. 217: 270). PCR pode ser iniciada por iniciadores da região constante de consenso ou por mais iniciadores específicos, baseados nas sequências de DNA e de aminoácidos de cadeia pesada e leve publicados. Como discutido acima, a PCR também pode ser usada para isolar clones de DNA que codificam cadeias pesadas e leves de anticorpo. Neste caso, as bibliotecas podem ser rastreadas por iniciadores ou sondas de consenso homólogas maiores, como sondas de camundongo da região constante. Numerosos conjuntos de iniciadores adequados para a amplificação dos genes do anticorpo são conhecidos na técnica (por exemplo, iniciadores 5' baseados na sequência N-terminal de anticorpos purificados (Benhar e Pastan 1994. Protein Engineering 7: 1509); amplificação rápida de extremidades de cDNA (Ruberti, F. et al., 1994, J. Immunol Methods. 173: 33); sequências líder de anticorpos (Larrick et al. 1989, Biochem. Biophys. Res. Commun. 160: 1250). A clonagem de sequências de anticorpos é ainda descrita em Newman et al., Patente US 5.658.570, depositada em 25 de janeiro de 1995, que é aqui incorporada por referência.

[000216] Uma região constante de Ig aqui utilizada pode incluir todos os domínios e a região em dobradiça ou suas frações. Em uma modalidade, a região constante de Ig ou uma fração da mesma compreende um domínio CH2, domínio CH3, e uma região em dobradiça, isto é uma região Fc ou um parceiro de ligação ao FcRn.

[000217] Como aqui utilizado, o termo "região Fc" é definido como a fração de um polipeptídeo que corresponde à região Fc de Ig nativa, ou seja, como formada pela associação dimérica dos respectivos domínios Fc de suas duas cadeias pesadas. Uma região Fc nativa forma um homodímero com outra região Fc. Em contraste, o termo "região Fc geneticamente fundida" ou "região Fc de cadeia simples" (região scFC), como aqui utilizado, refere-se a uma região Fc dimérica sintéti-

ca constituída por domínios Fc geneticamente ligados dentro de uma única cadeia de polipeptídeos (isto é, codificado em uma única sequência genética contígua).

[000218] Em uma modalidade, a "região Fc" refere-se à fração de uma única cadeia pesada de Ig que começa na região em dobradiça imediatamente a montante do sítio de clivagem de papaína (isto é no resíduo 216 em IgG, tomando o primeiro resíduo da região constante da cadeia pesada sendo o 114) e que termina na extremidade C-terminal do anticorpo. Por conseguinte, um domínio de Fc completo compreende pelo menos um domínio em dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3.

[000219] A região Fc de uma região constante de Ig, dependendo do isotipo de Ig pode incluir domínios CH2, CH3, e CH4, bem como a região em dobradiça. As proteínas quiméricas que compreendem uma região Fc de uma Ig conferem várias propriedades desejáveis de uma proteína quimérica incluindo maior estabilidade, maior meia-vida no soro (ver Capon et al., 1989, Nature 337: 525) bem como a ligação aos receptores Fc, como o receptor de Fc neonatal (FcRn) (Patente US 6.086.875, 6.485.726, 6.030.613; WO 03/077834; US2003-0235536A1), que são aqui incorporadas por referência na sua totalidade.

[000220] Uma região constante de Ig ou uma fração da mesma pode ser um parceiro de ligação ao FcRn. FcRn é ativo nos tecidos epiteliais adultos e expressos no lúmen dos intestinos, vias aéreas pulmonares, superfícies nasais, superfícies vaginais, superfícies do cólon e retal (Patente US 6.485.726). Um parceiro de ligação FcRn é uma fração de uma Ig, que se liga ao FcRn.

[000221] O receptor FcRn foi isolado a partir de várias espécies de mamíferos, incluindo os seres humanos. As sequências do FcRn humano, FcRn de macaco, FcRn de rato e FcRn de camundongo são conhecidos (Story et al, 1994, J. Exp Med 180:2377). O receptor FcRn

liga-se a IgG (mas não outras classes de Ig, como IgA, IgM, IgD, e IgE), a um pH relativamente baixo, transporta ativamente a IgG transcelular em uma direção do lúmen para serosa e, em seguida, libera a IgG a um pH relativamente mais elevado encontrado nos fluidos intersticiais. É expresso no tecido epitelial dos adultos (Patentes US 6.485.726, 6.030.613, 6.086.875; WO 03/077834; US2003-0235536A1) incluindo pulmão e epitélio intestinal (Israel et al 1997, Immunology 92:69), epitélio tubular proximal renal (Kobayashi et al., 2002, Am J. Physiol Renal Physiol 282: F358) bem como o epitélio nasal, superfícies vaginais, e superfícies da árvore biliar.

[000222] Parceiros de ligação a FcRn úteis na presente invenção abrangem moléculas que podem ser especificamente ligadas pelo receptor FcRn incluindo toda a IgG, o fragmento Fc da IgG, e outros fragmentos que incluem a região de ligação completa do receptor FcRn. A região da fração Fc de IgG que se liga ao receptor FcRn foi descrita com base em cristalografia de raios X (Burmeister et al 1994, Nature 372: 379). A principal área de contato de Fc com o FcRn é próxima à junção dos domínios de CH2 e CH3. Contatos Fc-FcRn estão todos dentro de uma única cadeia pesada de Ig. Os parceiros de ligação ao FcRn incluem a IgG inteira, o fragmento Fc da IgG, e outros fragmentos de IgG que incluem a região de ligação completa de FcRn. Os principais locais de contato incluem resíduos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, e 314 dos resíduos de domínio CH2 e aminoácidos 385-387, 428, e 433-436 do domínio CH3. As referências feitas à numeração de aminoácido de Igs ou fragmentos de Ig, ou regiões, são todos baseados em Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.

[000223] As regiões Fe ou parceiros de ligação FcRn ligados a FcRn podem ser efetivamente empurrados através das barreiras epiteliais

por FcRn, proporcionando assim um meio não invasivo para administrar sistemicamente uma molécula terapêutica desejada. Além disso, as proteínas de fusão que compreendem uma região Fc ou um parceiro de ligação ao FcRn são endocitadas pelas células que expressam o FcRn. Mas, em vez de serem marcadas para a degradação, estas proteínas de fusão são recicladas na circulação novamente, aumentando assim a meia-vida *in vivo* dessas proteínas. Em certas modalidades, as frações de regiões constantes de Ig são uma região Fc ou um parceiro de ligação ao FcRn que tipicamente se associa, através de ligações de dissulfeto e outras interações não específicas, com uma outra região Fc ou outro parceiro de ligação ao FcRn para formar dímeros e os multímeros de ordem superior.

[000224] Dois receptores FcRn podem se ligar a uma única molécula Fc. Os dados cristalográficos sugerem que cada molécula FcRn se liga a um único polipeptídeo do homodímero Fc. Em uma modalidade, a ligação ao parceiro de ligação FcRn, por exemplo, um fragmento Fc de uma IgG, a uma molécula biologicamente ativa fornece um meio de liberação da molécula biologicamente ativa por via oral, bucal, sublingual, retal, vaginal, como um aerossol administrado por via nasal ou através uma via pulmonar, ou através de uma via ocular. Em outra modalidade, a proteína quimérica pode ser administrada de forma invasiva, por exemplo, por via subcutânea, por via intravenosa.

[000225] Uma região de parceiro de ligação FcRn é uma molécula ou uma fração respectiva, que pode ser especificamente ligada pelo receptor FcRn com consequente transporte ativo pelo receptor FcRn da região Fc. Especificamente ligado refere-se a duas moléculas formando um complexo que é relativamente estável em condições fisiológicas. A ligação específica é caracterizada por uma elevada afinidade e uma fraca capacidade para moderar como distinguir a ligação não específica, que geralmente tem uma baixa afinidade com uma moderada

a alta capacidade. Tipicamente, a ligação é considerada específica quando a constante de afinidade  $KA$  é maior do que  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , ou maior do que  $10^8 \text{ M}^{-1}$ . Se necessário, a ligação não específica pode ser reduzida sem afetar substancialmente a ligação específica, variando as condições de ligação. As condições de ligação adequadas, como a concentração das moléculas, a força iônica da solução, temperatura, tempo permitido para a ligação, a concentração de um agente de bloqueio (por exemplo, albumina de soro, caseína do leite), etc., podem ser otimizadas por um especialista na técnica utilizando técnicas de rotina.

[000226] Em certas modalidades, uma proteína quimérica da invenção compreende uma ou mais regiões Fc truncadas que são, no entanto, suficientes para conferir ao receptor de Fc (FcR) propriedades de ligação à região Fc. Por exemplo, a fração de uma região Fc que se liga ao FcRn (isto é, a fração de ligação de FcRn) compreende de cerca de aminoácidos 282-438 de IgG1, numeração EU (com os locais de contato principais sendo aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, e 314 dos resíduos de domínio CH2 e aminoácidos 385-387, 428, 433-436 e do domínio CH3. Assim, uma região Fc da invenção pode compreender ou consistir em uma fração de ligação de FcRn. As porções de ligação de FcRn podem ser derivadas a partir de cadeias pesadas de qualquer isotipo, incluindo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Em uma modalidade, uma fração de ligação de FcRn a partir de um anticorpo do isotipo de IgG1 humano é usada. Em outra modalidade, uma fração de ligação de FcRn a partir de um anticorpo do isotipo IgG4 humano é usada.

[000227] Em outra modalidade, a "região Fc" inclui uma sequência de aminoácidos de um domínio de Fe ou derivada de um domínio Fc. Em certas modalidades, uma região Fc compreende pelo menos um de: um domínio dobradiça (por exemplo, região em dobradiça superior,

média, e/ou inferior) (cerca de 216-230 aminoácidos de uma região Fc de anticorpo de acordo com a numeração EU), um domínio CH2 (cerca de 231-340 aminoácidos de uma região Fc de anticorpo de acordo com a numeração EU), um domínio CH3 (cerca de 341-438 aminoácidos de uma região Fc de anticorpo de acordo com a numeração EU), um domínio CH4, ou uma variante, fração, ou um fragmento do mesmo. Em outras modalidades, uma região Fc compreende um domínio Fc completo (isto é, um domínio em dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3). Em algumas modalidades, uma região Fc compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em um domínio em dobradiça (ou uma fração do mesmo) fundido com um domínio CH3 (ou uma fração do mesmo), um domínio em dobradiça (ou uma fração do mesmo) fundido com um domínio CH2 (ou uma fração do mesmo), um domínio CH2 (ou uma fração do mesmo) fundido com um domínio CH3 (ou uma fração do mesmo), um domínio CH2 (ou uma fração do mesmo) fundido com ambos um domínio em dobradiça (ou uma fração do mesmo) e um domínio CH3 (ou uma fração do mesmo). Em ainda outras modalidades, uma região Fc é desprovida de, pelo menos uma fração de um domínio CH2 (por exemplo, a totalidade ou parte de um domínio CH2). Em uma modalidade particular, uma região Fc compreende ou consiste nos aminoácidos correspondentes aos números UE 221 a 447.

[000228] As regiões Fc denotadas como F, F1, F2 ou aqui descritas podem ser obtidas a partir de um número de diferentes fontes. Em uma modalidade, uma região Fc do polipeptídeo é derivada de uma Ig humana. Entende-se, no entanto, que uma região Fc pode ser derivada de uma Ig de outra espécie de mamífero, incluindo, por exemplo, um roedor (por exemplo, um camundongo, rato, coelho ou cobaia) ou espécie de primata não humano (por exemplo, chimpanzé, macaco). Além disso, o polipeptídeo de domínios Fc ou frações dos mesmos



podem ser derivados a partir de qualquer classe de Ig, incluindo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, e qualquer isotipo de Ig, incluindo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Em outra modalidade, o isotipo IgG1 humano é usado.

[000229] Em certas modalidades, a variante Fc confere uma alteração em pelo menos uma função efetora conferida por uma região Fc compreendendo o referido domínio de Fc de tipo selvagem (por exemplo, uma melhoria ou a redução na capacidade da região Fc para se ligar a receptores de Fc (por exemplo, FcγRI, FcγRII ou FcγRIII) ou proteínas do complemento (por exemplo, C1q), ou para desencadear a citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC), fagocitose, ou citotoxicidade dependente do complemento (CDCC)). Em outras modalidades, a variante Fc fornece um resíduo de cisteína.

[000230] As regiões Fc da invenção podem empregar variantes de Fc reconhecidas na técnica que são conhecidos por conferir uma alteração (por exemplo, um aumento ou redução) em função efetora e/ou FcR ou ligação a FcRn. Especificamente, uma molécula de ligação da invenção pode incluir, por exemplo, uma alteração (por exemplo, uma substituição) em uma ou mais das posições de aminoácidos descritas nas Publicações de Patente Internacional PCT 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 e WO06/085967A2; Publicações de Patente US US2007/0231329, US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US20070248603, US20070286859, US20080057056; ou Patentes US 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, e 7.317.091, cada uma das quais é aqui incorporada por referência. Em uma modalidade, a mudança específica (por exemplo, a substituição específica de um ou mais aminoácidos divulgados na técnica) pode ser realizada em uma ou mais das posições de aminoácidos descritas. Em outra modalidade, uma mudança diferente em uma ou mais das posições de aminoácidos descritas (por exemplo, a substituição diferente de uma ou mais posições de aminoácidos descritas na técnica) pode ser realizada.

[000231] A região Fc ou parceiro de ligação ao FcRn de IgG podem ser modificados de acordo com procedimentos bem conhecidos como mutagênese dirigida ao local e semelhantes, para se obter fragmentos Fc ou IgG modificados ou frações dos mesmos que serão ligados por FcRn. Tais modificações incluem modificações remotas a partir dos locais de contato a FcRn bem como modificações dentro dos sítios de contato que preservam ou mesmo aumentam a ligação ao FcRn. Por exemplo, os seguintes resíduos de aminoácidos únicos na Fc de IgG1 humana (Fc  $\gamma$ 1) podem ser substituídos sem perda significativa de afinidade de ligação de Fc para FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A, e

K447A, onde, por exemplo P238A representa a prolina tipo selvagem substituída por alanina na posição número 238. Como um exemplo, uma modalidade específica incorpora a mutação N297A, removendo um local de N-glicosilação altamente conservado. Em adição à alanina outros aminoácidos podem ser substituídos pelos aminoácidos tipo selvagem nas posições especificadas acima. As mutações podem ser introduzidas individualmente em Fc dando origem a mais de cem regiões Fc distintas do Fc nativo. Além disso, as combinações de duas, três, ou mais destas mutações individuais podem ser introduzidas em conjunto, dando origem a centenas de outras regiões Fc. Além disso, uma região de Fc de um constructo da invenção pode ser mutada e a outra região Fc do constructo não mutado no todo, ou ambos podem ser mutados, mas com diferentes mutações.

[000232] Algumas das mutações acima podem conferir nova funcionalidade a região Fc ou parceiro de ligação FcRn. Por exemplo, uma modalidade incorpora N297A, removendo um local de N-glicosilação altamente conservado. O efeito desta mutação é reduzir a imunogenicidade, melhorando assim a meia-vida de circulação da região Fc, e para tornar a região Fc incapaz de se ligar a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB e FcγRIIIA, sem comprometer a afinidade para FcRn (Routledge et al. 1995, Transplantation 60: 847; amigo et al. 1999, Transplantation 68: 1632; Shields et al., 1995, J. Biol Chem 276: 6591). Como mais um exemplo de novas funcionalidades derivadas de mutações descritas acima a afinidade para FcRn pode ser aumentada para além do tipo selvagem em alguns casos. Este aumento da afinidade pode refletir um aumento da taxa de "associação", uma diminuição da taxa de "dissociação" ou ambos um aumento da taxa de "associação" e uma diminuição da taxa de "dissociação". Exemplos de mutações que parecem conferir uma maior afinidade para FcRn incluem, entre outras, T256A, T307A, E380A, e N434A (Shields et al., 2001, J. Biol Chem 276: 6591).

[000233] Além disso, pelo menos três receptores Fc gama humanos parecem reconhecer um sítio de ligação de IgG no interior da região em dobradiça inferior, geralmente aminoácidos 234- 237. Portanto, outro exemplo de novas funcionalidades e potencial imunogenicidade diminuída pode resultar de mutações dessa região, como por exemplo, substituindo os aminoácidos 233-236 da IgG1 humana "ELLG" com a sequência correspondente de IgG2 "PVA" (com uma deleção de aminoácidos). Foi demonstrado que Fc  $\gamma$  RI, Fc  $\gamma$  RII, e Fc  $\gamma$  RIII, que medeiam várias funções efetoras não se ligarão à IgG1 quando essas mutações forem introduzidas. Ward e Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 e Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29: 2613.

[000234] Em uma modalidade, a região constante de Ig ou uma fração do mesmo, por exemplo, uma região Fc, é um polipeptídeo incluindo a sequência de PKNSSMISNTP (SEQ ID NO: 52) e, opcionalmente, incluindo ainda uma sequência selecionada a partir de HQSLGTQ (SEQ ID NO: 53), HQNLSDGK (SEQ ID NO: 54), HQNISDGK (SEQ ID NO: 55), ou VISSHLGQ (SEQ ID NO: 56) (Patente US 5.739.277).

[000235] Em outra modalidade, a região constante de imunoglobulina ou uma fração da mesma compreende uma sequência de aminoácidos na região em dobradiça ou uma fração da mesma que forma uma ou mais ligações dissulfeto com outra região constante de imunoglobulina ou uma fração da mesma. A ligação de dissulfeto pela região constante de imunoglobulina ou uma fração da mesma coloca o primeiro polipeptídeo compreendendo FVIII e o segundo polipeptídeo, compreendendo o fragmento de VWF em conjunto de modo que o VWF endógeno não substitui o fragmento de VWF e não se liga ao FVIII. Portanto, a ligação de dissulfeto entre a primeira região constante de imunoglobulina ou uma fração da mesma e uma segunda região constante de imunoglobulina ou uma fração da mesma impede a interação entre o VWF endógeno e a proteína FVIII. Esta inibição da interação entre o

VWF e proteína FVIII permite a meia-vida da proteína FVIII ir para além do limite de duas vezes. A região em dobradiça ou uma fração da mesma pode ainda ser ligada a um ou mais domínios de CH1, CH2, CH3, um fragmento do mesmo, e quaisquer combinações dos mesmos. Em uma modalidade particular, a região constante de imunoglobulina ou uma fração da mesma é uma região em dobradiça e CH2.

[000236] Em certas modalidades, a região constante de Ig ou uma fração da mesma é hemi-glicosilada. Por exemplo, a proteína quimérica que compreende duas regiões Fc ou parceiros de ligação FcRn podem conter uma primeira região glicosilada Fc (por exemplo, uma região CH2 glicosilada) ou parceiro de ligação ao FcRn e uma segunda região Fc aglicosilada (por exemplo, uma região CH2 aglicosilada) ou parceiro de ligação FcRn. Em uma modalidade, um ligante pode ser interposto entre as regiões Fc glicosiladas e aglicosiladas. Em outra modalidade, a região Fc ou parceiro de ligação ao FcRn é totalmente glicosilada, ou seja, todas as regiões Fc são glicosiladas. Em outras modalidades, a região Fc pode ser aglicosilada, isto é nenhuma das frações Fc são glicosiladas.

[000237] Em certas modalidades, uma proteína quimérica da invenção compreende uma substituição de aminoácidos a uma região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, as variantes de Fc), que altera as funções efetoras independente de antígeno da região constante de Ig, em especial a meia-vida em circulação da proteína.

[000238] Estas proteínas exibem um aumento ou diminuição da ligação a FcRn quando em comparação com proteínas que não possuem estas substituições e, por conseguinte, têm um aumento ou diminuição da meia-vida no soro, respectivamente. As variantes de Fc com uma maior afinidade para FcRn parecem ter meias-vidas no soro mais longa, e estas moléculas têm aplicações úteis em métodos de tratamento de mamíferos onde meia-vida longa do polipeptídeo administrado é

desejada, por exemplo, para tratar uma doença ou distúrbio crônico (ver, por exemplo, Patentes US 7.348.004, 7.404.956, e 7.862.820). Em contraste, variantes Fc com diminuição da afinidade de ligação de FcRn parece ter meias-vidas mais curtas, e essas moléculas também são úteis, por exemplo, para administração a um mamífero, onde um reduzido tempo de circulação pode ser vantajoso, por exemplo, para imagiologia de diagnóstico in vivo ou em situações em que o polipeptídeo de partida tem efeitos secundários tóxicos quando presentes na circulação durante períodos prolongados. As variantes de Fc com diminuição da afinidade de ligação ao FcRn são também menos prováveis de atravessar a placenta e, deste modo, também são úteis no tratamento de doenças ou patologias em mulheres grávidas. Além disso, outras aplicações em que a reduzida afinidade de ligação de FcRn pode ser desejada incluem aquelas aplicações em que a localização do cérebro, rim, e/ou do fígado é desejada. Em uma modalidade exemplar, a proteína quimérica da invenção exibe uma redução do transporte através do epitélio de glomérulos de rim a partir da vasculatura. Em outra modalidade, a proteína quimérica da invenção exibe a redução do transporte através da barreira hematoencefálica (BHE) a partir do cérebro, para dentro do espaço vascular. Em uma modalidade, uma proteína com ligação FcRn alterada compreende pelo menos uma região Fc ou parceiro de ligação ao FcRn (por exemplo, uma ou duas regiões Fc ou parceiros de ligação a FcRn), que tem uma ou mais substituições de aminoácidos dentro da "alça de ligação ao FcRn" de uma região constante de Ig. A alça de ligação ao FcRn é composta por resíduos de aminoácidos 280-299 (de acordo com a numeração EU) de um tipo selvagem, de comprimento total, da região Fc. Em outras modalidades, uma região constante de Ig ou uma fração da mesma de uma proteína quimérica da invenção tendo afinidade de ligação a FcRn alterada compreende pelo menos uma região Fc ou parceiro de

ligação ao FcRn tendo uma ou mais substituições de aminoácidos no interior da "zona de contato" 15Å FcRn. Como aqui utilizado, o termo "zona de contato" 15Å FcRn inclui resíduos nas seguintes posições de uma fração Fc tipo selvagem de comprimento completo: 243-261, 275-280, 282-293, 302-319, 336-348, 367, 369, 372-389, 391, 393, 408, 424, 425-440 (numeração UE). Em outras modalidades, uma região constante de Ig ou uma fração da mesma da invenção tendo afinidade de ligação a FcRn alterada compreende pelo menos uma região Fc ou parceiro de ligação ao FcRn possuindo uma ou mais substituições de aminoácidos em uma posição de aminoácido correspondente a qualquer uma das seguintes posições EU: 256, 277-281, 283-288, 303-309, 313, 338, 342, 376, 381, 384, 385, 387, 434 (por exemplo, N434A ou N434K), e 438. Exemplos de substituições de aminoácidos que alteraram a atividade de ligação ao FcRn são revelados na Publicação Internacional PCT N.º WO05/047327 que é aqui incorporado por referência.

[000239] Uma região Fc ou parceiro de ligação ao FcRn utilizado na invenção também pode compreender uma substituição de aminoácidos reconhecida na técnica que altera a glicosilação da proteína quimérica. Por exemplo, a região Fc ou parceiro de ligação a FcRn da proteína quimérica ligada a um fragmento de VWF ou uma proteína FVIII pode compreender uma região Fc possuindo uma mutação que conduz à glicosilação reduzida (por exemplo, glicosilação ligada em N ou O) ou pode compreender uma glicoforma alterada da fração Fc tipo selvagem (por exemplo, uma glicano com baixa fucose ou livre de fucose).

[000240] Em uma modalidade, uma proteína quimérica não processada da invenção pode compreender uma região Fc geneticamente fundida (*ou seja*, uma região scFc) tendo dois ou mais de seus constituintes da região constante de Ig ou uma porção da mesma indepen-

dentemente selecionada da região constante de Ig ou uma porção da mesma descrita aqui. Em uma modalidade, as regiões Fc de uma região Fc dimérica são as mesmas. Em outra modalidade, pelo menos duas das regiões Fc são diferentes. Por exemplo, as regiões Fc ou parceiros de ligação a FcRn das proteínas da invenção compreendem o mesmo número de resíduos de aminoácido ou podem diferir em comprimento por um ou mais resíduos de aminoácido (por exemplo, em cerca de 5 resíduos de aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, ou 5 resíduos de aminoácido), cerca de 10 resíduos, cerca de 15 resíduos, cerca de 20 resíduos, cerca de 30 resíduos, cerca de 40 resíduos, ou cerca de 50 resíduos). Ainda em outras modalidades, as regiões de Fc ou parceiros de ligação a FcRn da proteína da invenção podem diferir na sequência em uma ou mais posições de aminoácido. Por exemplo, pelo menos duas das regiões Fc ou parceiros de ligação a FcRn podem diferir em cerca de 5 posições de aminoácido (por exemplo, 1, 2, 3, 4, ou 5 posições de aminoácido), cerca de 10 posições, cerca de 15 posições, cerca de 20 posições, cerca de 30 posições, cerca de 40 posições, ou cerca de 50 posições).

#### E) Ligantes

[000241] A proteína quimérica da presente invenção compreende ainda um ou mais ligantes. Um tipo dos ligantes é um ligante clivável, que pode ser clivado por várias proteases, quando administrados a um sujeito in vivo, por exemplo, em um local de coagulação. Em uma modalidade, o ligante clivável permite a clivagem da fração, por exemplo, um fragmento de VWF, a partir da proteína quimérica no local da cascata de coagulação, permitindo assim que o FVIII ativado (FVIIIa) tenha a sua atividade FVIIIa. Outro tipo de ligantes é um ligante processável, que contém um sítio de clivagem intracelular e, assim, pode ser clivado por uma enzima de processamento intracelular em uma célula hospedeira, permitindo a expressão de um polipeptídeo conveniente e



formação de uma proteína quimérica.

[000242] Um ou mais ligantes podem estar presentes entre quaisquer duas proteínas na proteína quimérica. Em uma modalidade, uma proteína quimérica compreende (i) um fragmento de VWF, (ii) uma sequência de XTEN, e (iii) uma proteína FVIII, em que o fragmento de VWF é ligado à sequência de XTEN por um ligante, por exemplo, um ligante clivável, e a sequência XTEN é adicionalmente ligada à proteína FVIII (isto é, V-L-X-FVIII). Em outra modalidade, uma proteína quimérica compreende (i) um fragmento de VWF, (ii) uma sequência de XTEN, e (iii) uma proteína FVIII, em que o fragmento de VWF é ligado à sequência de XTEN, e a sequência de XTEN está ligada à proteína FVIII através de um ligante, por exemplo, um ligante clivável (isto é, V-X-L-FVIII).

[000243] Em certas modalidades, uma proteína quimérica compreende (i) um fragmento de VWF, (ii) uma sequência de XTEN, (iii) uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, uma primeira região Fc), (iv) uma proteína FVIII, e (v) uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, uma segunda região Fc), em que o fragmento de VWF está ligado à sequência de XTEN por um ligante opcional, por exemplo, um ligante clivável. A sequência XTEN pode ser ainda ligada à primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma através de um ligante, por exemplo, um ligante clivável. A proteína FVIII (com ou sem uma sequência de XTEN) também pode ser ligada à segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma por um ligante opcional, por exemplo, um ligante clivável. Em certas modalidades, a proteína quimérica compreende ainda um ou mais ligantes, por exemplo, ligantes processáveis, entre a primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, primeira região Fc) e a segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, segunda região Fc),

entre o fragmento de VWF e a segunda região constante de Ig ou de uma fração da mesma, ou entre a proteína FVIII e a primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, primeira região Fc).

[000244] Em algumas modalidades, a presente invenção inclui uma proteína quimérica que compreende (i) uma proteína FVIII, (ii) uma sequência de XTEN, (iii) uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma, e (iv) uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma, em que a primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma e a segunda região constante de Ig ou a uma fração dos mesmos são ligados por um ligante processável.

[000245] O ligante útil na presente invenção pode compreender qualquer molécula orgânica. Em uma modalidade, o ligante compreende um polímero, por exemplo, polietileno glicol (PEG) ou hidroxietil amido (HES). Em outra modalidade, o ligante compreende uma sequência de aminoácidos. O ligante pode compreender, pelo menos cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, ou 2000 aminoácidos. O ligante pode compreender os aminoácidos 1-5 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 10-50 aminoácidos, 50-100 aminoácidos, 100-200 aminoácidos, 200-300 aminoácidos, 300-400 aminoácidos, 400-500 aminoácidos, 500-600 aminoácidos, 600-700 aminoácidos, 700-800 aminoácidos, 800-900 aminoácidos, ou 900-1000 aminoácidos. Em uma modalidade, o ligante compreende uma sequência de XTEN. Exemplos adicionais de XTEN podem ser utilizados de acordo com a presente invenção e são divulgados nas publicações de Patente US 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1, 2011/0172146 ou A1, ou publicação de Patente Internacional WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO

2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1, ou WO 2011028344 A2. Em outra modalidade, o ligante é uma sequência de PAS.

[000246] O ligante útil na presente invenção pode compreender qualquer molécula orgânica. Em uma modalidade, o ligante é um polímero, por exemplo, polietileno glicol (PEG) ou hidroxietil amido (HES). Em outra modalidade, o ligante é uma sequência de aminoácidos. O ligante pode compreender, pelo menos cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, ou 2000 aminoácidos. O ligante pode compreender 1-5 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 10-50 aminoácidos, 50-100 aminoácidos, 100-200 aminoácidos, 200-300 aminoácidos, 300-400 aminoácidos, 400-500 aminoácidos, 500-600 aminoácidos, 600-700 aminoácidos, 700-800 aminoácidos, 800-900 aminoácidos, ou 900-1000 aminoácidos.

[000247] Exemplos de ligantes são bem conhecidas na técnica. Em uma modalidade, o ligante compreende sequência  $G_n$ . O ligante pode compreender a sequência  $(GA)_n$ . O ligante pode compreender a sequência  $(GGS)_n$ . Em outras modalidades, o ligante compreende  $(GGGS)_n$  (SEQ ID NO: 57). Em ainda outras modalidades, o ligante compreende a sequência  $(GGS)_n$   $(GGGS)_n$  (SEQ ID NO: 58). Nestes casos,  $n$  pode ser um número inteiro de 1-100. Em outros casos,  $n$  pode ser um número inteiro de 1-20, ou seja, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20. Exemplos de ligantes incluem, entre outros, GGG, SGGSGGS (SEQ ID NO: 59), GGSGGSGGSGGSGGG (SEQ ID NO: 60), GGSGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 61), GGSGGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 62), ou GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 63). O ligante não elimina ou diminui a atividade de VWF ou o fragmento de atividade de coagula-

ção do Fator VIII. Opcionalmente, o ligante aumenta a atividade de fragmento VWF ou atividade de coagulação da proteína do Fator VIII, por exemplo, diminuindo ainda mais os efeitos de impedimento estérico e fazendo com que o fragmento de VWF ou fração do Fator VIII estejam mais acessíveis ao seu local de ligação ao alvo.

[000248] Em uma modalidade, o ligante útil para a proteína quimérica é 15-25 aminoácidos de comprimento. Em outra modalidade, o ligante útil para a proteína quimérica é de 15-20 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante para a proteína quimérica é de 10-25 aminoácidos de comprimento. Em outras modalidades, o ligante para a proteína quimérica é de 15 aminoácidos de comprimento. Em ainda outras modalidades, o ligante para a proteína quimérica é (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 64) em que G representa glicina, S representa serina e o símbolo n representa um número inteiro 1-20.

#### F) Sítios de clivagem

[000249] O ligante pode também incorporar uma fração capaz de ser clivada quimicamente (por exemplo, hidrólise de uma ligação éster), por via enzimática (isto é, a incorporação de uma sequência de clivagem de protease), ou fotoliticamente (por exemplo, um cromóforo como ácido 3-amino -3-(2-nitrofenil) propiônico (ANP)) de forma a liberar uma molécula da outra.

[000250] Em uma modalidade, o ligante é um ligante clivável. Os ligantes cliváveis podem compreender um ou mais locais de clivagem na extremidade N-terminal ou C-terminal ou em ambas. Em outra modalidade, o ligante clivável consiste essencialmente em, ou consiste em um ou mais sítios de clivagem. Em outras modalidades, o ligante clivável compreende sequências de aminoácidos de aminoácidos heterólogas de ligante aqui descritas ou polímeros e um ou mais sítios de clivagem.

[000251] Em certas modalidades, um ligante clivável compreende um

ou mais sítios de clivagem que podem ser clivados em uma célula hospedeira (isto é, sítios de processamento intracelular). Exemplos não limitantes do sítio de clivagem incluem RRRR (SEQ ID NO: 9), RKRRKR (SEQ ID NO: 10), e RRRRS (SEQ ID NO: 11).

[000252] Em outras modalidades, um ligante clivável compreende um ou mais sítios de clivagem que são clivadas por uma protease depois de uma proteína quimérica que compreende o ligante clivável é administrado a um sujeito. Em uma modalidade, o sítio de clivagem é clivado por uma protease selecionada a partir do grupo consistindo em fator Xla, fator Xlla, calicreína, fator VIIa, fator IXa, fator Xa, fator IIa (trombina), elastase-2, MMP-12, MMP -13, MMP-17, e MMP-20. Em outra modalidade, o sítio de clivagem é selecionado a partir do grupo consistindo de um sítio de clivagem de FXIa (por exemplo, KLTR↓AET (SEQ ID NO: 65)), um sítio de clivagem de FXIa (por exemplo, DFTR↓VVG (SEQ ID NO: 66)), um sítio de clivagem FXIIa (por exemplo, TMTR↓IVGG (SEQ ID NO: 67)), um sítio de clivagem de Calicreína (por exemplo, SPFR↓STGG (SEQ ID NO: 68)), um sítio de clivagem de FVIIa (por exemplo, LQVR↓IVGG (SEQ ID NO: 69)), um sítio de clivagem de FIXa (por exemplo, PLGR↓IVGG (SEQ ID NO: 70)), um sítio de clivagem FXa (por exemplo, IEGR ↓TVGG (SEQ ID NO: 71)), um sítio de clivagem FIIa (trombina) (por exemplo, LTPR↓SLLV (SEQ ID NO: 72)), um sítio de clivagem da elastase-2 (por exemplo, LGPV↓SGVP (SEQ ID NO: 73)), sítio de clivagem de Granzima-B (por exemplo, VAGD↓SLEE (SEQ ID NO: 74)), um sítio de clivagem de MMP-12 (por exemplo, GPAG↓LGGA (SEQ ID NO: 75)), um sítio de clivagem de MMP-13 (por exemplo, GPAG↓LRGA (SEQ ID NO: 76)), um sítio de clivagem de MMP-17 (por exemplo, APLG↓LRLR (SEQ ID NO: 77)), um sítio de clivagem de MMP-20 (por exemplo, PALP↓LVAQ (SEQ ID NO: 78)), um sítio de clivagem de TEV (por exemplo, EN-LYFQ↓G (SEQ ID NO: 79)), um sítio de clivagem de enteroquinase (por

exemplo, DDDK↓IVGG (SEQ ID NO: 80)), um sítio de clivagem de protease 3C (PRESCISSION<sup>™</sup>) (por exemplo, LEVLFQ↓GP (SEQ ID NO: 81)), e um sítio de clivagem de Sortase (por exemplo, LPKT↓GSES) (SEQ ID NO: 82). Em certas modalidades, os sítios de clivagem de FXIa incluem, entre outros, por exemplo, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 83) e SVSQTSKLTR (SEQ ID NO: 84). Sítios de clivagem de trombina não limitantes exemplares incluem, por exemplo, DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 85), TTKIKPR (SEQ ID NO: 86), ou LVPRG (SEQ ID NO: 87), e uma sequência que compreende, que consiste essencialmente em, ou consistindo em ALRPR (SEQ ID NO: 17) (por exemplo, ALR-PRVVGA (SEQ ID NO: 88)).

[000253] Em uma modalidade específica, o sítio de clivagem é TLD-PRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEK (SEQ ID NO: 8).

#### POLINUCLEOTÍDEOS, VETORES E CÉLULAS HOSPEDEIRAS

[000254] É também proporcionado na presente invenção um polinucleotídeo que codifica (a) um fragmento de VWF ligado a uma sequência XTEN e uma proteína FVIII, (b) uma proteína FVIII ligada a uma sequência XTEN e Fc, ou (c) uma proteína FVIII ligada com uma sequência de XTEN e um fragmento de VWF aqui descrito. Quando uma proteína quimérica é uma única cadeia de polipeptídeo (por exemplo, F2-L2-X-V-L1-F1-FVIII, em que o FVIII compreende uma proteína FVIII, F1 compreende uma primeira região constante de Ig ou de uma fração da mesma, por exemplo, uma primeira região Fc, L1 compreende um primeiro ligante, V compreende um fragmento de VWF, X compreende uma sequência de XTEN, L2 compreende um segundo ligante, e F2 compreende uma segunda região constante de Ig ou de uma fração da mesma, por exemplo, uma segunda região Fc), a invenção é projetada para uma única cadeia de polinucleotídeo que codifica a cadeia polipeptídica única. Quando a proteína quimérica compreende uma primeira e uma segunda cadeias de polipeptídeos (F2-L2-X-V:

F1-FVIII), a primeira cadeia de polipeptídeo compreendendo um fragmento de VWF ligado a uma sequência XTEN, que é ainda ligada a uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, uma primeira região Fc) através de um ligante clivável (por exemplo, F2-L2-X-V), e a segunda cadeia de polipeptídeos compreendendo uma proteína FVIII e uma segunda região constante de Ig ou uma fração da mesma (por exemplo, uma segunda região Fc) (por exemplo, o FVIII-F1), em que a primeira cadeia de polipeptídeos e a segunda cadeia de polipeptídeos estão associadas uma com a outra, um polinucleotídeo pode incluir a primeira sequência de nucleotídeos e a segunda sequência de nucleotídeos. Em uma modalidade, a primeira cadeia de polipeptídeos e a segunda cadeia de polipeptídeo podem ser codificadas por um polinucleotídeo de cadeia simples. Em outra modalidade, a primeira cadeia de polipeptídeos e a segunda cadeia de polipeptídeos são codificadas por dois polinucleotídeos diferentes, ou seja, uma primeira sequência de nucleotídeos e uma segunda sequência de nucleotídeos. Em outra modalidade, a primeira sequência de nucleotídeos e a segunda sequência de nucleotídeos são diferentes em dois polinucleotídeos (por exemplo, vetores diferentes). Em certas modalidades, a presente invenção é dirigida a um conjunto de polinucleotídeos compreendendo uma primeira cadeia de nucleotídeos e uma segunda cadeia de nucleotídeos, em que a primeira cadeia de nucleotídeos codifica para o fragmento de VWF da proteína quimérica e a segunda cadeia de nucleotídeos codifica a proteína FVIII. Em algumas modalidades, uma proteína quimérica compreendendo duas cadeias de polipeptídeos ou três cadeias de polipeptídeo pode ser codificada por um polinucleotídeo de cadeia simples, e, em seguida, processada em duas ou três (ou mais) cadeias de polipeptídeos. Em ainda outras modalidades, uma proteína quimérica compreendendo estas cadeias de polipeptídeos podem ser codificadas por duas ou três cadeias de

polinucleotídeos.

[000255] Em outras modalidades, o conjunto dos polinucleotídeos compreende ainda uma cadeia de nucleotídeos adicional (por exemplo, uma segunda cadeia de nucleotídeos quando o polipeptídeo quimérico é codificado por um polinucleotídeo de cadeia única ou uma terceira cadeia de nucleotídeos quando a proteína quimérica é codificada por duas cadeias de polinucleotídeos) que codifica uma proteína convertase. A proteína convertase pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em uma pró-proteína subtilisina convertase/Kexin tipo 5 (PCSK5 ou PC5), pró-proteína subtilisina convertase/Kexin tipo 7 (PCSK7 ou PC5), uma levedura Kex 2, pró-proteína subtilisina convertase/Kexin tipo 3 (PACE ou PCSK3), e duas ou mais combinações das mesmas. Em algumas modalidades, a proteína convertase é PACE, PC5, ou PC7. Em uma modalidade específica, a proteína é a convertase PC5 ou PC7. Ver o Pedido Internacional N°. PCT/US2011/043568.

[000256] Como aqui utilizado, um vetor de expressão refere-se a qualquer constructo de ácido nucleico que contém os elementos necessários para a transcrição e tradução de uma sequência de codificação inserida, ou no caso de um vetor viral de RNA, os elementos necessários para a replicação e tradução, quando introduzido em uma célula hospedeira apropriada. Os vetores de expressão podem incluir plasmídeos, fagemídeos, vírus, e seus derivados.

[000257] Os vetores de expressão da invenção incluem polinucleotídeos que codificam a proteína quimérica aqui descrita. Em uma modalidade, uma ou mais das sequências de codificação para o fragmento de VWF e XTEN, a proteína FVIII e XTEN, ou ambos estão ligados operativamente a uma sequência de controle da expressão. Como aqui utilizado, duas sequências de ácidos nucleicos estão operativamente ligadas quando estão ligadas covalentemente de forma a permitir a cada sequência de ácido nucleico componente reter a sua funcio-



nalidade. Uma sequência de codificação e uma sequência de controle da expressão do gene são ditas como sendo operativamente ligadas quando estão ligadas covalentemente de forma a colocar a expressão ou transcrição e/ou tradução da sequência de codificação sob a influência ou controle da sequência de controle da expressão do gene. Duas sequências de DNA são ditas como sendo operativamente ligadas, se a indução de um promotor de expressão de genes 5' resulta na transcrição da sequência de codificação e se a natureza da ligação entre as duas sequências de DNA não (1) resulta na introdução de uma mutação de deslocamento, (2) interfere com a capacidade da região promotora em dirigir a transcrição da sequência de codificação, ou (3) interferir com a capacidade do transcrito de RNA correspondente para ser traduzido em uma proteína. Assim, uma sequência de expressão de gene seria operativamente ligada a uma sequência de codificação de ácido nucleico se a sequência de expressão gênica fosse capaz de realizar a transcrição dessa sequência de codificação de ácido nucleico de tal forma que o transcrito resultante traduz-se na proteína ou polipeptídeo desejado.

[000258] Uma sequência de controle da expressão do gene, como aqui utilizado é qualquer sequência de nucleotídeos de regulação, como uma sequência promotora ou a combinação promotora-intensificadora, que facilita a transcrição eficiente e tradução do ácido nucleico que codifica para a qual está operativamente ligada. A sequência de controle da expressão do gene pode, por exemplo, ser um promotor de mamífero ou viral, como um promotor constitutivo ou induzível. Promotores de mamíferos constitutivos incluem, entre outros, os promotores para os seguintes genes: hipoxantina fosforribosil-transferase (HPRT), adenosina desaminase, piruvato quinase, promotor da beta-actina e outros promotores constitutivos. Promotores virais exemplificativos que funcionam de forma constitutiva em células eucarióticas incluem, por

exemplo, promotores do citomegalovírus (CMV), vírus de símio (por exemplo, SV40), vírus do papiloma, adenovírus, vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus do sarcoma de Rous, o citomegalovírus, repetições terminais longas (LTR) do vírus Moloney da leucemia, e outros retrovírus, e o promotor da timidina quinase do vírus herpes simplex. Outros promotores constitutivos são conhecidos daqueles especialistas na técnica. Os promotores úteis como sequências de expressão de gene da invenção também incluem os promotores induzíveis. Os promotores induzíveis são expressos na presença de um agente indutor. Por exemplo, o promotor de metalotioneína é induzido para promover a transcrição e a tradução na presença de certos íons metálicos. Outros promotores induzíveis são conhecidos para os especialistas na técnica.

[000259] Em geral, a sequência de controle da expressão do gene deve incluir, como necessário, sequências 5' não transcritas e sequências 5' não traduzidas envolvidas com a iniciação da transcrição e da tradução, respectivamente, como uma caixa TATA, sequência de cobertura, sequência CAAT, e outras semelhantes. Especialmente, tais sequências 5' não transcritas incluirão uma região promotora que inclui uma sequência promotora para controle da transcrição do ácido nucleico de codificação operativamente ligado. As sequências de expressão de gene, opcionalmente, incluem sequências potencializadoras ou sequências ativadoras a montante, como desejado.

[000260] Os vetores virais incluem, entre outros, as sequências de ácidos nucleicos a partir dos seguintes vírus: retrovírus, como o vírus da leucemia murina de Moloney, vírus do sarcoma murino de Harvey, vírus do tumor mamário murino, o vírus do sarcoma de Rous e; adenovírus, vírus adenoassociados; Vírus do tipo SV40; poliomavírus, Vírus de Epstein-Barr; vírus do papiloma; vírus do herpes; vírus da vacínia; vírus da poliomielite; e vírus RNA como um retrovírus. Pode-se

prontamente utilizar outros vetores conhecidos na técnica. Certos vetores virais são baseados em vírus eucarióticos não citopáticos em que os genes não essenciais foram substituídos pelo gene de interesse. Vírus não citopáticos incluem retrovírus, o ciclo de vida dos quais envolve a transcrição reversa de RNA viral genômico em DNA com subsequente integração pró-viral no DNA celular do hospedeiro. Os retrovírus foram aprovados para ensaios humanos de terapia de gene. Mais úteis são aqueles retrovírus que são deficientes em replicação (isto é, capazes de dirigir a síntese das proteínas desejadas, mas incapazes de produzir uma partícula infecciosa). Tais vetores de expressão retrovirais geneticamente alterados têm utilidade geral para a transdução de elevada eficiência de genes *in vivo*. Os protocolos padrão para a produção de retrovírus deficientes na replicação (incluindo as etapas de incorporação de material genético exógeno em um plasmídeo, transfecção de uma linhagem celular de empacotamento com o plasmídeo, produção de retrovírus recombinantes pela linhagem celular de empacotamento, coleta de partículas virais a partir de meios de cultura de tecidos, e infecção das células alvo com as partículas virais) são fornecidos em Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, a Laboratory Manual, W.H. Freeman Co., New York (1990) e Murry, E.J., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N. J. (1991).

[000261] Em uma modalidade, o vírus é um vírus adenoassociado, um vírus de DNA de cadeia dupla. O vírus adenoassociado pode ser manipulado para ser deficiente para a replicação e é capaz de infectar uma ampla gama de tipos de células e espécies. Ele tem ainda vantagens como estabilidade ao calor e a solvente lipídico; altas frequências de transdução em células de diversas linhagens, incluindo células Hematopoiéticas; e falta de inibição superinfecção permitindo assim várias séries de transduções. Alegadamente, o vírus adenoassociado

pode integrar no DNA celular humano de uma forma específica ao sítio, minimizando assim a possibilidade de mutagênese por inserção e variabilidade de característica de expressão de gene inserido da infecção retroviral. Além disso, as infecções de vírus adenoassociados de tipo selvagem foram seguidas em cultura de tecidos durante mais de 100 passagens na ausência de pressão seletiva, implicando que a integração genômica do vírus adenoassociado é um evento relativamente estável. O vírus adenoassociado também pode funcionar de uma forma extracromossômica.

[000262] Outros vetores incluem vetores de plasmídeo. Os vetores plasmídeo foram extensivamente descritos na técnica e são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Ver, por exemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Nos últimos anos, os vetores de plasmídeos demonstraram ser particularmente vantajosos para a liberação de genes às células *in vivo* devido à sua incapacidade de replicar no interior e integrar-se em um genoma hospedeiro. Estes plasmídeos, no entanto, têm um promotor compatível com a célula hospedeira, podem expressar um peptídeo a partir de um gene operativamente codificado dentro do plasmídeo. Alguns plasmídeos geralmente utilizados disponíveis a partir de fornecedores comerciais incluem pBR322, pUC18, pUC19, vários plasmídeos pcDNA, pRC/CMV, vários plasmídeos pCMV, pSV40, e pBlueScript. Exemplos adicionais de plasmídeos específicos incluem pcDNA3.1, número de catálogo V79020; pcDNA3.1/hygro, número de catálogo V87020; pcDNA4/myc-His, número de catálogo V86320; e pBudCE4.1, número de catálogo V53220, todos da Invitrogen (Carlsbad, CA.). Outros plasmídeos são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Além disso, os plasmídeos podem ser projetados utilizando técnicas de biologia molecular padrão para remover e/ou adicionar fragmentos específicos de DNA.

[000263] Em um sistema de expressão de inseto que pode ser utilizado para produzir as proteínas da presente invenção, o vírus nuclear de polihidrose *Autographa californica* (AcNPV) é utilizado como um vetor para expressar os genes estranhos. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. Uma sequência de codificação pode ser clonada em regiões não essenciais (por exemplo, o gene poliedro) do vírus e colocada sob controle de um promotor ACNPV (por exemplo, o promotor poliedro). A inserção com sucesso de uma sequência de codificação irá resultar na inativação do gene poliédrico e na produção de vírus recombinante não ocluído (isto é, vírus desprovido do revestimento proteico codificado pelo gene do poliedro). Estes vírus recombinantes são então utilizados para infectar células de *Spodoptera frugiperda* nas quais o gene inserido é expresso. (ver, por exemplo, Smith et al (1983) J Virol. 46: 584; Pat US 4.215.051). Outros exemplos deste sistema de expressão podem ser encontrados em Ausubel et al., Eds. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Greene Publicar. Assoc. & Wiley Interscience.

[000264] Outro sistema que pode ser usado para expressar as proteínas da presente invenção é o sistema de expressão do gene de glutamina sintetase, também referido como o "sistema de expressão de GS" (Lonza Biologics PLC, Berkshire Reino Unido). Este sistema de expressão é descrito em detalhes na Patente US 5.981.216.

[000265] Em células hospedeiras de mamífero, pode ser utilizado um número de sistemas de expressão baseados em vírus. Nos casos em que um adenovírus é usado como um vetor de expressão, uma sequência de codificação pode ser ligada a um complexo de controle adenoviral de transcrição/tradução, por exemplo, o promotor tardio e a sequência líder tripartida. Este gene quimérico pode então ser inserido no genoma de adenovírus *in vitro* ou por recombinação *in vivo*. A inserção em uma região não essencial do genoma viral (por exemplo,

região E1 ou E3) resultará em um vírus recombinante que é viável e capaz de expressar o peptídeo em hospedeiros infectados. (Ver, por exemplo, Logan & Shenk (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81: 3655). Alternativamente, o promotor de 7,5 K de vaccínia pode ser utilizado. Ver, por exemplo, Mackett et al. (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79: 7415; Mackett et al. (1984) J Virol 49: 857; Panicali et al. (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79: 4927.

[000266] Para aumentar a eficiência de produção, os polinucleotídeos podem ser projetados para codificar unidades múltiplas da proteína da presente invenção separadas por sítios de clivagem enzimática. O polipeptídeo resultante pode ser clivado (por exemplo, por tratamento com a enzima apropriada) para recuperar as unidades de polipeptídeos. Isto pode aumentar o rendimento de polipeptídeos dirigidos por um único promotor. Quando usado em sistemas de expressão virais apropriados, a tradução de cada polipeptídeo codificado pelo mRNA é dirigida internamente no transcrito; por exemplo, por um sítio de entrada de ribossoma interno, IRES. Assim, o constructo policistrônico dirige a transcrição de um mRNA único e grande, policistrônico que, por sua vez, dirige a tradução de vários polipeptídeos individuais. Esta abordagem elimina a produção e processamento enzimático de poliproteínas e pode aumentar significativamente o rendimento de polipeptídeos comandados por um único promotor.

[000267] Os vetores utilizados na transformação irão geralmente conter um marcador selecionável utilizado para identificar transformantes. Em sistemas bacterianos, isto pode incluir um gene de resistência a antibióticos como ampicilina ou canamicina. Os marcadores selecionáveis para utilização em células de mamíferos cultivadas incluem genes que conferem resistência a drogas, como neomicina, higromicina, e metotrexato. O marcador selecionável pode ser um marcador selecionável amplificável. Um marcador selecionável amplificável é o gene

da dihidrofolato redutase (DHFR). Simonsen C C et al. (1983) Proc Natl Acad Sei USA 80: 2495-9. Os marcadores selecionáveis são revistos por Thilly (1986) Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass., e a escolha dos marcadores selecionáveis está dentro do nível dos especialistas na técnica.

[000268] Os marcadores selecionáveis podem ser introduzidos na célula em um plasmídeo separado ao mesmo tempo que o gene de interesse, ou podem ser introduzidos no mesmo plasmídeo. Se no mesmo plasmídeo, o marcador selecionável e o gene de interesse podem estar sob o controle de promotores diferentes ou do mesmo promotor, produzindo o último arranjo uma mensagem dicistrônica. Constructos deste tipo são conhecidos na técnica (por exemplo, US Pat. N.º 4.713.339).

[000269] Os vetores de expressão podem codificar para tags que permitam a fácil purificação da proteína produzida de forma recombinante. Exemplos incluem, entre outros, vetor pUR278 (Ruther et al (1983) EMBO J. 2: 1791), em que as sequências de codificação para a proteína a ser expressa podem ser ligadas no vetor na região com a região de codificação de lac z de modo a que uma proteína de fusão taggeada é produzida; vetores pGEX podem ser utilizados para expressar as proteínas da invenção com uma tag de glutathione-S-transferase (GST). Estas proteínas são geralmente solúveis e podem ser facilmente purificadas a partir de células através de adsorção em esferas de glutathione-agarose seguido por eluição na presença de glutathione livre. Os vetores incluem sítios de clivagem (trombina ou Fator Xa protease ou PRESSION PROTEASE™ (Pharmacia, Peapack, NJ)) para facilitar a remoção da tag após purificação.

[000270] O vetor de expressão ou vetores são então transfectados ou co-transfectados para uma célula-alvo apropriada, que irá expressar os polipeptídeos. Técnicas de transfecção conhecidos na técnica

incluem, entre outras, precipitação com fosfato de cálcio (Wigler et al., (1978) Cell. 14: 725), eletroporação (Neumann et al (1982) EMBO J. 1: 841), e reagentes à base de lipossoma. Uma variedade de sistemas de vetor de expressão em hospedeiro pode ser utilizada para expressar as proteínas aqui descritas, incluindo as células procarióticas e eucarióticas. Estas incluem, entre outras, micro-organismos como bactérias (por exemplo, *E. coli*) transformadas com DNA de bacteriófago recombinante ou vetores de expressão de DNA de plasmídeo contendo uma sequência de codificação apropriada; leveduras ou fungos filamentosos transformadas com vetores de expressão de levedura ou fungos recombinantes contendo uma sequência de codificação apropriada; sistemas de células de insetos infectados com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, baculovírus) contendo uma sequência de codificação apropriada; sistemas de células vegetais infectadas com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor ou o vírus do mosaico do tabaco) ou transformadas com vetores de expressão de plasmídeo recombinantes (por exemplo, plasmídeo Ti) contendo uma sequência de codificação apropriada; ou sistemas de células animais, incluindo células de mamíferos (por exemplo, células HEK 293, CHO, COS, HeLa, HKB11, e BHK).

[000271] Em uma modalidade, a célula hospedeira é uma célula eucariótica. Como aqui utilizado, uma célula eucariótica refere-se a qualquer célula animal ou planta tendo um núcleo definitivo. As células eucarióticas incluem células de animais de vertebrados, por exemplo, mamíferos e células de invertebrados, por exemplo, insetos. As células eucarióticas de plantas especificamente podem incluir, sem limitação, células de levedura. Uma célula eucariótica é distinta de uma célula procariótica, por exemplo, bactérias.

[000272] Em certas modalidades, a célula eucariótica é uma célula



de mamífero. Uma célula de mamífero é qualquer célula derivada de um mamífero. As células de mamífero incluem especificamente, entre outras, linhagens celulares de mamíferos. Em uma modalidade, a célula de mamífero é uma célula humana. Em outra modalidade, a célula de mamífero é uma célula HEK 293, que é uma linhagem celular de rim embrionário humano. Células HEK 293 estão disponíveis como CRL-1533 da American Type Culture Collection Manassas, VA, e como células H-293, N.º de Catálogo 11631-017 ou células 293-F, N.º de Catálogo 11625-019 de Invitrogen (Carlsbad, Calif.). Em algumas modalidades, a célula de mamífero é uma célula PER.C6®, que é uma linhagem celular humana derivada da retina. Células PER.C6® estão disponíveis a partir de Crucell (Leiden, Holanda). Em outras modalidades, a célula de mamífero é uma célula de ovário de hamster chinês (CHO). As células CHO são disponíveis a partir de American Type Culture Collection Manassas, VA. (por exemplo, CHO-K1; CCL-61). Em ainda outras modalidades, a célula de mamífero é uma célula de rim de hamster bebê (BHK). As células BHK estão disponíveis a partir de American Type Culture Collection Manassas, Va. (por exemplo, CRL-1632). Em algumas modalidades, a célula de mamífero é uma célula HKB11, que é uma linhagem celular híbridas de uma célula HEK293, e uma linhagem celular B humana. Mei et al., Mol. Biotechnol. 34 (2): 165-78 (2006).

[000273] Em uma modalidade, um plasmídeo incluindo uma sequência de codificação de fusão FVIII (X)-Fc, uma sequência de codificação de fusão fragmento VWF-L-Fc, ou ambas, e um marcador selecionável, por exemplo, resistência à zeocina, são transfectados para células HEK 293, para a produção de uma proteína quimérica.

[000274] Em outra modalidade, um plasmídeo que inclui uma sequência de codificação de fusão FVIII-Fc, uma sequência de codificação de fusão de fragmento de VWF-XTEN-L-Fc, ou ambas, e um mar-

cador selecionável, por exemplo, resistência à zeocina, são transfectados para células HEK 293, para a produção de uma proteína quimérica.

[000275] Em outras modalidades, um plasmídeo incluindo uma sequência de codificação de fusão de FVIII (X)-Fc, uma sequência de codificação de Fc, ou ambas, e um marcador selecionável, por exemplo, resistência à zeocina, são transfectados para células HEK 293, para a produção de uma proteína quimérica.

[000276] Em algumas modalidades, um primeiro plasmídeo, incluindo uma sequência de codificação de fusão de FVIII (X)-Fc e um primeiro marcador selecionável, por exemplo, um gene de resistência à zeocina, e um segundo plasmídeo que inclui uma sequência de codificação de Fc ou uma sequência de codificação de fragmento VWF-L-Fc e um segundo marcador selecionável, por exemplo, um gene de resistência à neomicina, e um terceiro plasmídeo que inclui uma sequência de codificação de proteína convertase e um terceiro marcador selecionável, por exemplo, um gene de resistência à higromicina, são co-transfectados em células HEK 293, para a produção do proteína quimérica. Os primeiro e segundo plasmídeos podem ser introduzidos em quantidades iguais (ou seja, razão molar 1:1), ou eles podem ser introduzidos em quantidades desiguais.

[000277] Em ainda outras modalidades, um primeiro plasmídeo que inclui uma sequência de codificação de fusão de FVIII-Fc e um primeiro marcador selecionável, por exemplo, um gene de resistência à zeocina, e um segundo plasmídeo que inclui uma sequência que codifica um fragmento de VWF XTEN-L-Fc e um segundo marcador selecionável, por exemplo, um gene de resistência à neomicina, e um terceiro plasmídeo que inclui uma sequência de codificação de proteína convertase e um terceiro marcador selecionável, por exemplo, um gene de resistência à higromicina, são co-transfectados em células HEK 293,

para a produção da proteína quimérica. Os primeiro e segundo plasmídeos podem ser introduzidos em quantidades iguais (ou seja, razão molar 1: 1), ou podem ser introduzidos em quantidades desiguais.

[000278] Ainda em outras modalidades, um primeiro plasmídeo, incluindo uma sequência de codificação de fusão fator VIII (X)-Fc e um primeiro marcador selecionável, por exemplo, um gene de resistência à zeocina, e um segundo plasmídeo que inclui uma sequência de codificação de fragmento VWF-XTEN-L-Fc e um segundo marcador selecionável, por exemplo, um gene de resistência à neomicina, e um terceiro plasmídeo que inclui uma sequência de codificação de proteína convertase e um terceiro marcador selecionável, por exemplo, um gene de resistência à higromicina, são co-transfectados em células HEK 293, para a produção da proteína quimérica. Os primeiro e segundo plasmídeos podem ser introduzidos em quantidades iguais (ou seja, razão molar 1:1), ou eles podem ser introduzidos em quantidades desiguais.

[000279] Em certas modalidades, um primeiro plasmídeo, incluindo uma sequência de codificação FVIII (com ou sem XTEN) -F1-L1-V-XTEN-L2-F2 que codifica a proteína quimérica e um primeiro marcador selecionável, por exemplo, um gene de resistência à zeocina, e um segundo plasmídeo que inclui uma sequência de codificação de proteína convertase e um segundo marcador selecionável, por exemplo, um gene de resistência à higromicina, são co-transfectados em células HEK 293, para a produção da proteína quimérica. Os promotores para a sequência de codificação FVIII (X)-Fc e a sequência de codificação de VWF-XTEN-Fc podem ser diferentes ou podem ser iguais.

[000280] Ainda em outras modalidades, as células transfectadas são estavelmente transfectadas. Estas células podem ser selecionadas e mantidas como uma linhagem celular estável, utilizando técnicas convencionais conhecidas dos especialistas na técnica.

[000281] As células hospedeiras que contêm constructos de DNA da proteína são cultivadas em um meio de crescimento apropriado. Como aqui utilizado, o termo "meio de crescimento adequado" significa um meio contendo nutrientes necessários para o crescimento das células. Nutrientes necessários para o crescimento celular podem incluir uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais, e fatores de crescimento. Opcionalmente, os meios podem conter um ou mais fatores de seleção. Opcionalmente, os meios podem conter soro fetal bovino ou soro fetal de bezerro (FCS). Em uma modalidade, os meios não contêm substancialmente nenhum IgG. O meio de crescimento irá, geralmente, selecionar as células que contêm o constructo de DNA por, por exemplo, seleção de drogas ou deficiência em um nutriente essencial que é complementado pelo marcador selecionável no constructo de DNA ou co-transfectado com o constructo de DNA. As células de mamífero de cultura são geralmente cultivadas em meio comercialmente disponíveis contendo soro ou isento de soro (por exemplo, meio MEM, DMEM, DMEM/F12). Em uma modalidade, o meio é CD293 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Em outra modalidade, o meio é CD17 (Invitrogen, Carlsbad, CA). A seleção de um meio apropriado para a linhagem celular particular utilizada está dentro do nível de habilidade dos especialistas na técnica.

[000282] A fim de co-expressar as duas cadeias de polipeptídeos da proteína quimérica, as células hospedeiras são cultivadas sob condições que permitem a expressão de ambas as cadeias. Como aqui utilizado, cultivar refere-se à manutenção da cultura de células vivas *in vitro* durante, pelo menos um tempo definido. A manutenção pode, mas não precisa incluir, um aumento na população de células vivas. Por exemplo, as células mantidas em cultura podem ser estáticas da população, mas ainda viável e capaz de produzir um produto desejado, por exemplo, uma proteína recombinante ou uma proteína de fu-

são recombinante. As condições adequadas para a cultura de células eucarióticas são bem conhecidas na técnica e incluem a seleção adequada dos meios de cultura, suplementos do meio, temperatura, pH, saturação de oxigênio, e outros semelhantes. Para fins comerciais, a cultura pode incluir a utilização de qualquer dos vários tipos de sistemas de aumento de escala, incluindo frascos de agitação, frascos rotantes, biorreatores de fibras ocas, biorreatores de tanque agitado, biorreatores de transporte aéreo, biorreatores Wave, e outros.

[000283] As condições de cultura celular são também selecionadas para permitir associação do fragmento de VWF com a proteína FVIII. As condições que permitem a expressão do fragmento de VWF e/ou a proteína FVIII podem incluir a presença de uma fonte de vitamina K. Por exemplo, em uma modalidade, células HEK 293 transfectadas de forma estável são cultivadas em meios CD293 (Invitrogen, Carlsbad, CA) ou meios OptiCHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementados com glutamina 4 mM.

[000284] Em um aspecto, a presente invenção é dirigida a um método de expressão, preparação, ou a produção da proteína quimérica da invenção que compreende: a) transfecção de uma célula hospedeira compreendendo um polinucleotídeo que codifica a proteína quimérica e b) cultivar a célula hospedeira em um meio de cultura sob condições adequadas para a expressão da proteína quimérica, em que a proteína quimérica é expressa.

[000285] De acordo com outras modalidades, o produto de proteínas contendo o fragmento de VWF ligado a uma sequência XTEN ou a proteína FVIII ligada a uma sequência XTEN é secretado para o meio. O meio é separado das células, concentrado se, filtrado, e então passado sobre duas ou três colunas de afinidade, por exemplo, uma coluna de proteína A e uma ou duas colunas de troca aniônica.

[000286] Em certos aspectos, a presente invenção refere-se à prote-

ína quimérica produzida pelos métodos aqui descritos.

[000287] A produção *in vitro* permite o aumento de escala para se obter grandes quantidades dos polipeptídeos alterados desejados da invenção. Técnicas para o cultivo de células de mamíferos sob condições de cultura de tecido são conhecidas na técnica e incluem cultura em suspensão homogênea, por exemplo, em um reator *airlift* ou em um reator de agitação contínua ou cultura de células imobilizadas ou aprisionadas, por exemplo, em fibras ocas, microcápsulas, em microesferas de agarose ou cartuchos de cerâmica. Se necessário e/ou desejado, as soluções de polipeptídeos podem ser purificadas pelos métodos de cromatografia habituais, por exemplo filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica (HIC, cromatografia em DEAE-celulose ou cromatografia de afinidade).

#### COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

[000288] As composições que contêm a proteína quimérica da presente invenção podem conter um veículo farmacêuticamente aceitável adequado. Por exemplo, podem conter excipientes e/ou auxiliares que facilitam o processamento dos compostos ativos em preparações concebidas para liberação no local de ação.

[000289] A composição farmacêutica pode ser formulada para administração parenteral (isto é, intravenosa, subcutânea, ou intramuscular) por injeção de bolus. As formulações para injeção podem ser apresentadas em forma de unidade de dosagem, por exemplo, em ampolas ou em recipientes multidose com um conservante adicionado. As composições podem tomar formas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e conter agentes de formulação, como suspensão, estabilizantes e/ou dispersantes. Alternativamente, o ingrediente ativo pode estar na forma de pó para constituição com um veículo adequado, por exemplo, água isenta de pirogênios.

[000290] As formulações adequadas para administração parenteral

incluem soluções aquosas dos compostos ativos em forma solúvel em água, por exemplo, sais solúveis em água. Além disso, as suspensões dos compostos ativos como suspensões de injeção oleosas apropriadas podem ser administradas. Os solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos graxos, por exemplo, óleo de sésamo, ou ésteres de ácidos graxos sintéticos, por exemplo, oleato de etilo ou triglicerídeos. As suspensões aquosas para injeção podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, incluindo, por exemplo, carboximetil celulose de sódio, sorbitol e dextrano. Opcionalmente, a suspensão pode também conter estabilizantes. Os lipossomas podem também ser utilizados para encapsular as moléculas da presente invenção para liberação em células ou espaços intersticiais. Carreadores farmacologicamente aceitáveis exemplificativos são fisiologicamente compatíveis com solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardamento da absorção, água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, dextrose, glicerol, etanol e semelhantes. Em algumas modalidades, a composição compreende agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoois como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio. Em outras modalidades, as composições contêm substâncias farmacologicamente aceitáveis, como agentes molhantes ou quantidades menores de substâncias auxiliares como agentes molhantes ou emulsionantes, conservantes ou tampões, que aumentam a vida de prateleira ou a eficácia dos ingredientes ativos.

[000291] As composições da invenção podem estar em uma variedade de formas, incluindo, por exemplo, líquido (por exemplo, soluções injetáveis e administráveis por infusão), dispersões, suspensões, formas de dosagem semissólidas ou sólidas. A forma preferencial depende do modo de administração e da aplicação terapêutica.

[000292] A composição pode ser formulada como uma solução, mi-

croemulsão, dispersão, lipossomas ou outra estrutura ordenada adequada para concentração de droga elevada. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas por incorporação do ingrediente ativo na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, como requerido, seguido de esterilização por filtração. Geralmente, as dispersões são preparadas por incorporação do ingrediente ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários a partir daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são a secagem por vácuo e liofilização que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução do mesmo previamente esterilizada por filtração. A fluidez adequada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pela utilização de surfactantes. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que atrasa a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

[000293] O ingrediente ativo pode ser formulado com uma formulação de liberação controlada ou dispositivo. Exemplos de tais formulações e dispositivos incluem implantes, adesivos transdérmicos e sistemas de liberação microencapsulados. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser utilizados, por exemplo, acetato de vinil etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Os métodos para a preparação de tais formulações e dispositivos são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[000294] As formulações de depósito injetáveis podem ser prepara-



das por formação de matrizes microencapsuladas da droga em polímeros biodegradáveis como polilactida-poliglicolida. Dependendo da proporção de droga para polímero e da natureza do polímero empregue, a velocidade de liberação da droga pode ser controlada. Outros polímeros biodegradáveis exemplares são poliortoésteres e polianidridos. As formulações injetáveis de depósito também podem ser preparadas aprisionando a droga em lipossomas ou microemulsões.

[000295] Os compostos ativos suplementares podem ser incorporados nas composições. Em uma modalidade, a proteína quimérica da invenção é formulado com outro fator de coagulação, ou variante, fragmento, análogo, ou derivado da mesma. Por exemplo, o fator de coagulação inclui, entre outros, o fator V, fator VII, fator VIII, fator IX, fator X, fator XI, fator XII, fator XIII, protrombina, fibrinogênio, fator de von Willebrand ou fator tecidual recombinante solúvel (rsTF) ou formas ativadas de qualquer um dos anteriores. O fator de coagulação do agente hemostático também pode incluir medicamentos antifibrinolíticos, por exemplo, ácido epsilon-amino-caproico, ácido tranexâmico.

[000296] Os regimes de dosagem podem ser ajustados para proporcionar a resposta desejada ideal. Por exemplo, um único bolus pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo, ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É vantajoso formular composições parenterais em forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, Pa. 1980).

[000297] Em adição ao composto ativo, a forma de dosagem líquida podem conter ingredientes inertes, como água, álcool etílico, carbonato de etilo, acetato de etila, álcool benzílico, benzoato de benzila, propilenoglicol, 1,3-butilenoglicol, dimetilformamida, óleos, glicerol, álcool

tetra-hidrofurfurílico, polietilenoglicóis, e ésteres de ácidos graxos de sorbitano.

[000298] Exemplos não limitantes de veículos farmacêuticos adequados estão também descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences por E.W. Martin. Alguns exemplos de excipientes incluem amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, gel de sílica, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado seco, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e semelhantes. A composição também pode conter reagentes tampobantes de pH, e agentes molhantes ou emulsionantes.

[000299] Para a administração oral, a composição farmacêutica pode tomar a forma de comprimidos ou cápsulas preparados por meios convencionais. A composição também pode ser preparada como um líquido, por exemplo, um xarope ou uma suspensão. O líquido pode conter agentes de suspensão (por exemplo, xarope de sorbitol, derivados de celulose ou gorduras comestíveis hidrogenadas), agentes emulsionantes (lecitina ou acácia), veículos não aquosos (por exemplo, óleo de amêndoa, ésteres oleosos, álcool etílico ou óleos vegetais fracionados), e conservantes (por exemplo, metil ou propil-p-hidroxibenzoatos ou ácido sórbico). As preparações também podem incluir aromatizantes, corantes e agentes edulcorantes. Alternativamente, a composição pode ser apresentada como um produto seco para constituição com água ou outro veículo adequado.

[000300] Para a administração bucal, a composição pode tomar a forma de comprimidos ou pastilhas de acordo com protocolos convencionais.

[000301] Para administração por inalação, os compostos para utilização de acordo com a presente invenção são convenientemente administrados sob a forma de um aerossol nebulizado, com ou sem excipientes ou sob a forma de um pulverizador de aerossol a partir de uma

embalagem pressurizada ou nebulizador, com opcionalmente um propulsor, por exemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado a unidade de dosagem pode ser determinada proporcionando uma válvula para entregar uma quantidade medida. As cápsulas e cartuchos de, por exemplo, gelatina para uso em um inalador ou insuflador podem ser formulados contendo uma mistura em pó do composto e uma base em pó adequada como lactose ou amido.

[000302] A composição farmacêutica pode também ser formulada para administração como um supositório ou enema de retenção, por exemplo, contendo bases de supositório convencionais como manteiga de cacau ou outros glicerídeos.

[000303] Em uma modalidade, uma composição farmacêutica compreende uma proteína quimérica, o polinucleotídeo que codifica a proteína quimérica, o vetor que compreende o polinucleotídeo, ou a célula hospedeira que compreende o vetor, e um veículo farmacêuticamente aceitável. A proteína FVIII em uma proteína quimérica aumentou a meia-vida em comparação com tipo selvagem proteína FVIII ou de proteína FVIII correspondente sem o fragmento de VWF. Em uma modalidade, em que a meia-vida da proteína FVIII é estendida pelo menos cerca de 1,5 vezes, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 2,5 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 6 vezes, pelo menos cerca de 7 vezes, pelo menos cerca de 8 vezes, pelo menos cerca de 9 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 11 vezes, ou pelo menos cerca de 12 vezes maior do que o FVIII de tipo selvagem. Em outra modalidade, a meia-vida do Fator VIII é de pelo menos cerca de 17 horas, pelo menos cerca de 18 horas, pelo menos cerca de 19 horas, pelo menos cerca de 20 horas, pelo menos

cerca de 21 horas, pelo menos cerca de 22 horas, pelo menos cerca de 23 horas, pelo menos cerca de 24 horas, pelo menos cerca de 25 horas, pelo menos cerca de 26 horas, pelo menos cerca de 27 horas, pelo menos cerca de 28 horas, pelo menos cerca de 29 horas, pelo menos cerca de 30 horas, pelo menos cerca de 31 horas, pelo menos cerca de 32 horas, pelo menos cerca de 33 horas, pelo menos cerca de 34 horas, pelo menos cerca de 35 horas, pelo menos cerca de 36 horas, pelo menos cerca de 48 horas, pelo menos cerca de 60 horas, pelo menos cerca de 72 horas, pelo menos cerca de 84 horas, pelo menos cerca de 96 horas, ou pelo menos cerca de 108 horas.

[000304] Em algumas modalidades, a composição é administrada por uma via selecionada a partir do grupo consistindo de administração tópica, a administração intraocular, administração parenteral, administração intratecal, administração subdural e administração oral. A administração parenteral pode ser a administração intravenosa ou subcutânea.

[000305] Em outras modalidades, a composição é utilizada para tratar uma doença ou condição de sangramento em um sujeito com essa necessidade. A doença de hemorragia ou condição é selecionada a partir do grupo consistindo de um distúrbio da coagulação do sangramento, hemartrose, sangramento nos músculos, sangramento oral, hemorragia, hemorragia nos músculos, hemorragia oral, trauma, trauma capitis, sangramento gastrointestinal, hemorragia intracraniana, hemorragia intra-abdominal, hemorragia intratorácica, fratura óssea, sangramento do sistema nervoso central, sangramento no espaço retrofaríngeo, sangramento no espaço retroperitoneal, sangramento na bainha ileopsoas e quaisquer combinações destes. Em ainda outras modalidades, o sujeito está sendo submetido a uma cirurgia. Em ainda outras modalidades, o tratamento é profilático ou sob demanda.

### TERAPIA GENÉTICA

[000306] Uma proteína quimérica da mesma da invenção pode ser produzida in vivo em um mamífero, por exemplo, um paciente humano, usando uma abordagem de terapia gênica para o tratamento de uma doença ou distúrbio selecionado de sangramento a partir do grupo consistindo de um distúrbio da coagulação do sangramento, hemartrose, sangramento muscular, sangramento oral, hemorragia, hemorragia nos músculos, hemorragia oral, trauma, trauma capitis, sangramento gastrointestinal, hemorragia intracraniana, hemorragia intra-abdominal, hemorragia intratorácica, fratura óssea, sangramento do sistema nervoso central, sangramento no espaço retrofaríngeo, sangramento no espaço retroperitoneal, e sangramento na bainha ileopsoas seria terapeuticamente benéfica. Em uma modalidade, a doença ou distúrbio de sangramento é hemofilia. Em outra modalidade, a doença ou distúrbio de sangramento é hemofilia A. Este envolve a administração de um ácido nucleico adequado que codifica a proteína quimérica operativamente ligada às sequências de controle de expressão adequadas. Em certas modalidades, estas sequências são incorporadas em um vetor viral. Os vetores virais adequados para uma dita terapia de gene incluem vetores adenovirais, vetores lentivirais, vetores de baculovírus, vetores virais de vírus de Epstein Barr, vetores de vaccínia papovaviral, vetores virais de herpes simplex, vetores virais, e vírus adenoassociados (AAV). O vetor viral pode ser um vetor viral defeituoso para a replicação. Em outras modalidades, um vetor adenoviral possui uma deleção no seu gene E1 ou gene E3. Quando um vetor adenoviral é usado, o mamífero não pode ser exposto a um ácido nucleico que codifica um gene marcador selecionável. Em outras modalidades, as sequências são incorporadas em um vetor não viral conhecido dos especialistas na técnica.

#### MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNA QUIMÉRICA

[000307] A presente invenção é dirigida a um método de utilização

de uma proteína quimérica aqui descrita para prevenir ou inibir o VWF endógeno com uma proteína de ligação de FVIII. A presente invenção é também dirigida para um método de utilização de uma proteína quimérica que possui uma proteína FVIII ligada a XTEN e uma região constante de Ig ou de uma fração da mesma.

[000308] Um aspecto da presente invenção é dirigido para prevenir ou inibir a interação de FVIII com VWF endógeno através do bloqueio ou protegendo o sítio de ligação de VWF no FVIII de VWF endógeno e, ao mesmo tempo estendendo a meia-vida da proteína FVIII utilizando uma sequência XTEN em combinação com uma região constante de Ig ou de uma fração da mesma, que também pode ser um extensor de meia-vida. Em uma modalidade, a invenção é dirigida a um método de produção de uma proteína FVIII possuindo meia-vida mais longa do que o FVIII de tipo selvagem. Em uma modalidade, uma sequência de XTEN inibe ou impede a interação de uma proteína FVIII em uma proteína quimérica com VWF endógeno. Em outra modalidade, uma região constante de Ig ou uma fração da mesma inibe ou previne a interação da proteína FVIII com VWF endógeno. A proteína quimérica útil no método inclui qualquer uma ou mais proteínas quiméricas aqui descritas.

[000309] Outro aspecto da invenção inclui um método de administração a um sujeito em necessidade do mesmo de uma proteína quimérica compreendendo uma proteína FVIII possuindo meia-vida mais longa do que o FVIII de tipo selvagem, em que o método compreende a administração da proteína quimérica aqui descrita para o sujeito.

[000310] Em uma modalidade, a invenção é dirigida a um método de utilização de uma sequência de XTEN e uma região constante de Ig ou uma fração da mesma para estender a meia-vida de uma proteína FVIII e um fragmento VWF para evitar ou inibir a interação de VWF endógeno com uma proteína FVIII. Uma proteína FVIII ligada a uma sequência XTEN (por exemplo, o FVIII (X)) e, em seguida, ligada a ou

associada com um fragmento de VWF é impedida ou protegida da via de eliminação de VWF e, portanto, tem uma eliminação reduzida comparada com a proteína FVIII não ligada ao fragmento de VWF. A proteína FVIII blindado tem, assim, a extensão máxima de uma meia-vida, em comparação com uma proteína FVIII não ligada ou associada com a sequência XTEN e o fragmento de VWF. Em certas modalidades, a proteína FVIII associada com ou protegida por um fragmento de VWF e ligada a uma sequência XTEN não é eliminada por um receptor de eliminação de VWF. Em outras modalidades, a proteína FVIII associada com ou protegido por um fragmento de VWF e ligada a uma sequência XTEN é eliminada do sistema mais lentamente do que a proteína FVIII que não está associada ou protegida pelo fragmento de VWF e ligada à sequência de XTEN.

[000311] Em um aspecto, a proteína quimérica compreendendo a proteína FVIII ligada a uma sequência XTEN ou a proteína FVIII ligada ou associada com um fragmento de VWF ligado a XTEN reduziu a eliminação da circulação como o fragmento de VWF não contém um sítio de ligação ao receptor de eliminação de VWF. O fragmento de VWF impede ou inibe a eliminação de FVIII ligado ou associado com o fragmento de VWF a partir do sistema através da via de eliminação de VWF. Os fragmentos de VWF úteis para a presente invenção também podem proporcionar, pelo menos uma ou mais propriedades de proteção de FVIII tipo VWF que são fornecidas pelo VWF endógeno. Em certas modalidades, o fragmento de VWF ou a sequência XTEN também pode mascarar um ou mais sítio de ligação ao receptor de eliminação de FVIII, impedindo assim a eliminação do FVIII pela sua própria via de eliminação.

[000312] Em algumas modalidades, a prevenção ou inibição de uma ligação de VWF endógeno pelo fragmento de VWF ou a sequência de proteína FVIII XTEN pode ser *in vitro* ou *in vivo*.

[000313] É também proporcionado um método para aumentar a meia-vida de uma proteína FVIII, compreendendo a administração da proteína quimérica aqui descrita a um sujeito em necessidade do mesmo. A meia-vida do FVIII não ativado ligado ou associado com VWF de comprimento completo é cerca de 12 a 14 horas no plasma. Em VWD tipo 3, em que não há quase nenhum VWF em circulação, a meia-vida do FVIII é apenas cerca de seis horas levando aos sintomas de ligeira a moderada hemofilia A em tais pacientes, devido à diminuição das concentrações de FVIII. A meia-vida da proteína FVIII ligada ou associada com o fragmento de VWF ou a sequência XTEN da presente invenção pode aumentar, pelo menos cerca de 1,5 vezes, 1,6 vezes, 1,7 vezes, 1,8 vezes, 1,9 vezes, 2,0 vezes, 2,1 vezes, 2,2 vezes, 2,3 vezes, 2,4 vezes, 2,6 vezes, 2,7. vezes, 2,8 vezes, 2,9 vezes, 3,0 vezes, 3,1 vezes, 3,2 vezes, 3,3 vezes, 3,4 vezes, 3,5 vezes, 3,6 vezes, 3,7 vezes, 3,8 vezes, 3,9 vezes, ou 4,0 vezes mais do que a meia-vida de FVIII não ativado ligado ou associado a VWF de comprimento completo.

[000314] Em uma modalidade, a meia-vida da proteína FVIII ligada ou associada com o fragmento de VWF ou ligado a uma região constante de Ig ou uma fração da mesma na proteína quimérica compreendendo uma sequência de XTEN aumenta pelo menos cerca de 2 vezes, com 2,5 vezes, 3,0 vezes, 3,5 vezes, 4,0 vezes, 4,5 vezes, 5,0 vezes, 5,5 vezes, 6,0 vezes, 7 vezes, oito vezes, 9 vezes, ou 10 vezes mais do que a meia-vida do FVIII não ativado ligado a ou associado com de VWF de comprimento completo. Em outra modalidade, a meia-vida da proteína FVIII ligada ou associada com o fragmento de VWF ou uma região constante de Ig ou uma fração da mesma na proteína quimérica compreendendo uma sequência de XTEN aumenta cerca de 2 a cerca de 5 vezes, cerca de 3 a cerca de 10 vezes, cerca de 5 a cerca de 15 vezes, cerca de 10 a cerca de 20 vezes, cerca de 15 a



cerca de 25 vezes, cerca de 20 a cerca de 30 vezes, cerca de 25 a cerca de 35 vezes, cerca de 30 a cerca de 40 vezes, cerca de 35 a cerca de 45 vezes mais elevada do que a meia-vida do FVIII não ativado ligado ou associado com VWF de comprimento total ou FVIII tipo selvagem. Em uma modalidade específica, a meia-vida da proteína FVIII ligada ou associada com o fragmento de VWF ou ligada a uma região constante de Ig na proteína quimérica compreendendo uma sequência de XTEN aumentada em pelo menos cerca de 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, ou 40 vezes mais do que a meia-vida do FVIII tipo selvagem em um camundongo knock-out duplo de FVIII e VWF.

[000315] Em algumas modalidades, a meia-vida da proteína quimérica que compreende o fragmento de VWF fundido com uma primeira região constante de Ig ou uma fração da mesma, por exemplo, uma primeira região Fc e uma sequência XTEN, e uma proteína FVIII ligada a uma XTEN e uma segunda sequência de região constante de Ig ou de uma fração da mesma, por exemplo, uma segunda região Fc, é mais longa do que a meia-vida de um FVIII associado com VWF endógeno. Em outras modalidades, a meia-vida da proteína quimérica é, pelo menos cerca de 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3,5 vezes, 3,6 vezes, 3,7 vezes, 3,8 vezes, 3,9 vezes, 4,0 vezes, 4,5 vezes, ou 5,0 vezes a meia-vida do FVIII de tipo selvagem ou uma proteína FVIII associada com VWF endógeno.

[000316] Em algumas modalidades, como um resultado da invenção, a meia-vida da proteína FVIII é expandida em comparação com uma proteína FVIII sem fragmento VWF ou FVIII de tipo selvagem. A meia-vida da proteína quimérica da invenção é pelo menos cerca de 1,5 vezes, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 2,5 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 6 vezes, pelo menos cerca de 7 vezes, pelo menos cerca de 8 vezes, pelo menos cerca de 9 ve-

zes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 11 vezes, ou pelo menos cerca de 12 vezes mais do que meia-vida de uma proteína FVIII sem fragmento VWF ou FVIII de tipo selvagem. Em uma modalidade, a meia-vida do FVIII é cerca de 1,5 vezes a cerca de 20 vezes, cerca de 1,5 vezes a cerca de 15 vezes, ou cerca de 1,5 vezes a cerca de 10 vezes mais longa do que a meia-vida do FVIII de tipo selvagem. Em outra modalidade, a meia-vida do FVIII é estendida em cerca de 2 vezes a cerca de 10 vezes, cerca de 2 vezes a cerca de 9 vezes, a cerca de 2 vezes a cerca de 8 vezes, de cerca de 2 vezes a cerca de 7 vezes, cerca de 2 vezes a cerca de 6 vezes, de cerca de 2 vezes a cerca de 5 vezes, cerca de 2 vezes a cerca de 4 vezes, cerca de 2 vezes a cerca de 3 vezes, cerca de 2,5 vezes a cerca de 10 vezes, cerca de 2,5 vezes a cerca de 9 vezes, cerca de 2,5 vezes a cerca de 8 vezes, cerca de 2,5 vezes a cerca de 7 vezes, cerca de 2,5 vezes a cerca de 6 vezes, cerca de 2,5 vezes a cerca de 5 vezes, cerca de 2,5 vezes a cerca de 4 vezes, cerca de 2,5 vezes a cerca de 3 vezes, cerca de 3 vezes a cerca de 10 vezes, cerca de 3 vezes a cerca de 9 vezes, cerca de 3 vezes a cerca de 8 vezes, cerca de 3 vezes a cerca de 7 vezes, cerca de 3 vezes a cerca de 6 vezes, cerca de 3 vezes a cerca de 5 vezes, cerca de 3 vezes a cerca de 4 vezes, cerca de 4 vezes a cerca de 6 vezes, cerca de 5 vezes a cerca de 7 vezes, ou cerca de 6 vezes a cerca de 8 vezes em comparação com FVIII de tipo selvagem ou uma proteína FVIII, sem o fragmento de VWF. Em outras modalidades, a meia-vida da proteína quimérica da invenção é pelo menos cerca de 17 horas, pelo menos cerca de 18 horas, pelo menos cerca de 19 horas, pelo menos cerca de 20 horas, pelo menos cerca de 21 horas, pelo menos cerca de 22 horas, pelo menos cerca de 23 horas, pelo menos cerca de 24 horas, pelo menos cerca de 25 horas, pelo menos cerca de 26 horas, pelo menos cerca de 27 horas, pelo menos cerca de 28 horas, pelo menos cerca de 29 horas, pelo menos

cerca de 30 horas, pelo menos cerca de 31 horas, pelo menos cerca de 32 horas, pelo menos cerca de 33 horas, pelo menos cerca de 34 horas, pelo menos cerca de 35 horas, pelo menos cerca de 36 horas, pelo menos cerca de 48 horas, pelo menos cerca de 60 horas, pelo menos cerca de 72 horas, pelo menos cerca de 84 horas, pelo menos cerca de 96 horas, ou pelo menos cerca de 108 horas. Em ainda outras modalidades, a meia-vida da proteína quimérica da invenção é cerca de 15 horas a cerca de duas semanas, cerca de 16 horas a cerca de uma semana, cerca de 17 horas a cerca de uma semana, cerca de 18 horas a cerca de uma semana, cerca de 19 horas a cerca de uma semana, cerca de 20 horas a cerca de uma semana, cerca de 21 horas a cerca de uma semana, cerca de 22 horas a cerca de uma semana, cerca de 23 horas a cerca de uma semana, cerca de 24 horas a cerca de uma semana, cerca de 36 horas a cerca de uma semana, cerca de 48 horas a cerca de uma semana, cerca de 60 horas a cerca de uma semana, cerca de 24 horas para cerca de seis dias, cerca de 24 horas a cerca de cinco dias, cerca de 24 horas a cerca de quatro dias, cerca de 24 horas a cerca de três dias, ou cerca de 24 horas a cerca de dois dias.

[000317] Em algumas modalidades, a meia-vida média da proteína quimérica da invenção por sujeito é cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, cerca de 19 horas, cerca de 20 horas, cerca de 21 horas, cerca de 22 horas, cerca de 23 horas, cerca de 24 horas (1 dia), cerca de 25 horas, cerca de 26 horas, cerca de 27 horas, cerca de 28 horas, cerca de 29 horas, cerca de 30 horas, cerca de 31 horas, cerca de 32 horas, cerca de 33 horas, cerca de 34 horas, cerca de 35 horas, cerca de 36 horas, cerca de 40 horas, cerca de 44 horas, cerca de 48 horas (2 dias), cerca de 54 horas, cerca de 60 horas, cerca de 72 horas (3 dias), cerca de 84 horas, cerca de 96 horas (4 dias), cerca de 108 horas, de cerca de 120 horas (5 dias),

cerca de seis dias, cerca de sete dias (uma semana), cerca de oito dias, cerca de nove dias, a cerca de 10 dias, cerca de 11 dias, cerca de 12 dias, cerca de 13 dias, ou cerca de 14 dias.

[000318] Além disso, a invenção proporciona um método de tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio de sangramento compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de uma proteína quimérica. Em uma modalidade, a doença de hemorragia ou distúrbio é selecionado a partir do grupo consistindo de um distúrbio da coagulação do sangramento, hemartrose, sangramento nos músculos, sangramento oral, hemorragia, hemorragia nos músculos, hemorragia oral, trauma, trauma capitis, sangramento gastrointestinal, hemorragia intracraniana, intra hemorragia -abdominal, hemorragia intratorácica, fratura óssea, sangramento do sistema nervoso central, sangramento no espaço retrofaríngeo, sangramento no espaço retroperitoneal, e sangramento na bainha ileopsoas. Em uma modalidade específica, a doença ou distúrbio é a hemorragia da hemofilia A.

[000319] A proteína quimérica compreendendo uma sequência de XTEN e uma região constante de Ig ou uma fração da mesma em combinação com um fragmento de VWF aqui descrito, que impede ou inibe a interação da proteína FVIII com VWF endógeno preparado pelo invenção, tem muitos usos como vontade ser reconhecido por um perito na técnica, incluindo, entre outras métodos de tratamento de um sujeito com um distúrbio hemostáticos e métodos de tratamento de um sujeito em necessidade de um agente hemostático geral. Em uma modalidade, a invenção refere-se a um método de tratamento de um sujeito tendo um distúrbio hemostático compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína quimérica.

[000320] A fração da proteína FVIII nos mimos de proteínas quiméricas trata ou impede um distúrbio hemostático servindo como um cofator para o Fator IX em uma superfície de fosfolípídeo carregada nega-

tivamente, formando assim um complexo Xase. A ligação de fatores de coagulação ativados a uma superfície fosfolipídica localiza este processo para os locais de lesão vascular. Sobre uma superfície de fosfolípídeo, o Fator VIIIa aumenta a velocidade máxima de ativação do Fator X pelo Fator IXa, por aproximadamente 200.000 vezes, o que leva ao grande segundo disparo da geração de trombina.

[000321] A proteína quimérica da invenção pode ser usada para tratar qualquer distúrbio hemostático. Os distúrbios hemostáticos que podem ser tratados por administração da proteína quimérica da invenção incluem, entre outros, hemofilia A, bem como deficiências ou anomalias estruturais, relativamente ao Fator VIII. Em uma modalidade, o distúrbio hemostático é hemofilia A.

[000322] A proteína quimérica da invenção pode ser utilizada profilaticamente para tratar um sujeito com um distúrbio hemostático. A proteína quimérica da invenção pode ser utilizada para tratar um episódio de sangramento agudo em um sujeito com um distúrbio hemostático. Em outra modalidade, o distúrbio hemostático pode ser o resultado de um fator de coagulação deficiente, por exemplo, o fator de von Willebrand. Em uma modalidade, o distúrbio hemostático é um distúrbio hereditário. Em outra modalidade, o distúrbio é um distúrbio hemostático adquirido. O distúrbio adquirido pode resultar de uma doença ou condição secundária subjacente. A condição pode ser relacionada, como um exemplo, mas não como uma limitação, câncer, uma doença autoimune, ou a gravidez. O distúrbio adquirido pode resultar de velhice ou de medicação para o tratamento de um distúrbio secundária subjacente (por exemplo, a quimioterapia do câncer).

[000323] A invenção também se refere a métodos de tratamento de um indivíduo que não tenha um distúrbio congênito hemostático, mas tem uma doença ou condição secundária resultando na aquisição de um distúrbio hemostático, por exemplo, devido ao desenvolvimento de

um anticorpo anti-FVIII ou uma cirurgia. A invenção refere-se assim a um método de tratamento de um sujeito em necessidade de um agente hemostático geral que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína quimérica preparada pelos presentes métodos.

[000324] A presente invenção também está relacionada com métodos para reduzir a imunogenicidade de FVIII ou induzindo menos imunogenicidade contra FVIII que compreende a administração de uma quantidade eficaz das proteínas quiméricas aqui descritas, ou os polinucleotídeos que codificam a mesma.

[000325] Em uma modalidade, o sujeito em necessidade de um agente hemostático geral está passando por, ou está prestes a passar por uma cirurgia. A proteína quimérica da invenção pode ser administrada antes de, durante, ou após a cirurgia como um regime profilático. A proteína quimérica da invenção pode ser administrada antes, durante, ou após a cirurgia para controlar um episódio de sangramento agudo.

[000326] A proteína quimérica da invenção pode ser utilizada para tratar um sujeito tendo um episódio de sangramento agudo que não tem um distúrbio hemostático. O episódio de sangramento agudo podem resultar de trauma grave, por exemplo, cirurgia, um acidente de automóvel, ferida, laceração por tiro da arma, ou qualquer outro acontecimento traumático, resultando em sangramento descontrolado. Exemplos não limitantes de episódios hemorrágicos incluem um distúrbio hemorrágico de coagulação, hemartrose, sangramento nos músculos, sangramento oral, hemorragia, hemorragia nos músculos, hemorragia oral, trauma, trauma capitis, sangramento gastrointestinal, hemorragia intracraniana, hemorragia intra-abdominal, hemorragia intratorácica, fratura óssea, hemorragia no sistema nervoso central, sangramento no espaço retrofaríngeo, hemorragia no espaço retroperitoneal, sangramento na bainha ileopsoas, e quaisquer combinações

destes.

[000327] Em aplicações profiláticas, uma ou mais composições contendo a proteína quimérica da invenção ou um coquetel da mesma são administradas a um paciente que ainda não está no estado de doença para aumentar a resistência do paciente ou reduzir os sintomas associados com uma doença ou distúrbio. Uma tal quantidade é definida como sendo uma "dose eficaz profilática." Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente elevada (por exemplo, de cerca de 1 a 400 mg/kg de polipeptídeo por dose, com dosagens de 5 e 25 mg sendo mais comumente utilizadas para conjugados de radioimunoensaio e doses mais elevadas para polipeptídeos modificados por citotoxina-drogas) em intervalos relativamente curtos por vezes é necessário até a progressão da doença ser reduzida ou terminada, e até que o paciente apresente melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Depois disso, o paciente pode ser administrado com um regime profilático.

[000328] Em algumas modalidades, uma proteína quimérica ou de uma composição da invenção é utilizada para o tratamento sob demanda, que inclui o tratamento de um episódio hemorrágico, hemartrose, sangramento nos músculos, sangramento oral, hemorragia, hemorragia nos músculos, hemorragia oral, trauma, capitis trauma (traumatismo craniano), sangramento gastrointestinal, hemorragia intracraniana, hemorragia intra-abdominal, hemorragia intratorácica, fratura óssea, sangramento do sistema nervoso central, sangramento no espaço retrofaríngeo, sangramento no espaço retroperitoneal, ou sangramento na bainha ileopsoas. O sujeito pode estar em necessidade de profilaxia cirúrgica, administração perioperatória, ou tratamento por cirurgia. Tais cirurgias incluem, por exemplo, uma pequena cirurgia, cirurgia de grande porte, extração dentária, amigdalectomia, herniotomia inguinal, sinovectomia, substituição total do joelho, craniotomia,

osteossíntese, a cirurgia de trauma, cirurgia intracraniana, a cirurgia intra-abdominal, cirurgia intratorácica, ou cirurgia de substituição da articulação.

[000329] Em uma modalidade, a proteína quimérica da presente invenção é administrada por via intravenosa, subcutânea, intramuscular, ou através de toda a superfície da mucosa, por exemplo, por via oral, sublingual, bucal, nasal, retal, vaginal ou por via pulmonar. A proteína quimérica que compreende um fragmento de VWF e FVIII uma proteína da presente invenção pode ser implantada dentro ou ligada a um suporte sólido de biopolímeros que permite a liberação lenta da proteína quimérica para o local do sangramento ou implantada na bandagem/curativo. A dose da proteína quimérica irá variar dependendo do sujeito e da via particular de administração utilizada. As dosagens podem variar de 0,1 a 100.000 g/kg de peso corporal. Em uma modalidade, o intervalo de dosagem é 0.1-1,000 µg/kg. Em outra modalidade, o intervalo de dosagem é de 0,1-500 µg/kg. A proteína pode ser administrada continuamente ou em intervalos de tempo específicos. Os ensaios *in vitro* podem ser empregues para determinar faixas de dose ideais e/ou horários de administração. Os ensaios *in vitro* que medem a atividade de fator de coagulação são conhecidos na técnica, por exemplo, ensaio de coagulação STA-CLOT VIIa-rTF ou ensaio de coagulação Rotem. Além disso, as doses eficazes podem ser extrapoladas a partir de curvas de dose-resposta obtidas a partir de modelos animais, por exemplo, um cão hemofílico (Mount et al., 2002, Blood 99(8):2670).

[000330] Tendo agora descrito a presente invenção em detalhes, a mesma será mais claramente compreendida por referência aos exemplos seguintes, que são incluídos em anexo para fins de ilustração apenas e não se destinam a ser limitantes da invenção. Todas as patentes, publicações, e os artigos aqui referidos são expressamente e aqui especificamente incorporados por referência.



Exemplos

[000331] Ao longo dos exemplos, os seguintes materiais e métodos foram utilizados a menos que indicado de outra forma.

Materiais e Métodos

[000332] Em geral, a prática da presente invenção emprega, a menos que indicado em contrário, técnicas convencionais de química, biofísica, biologia molecular, tecnologia de DNA recombinante, imunologia (especialmente, por exemplo, tecnologia de anticorpos), e técnicas padrão de eletroforese. Ver, por exemplo, Sambrook, Fritsch e Maniatis, *Molecular Cloning*: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); *Antibody Engineering Protocols* (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow *et al.*, CS.H.L. Press, Pub. (1999); e *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992).

Exemplo 1: clonagem de domínios diferentes de VWF (Figura 1)

(a) Clonagem de pSYN-VWF-002

[000333] pSYN-VWF-002 contém sequências de nucleotídeos que codificam um fragmento de VWF, que são aminoácidos 1-477 de SEQ ID NO: 100. [sequência da proteína VWF-D'D3]. A numeração dos aminoácidos representa a sequência madura sem VWF e propeptídeo corresponde aos aminoácidos 764-1240 da SEQ ID NO: 2. O construto pSYN-VWF 002 tem o peptídeo de sinal de FVIII no N-terminal, que permite a secreção adequada da proteína sintetizada e seguido por uma tag 6xHis em C-terminal, que é utilizada para a purificação de proteínas. Foi sintetizado utilizando combinações de iniciadores seguintes:

ESC48- Direto - VWF-D'D3 com sinal VIII e sítio BsiW1  
TCGCGACGTACGGCCGCCACCATGCAAATAGAG-

CTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAG-  
CCTATCCTGTCGGCCCCCATG (SEQ ID NO: 90)

ESC51- Rev- VWF D'D3 (1-477 aminoácido) com sítio 6His e Not 1 TGACCTCGAGCGGCCGCTCAGTGGTGATGGTGATGATGCGGCTCCTGGCAGGCTTCACAGGTGAGGTTGACAAC (SEQ ID NO: 91)

[000334] uma reação de PCR de 50 µL foi realizada com combinações de iniciadores ESC 48/ESC 51 e o plasmídeo completo comprimento de VWF como molde, utilizando a etapa 2 do ciclo de amplificação por PCR: 94°C 2 minutos; 21 ciclos de (96°C 30 segundos, 68°C 2 minutos). A banda 1460bp foi purificada em gel com um kit de extração de Gel (Qiagen, Valencia, Calif.) e clonada nos sítios de restrição Bsi-WI e Not1 de pcDNA 4 para gerar pSYN-VWF 002.

(b) Clonagem de pSYN-VWF- 010 e 013

[000335] pSYN-VWF-010 foi construído utilizando pSYN-VWF-008 e pSYN-VWF-002. pSYN-VWF-008 contém a sequência de VWF de comprimento completo em pcDNA 3.1 (aminoácidos 1-2813 da SEQ ID NO: 2), que inclui o propeptídeo de 763 aminoácidos (isto é, domínios D1D2) seguido por sequência de 2050 aminoácidos restantes de VWF maduro. O peptídeo de sinal de FVIII em pSYN-VWF-002 foi substituído por domínios D1D2 de pSYN-VWF-008, o constructo resultante é pSYN-VWF-010. pSYN VWF-008 tem um sítio BamH1 em Arg907 e sítio Not1 na extremidade da região de codificação (após o códon de parada). pSYN- VWF- 008 e 002 foram digeridos com enzimas de restrição BamH1 e Not1. Inserções de pSYN- VWF-002 (1026 pb) foram ligadas em pSYN-VWF- 008 (8242bp) digerido por BamH1/Not1 para obter pSYN-VWF -010 (D1D2D'D3: aminoácido 1-1240 da SEQ ID NO: 2), uma tag 6xHis foi também adicionada no C-terminal. Em células transformadas pSYN-VWF-010 é sintetizado com propeptídeo mas devido ao processamento intracelular os produtos secretados não con-

têm qualquer propeptídeo (D1D2). Proteína de VWF-010 existe como dímero.

[000336] pSYN-VWF-010 foi usado para gerar pSYN-VWF-013 que possui duas mutações pontuais em C336A e C379A correspondentes à SEQ ID NO: 100 (a numeração de aminoácido representa sequência de VWF maduro sem sequência 2 de domínio D1D2-VWF). Estas mutações são previstas para evitar a dimerização de domínio VWF D'D3.

#### (c) Clonagem de pSYN-VWF-025 e pSYN-VWF-029

[000337] pSYN-VWF-025 contém sequências tipo selvagens D1D2D'D3 de VWF de comprimento completo em vetor pLIVE, e pSYN-VWF-029 contém sequência D1D2D'D3 com mutação C336A e C379A. Para clonagem de pSYN-VWF-025, a combinação de iniciadores que se segue foi usada:

ESC 89-direto com sítio Nhe1= CTCACTATAGGGAGAC-CCAAGCTGGCTAGCCG (SEQ ID NO: 92)

ESC 91-rev com Sal1= CTGGATCCCGGGAGTCGAC-TCGTCAGTGGTGATGGTGATGATG (SEQ ID NO: 93)

[000338] Uma reação de PCR de 50 µL foi realizada com combinações de iniciadores ESC 89/ESC91 e pSYN-VWF ou 010 (para pSYN-VWF-025) ou pSYN-VWF 013 (para pSYN-VWF-029) como o modelo de plasmídeo usando ciclo de amplificação PCR de 3 etapas: 94°C 2 minutos; 21 ciclos de (96°C -30 segundos, 55°C-30 segundo, 68°C-4 minutos). A banda de tamanho esperado (~ 3800bp) foi purificada em gel com um kit de extração de Gel (Qiagen, Valencia, Calif.) e clonada nos sítios de restrição Nhe1 e Sal1 de vetor pLIVE-Mirus (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) para gerar pSYN-VWF 025 e 029.

#### (d) Clonagem de pSYN-VWF-031

[000339] pSYN-VWF-031 é um constructo D1D2D'D3 (C336A/C379A) -Fc que tem um ligante clivável por trombina de 48 aminoácidos de comprimento (8x GGGGS (SEQ ID NO 94) + sítio de trombina)

entre as sequências de VWF D1D2D'D3 (C336A/C379A) e de Fc. Para fazer este constructo, região de VWF-Fc foi amplificada a partir do constructo pSYN-FVIII-064 (referir ao constructo FVIII-VWF abaixo). pSYN-FVIII-VWF foi digerido com Xba1 e Nhe1. A região de inserção resultante de 4165bp, contendo o fragmento VWF da região Fc foi usada como um modelo para amplificar a região de VWF e Fc por combinações de iniciadores LW22/LW23.

LW 22-Direto-VWF-D'D3 com sequência sinal FVIII e sítio BsiW1

GCGCCGGCCGTACGATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTT-  
CTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGCCTATCCTGTCTGG-  
CCCCCATG (SEQ ID NO: 95)

LW 23-Rev- Fc com códon de parada e sítio Not1

TCATCAATGTATCTTATCATGTCTGAATTCGCGGCCGCTCATT-  
TACC (SEQ ID NO:96)

[000340] O produto de PCR obtido a partir de amplificação de LW22/LW23 (~ 2300bp) foi clonado em pSYN-VWF-002 digerido por BsiW1/Not1 para obter pSYN-VWF 014 intermediário. pSYN-VWF-014 contém ligante clivável por trombina de 20 aminoácidos peptídeo sinal de FVIII-D'D3 seguido pela região Fc.

[000341] Para gerar o constructo D1D2D'D3-Fc, a região D1D2D'D3 foi amplificada a partir de pSYN-VWF-013 usando uma combinação de iniciadores LW24/LW27 pelo método de PCR padrão.

LW24- Direto- VWF D1D2D'D3 clonando oligo com sítio BsiW1

GCGCCGGCCGTACGATGATTCCTGCCAGATTTGCCGGGGTG  
(SEQ ID NO:97)

LW27-Rev-VWF D'D3 oligo com EcoRV

CCACCGCCAGATATCGGCTCCTGGCAGGCTTCACAGGTGAG  
(SEQ ID NO:98)

[000342] O produto de PCR obtido a partir de amplificação LW22/LW23 (~ 3750bp) foi clonado em pSYN-VWF-014 digerido por

BsiW1/EcoRV para obter pSYN-VWF 015 intermediário. O comprimento do ligante entre o fragmento de VWF e região Fc foi alterado para obter pSYN-VWF-031.

VWF-D1D2D'D3 Sequência de proteína 1 (SEQ ID NO: 99)

```

1  MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS
DFVNTFDGSM
51  YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE
FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQRVs MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI
DGSGNFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS
WALSSGEQWC
201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL
VDPEPFVALC
251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA
CSPVCPAGME
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG
LCVESTECPC
351 VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECVL
TGQSHFKSFD
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC
TRSVTVRLPG
451 LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGDL RIQHTVTASV
RLSYGEDLQM
501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG
LAEPRVEDFG
551 NAWKLHGDCQ DLQKQHSDPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP
TFEACHRAVS
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV
AWREPGRCEL
651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCT SLSYPDEECN EACLEGCFCP
PGLYMDERGD
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM
SGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVC PADN LRAEGLECTK
TCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE
TVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ
YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE
VNVKRPMKDE

```

```

951  THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE
    KVCGLCGNFD
1001  GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD
    SSPATCHNNI
1051  MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS
    CESIGDCACF
1101  CDTIAAYAHV CAQHKGKVVW RTATLCPQSC EERNLRENGY
    ECEWRYNSCA
1151  PACQVTCQHP EPLACPVCQV EGCHAHCPPG KILDELLQTC
    VDPEDCPVCE
1201  VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP*
    VWF-D'D3 protein sequence 2 (SEQ ID NO: 100)
    1  SLSCRPPMVK LVCPADNLRA EGLECTKTCQ NYDLECMSMG
    CVSGCLCPPG
    51  MVRHENRCVA LERCPCFHQG KEYAPGETVK IGCNTCVCRD
    RKWNCTDHVC
    101  DATCSTIGMA HYLTFDGLKY LFPGECQYVL VQDYCGSNPG
    TFRILVGNKG
    151  CSHPSVKCKK RVTILVEGGE IELFDGEVNV KRPMKDETHF
    EVVESGRYII
    201  LLLGKALSVV WDRHLSISVV LKQTYQEKVC GLCGNFDGIQ
    NNDLTSSNLQ
    251  VEEDPVDFGN SWKVSSQCAD TRKVPLDSSP ATCHNNIMKQ
    TMVDSSCRIL
    301  TSDVFQDCNK LVDPEPYLDV CIYDTCSCEs IGDCACFCDT
    IAAYAHVCAQ
    351  HGKVVTWRTA TLCPQSCEER NLRENGYECE WRYNSCAPAC
    QVTCQHPEPL
    401  ACPVQCVEGC HAHCPPGKIL DELLQTCVDP EDCPVCEVAG
    RRFASGKKVT
    451  LNPSDPEHCQ ICHCDVVNLT CEACQEP

```

**Exemplo 2:** Efeitos de fusão de D'D3 e XTEN sobre extensão meia-vida de FVIII

[000343] Para avaliar a extensão potencial da meia-vida de D'D3 FVIII na proteína de fusão rFVIII-XTEN, um dímero de VWF D'D3 foi introduzido em camundongos FVIII-VWF DKO por injeção hidrodinâmica do seu constructo de DNA correspondente VWF-025 (Exemplo 1). Após D'D3 atingir a expressão no estado estacionário (dia 5 pós-injeção), uma dose única de rFVIII-XTEN foi administrada por injeção IV a 200 IU/kg de dose. Amostras de sangue foram coletadas até

120hrs após a administração de rFVIII-XTEN. Atividade de FVIII no plasma foi analisada por um teste cromogênico de FVIII. O nível de expressão D'D3 foi medido por VWF ELISA e perfil rFVIII Fc PK foi analisado utilizando o programa WinNonlin.

[000344] Os resultados do estudo são apresentados na Figura 2, e o parâmetro PK de rFVIII-XTEN com/sem D'D3 em circulação foi listado na Tabela 16. O D'D3 dímero ainda prolongou  $t_{1/2}$  de rFVIII-XTEN de 3,4h para 17,8h, um aumento de 5 vezes. Além de meia-vida, 5 vezes de aumento sobre MRT, 3,6 vezes de aumento em AUC, 3,8 vezes de redução na eliminação também foram observados.

[000345] Observou-se um efeito sinérgico de fragmento D'D3 e tecnologia XTEN, uma série de constructos FVIII/VWF/XTEN serão avaliados quanto à sua potencial extensão de meia-vida de FVIII em animais hemofílicos.

**TABELA 16:** parâmetro PK rFVIII-XTEN com/sem D'D3 em circulação no sangue

Tratamento	5min recuperação (%)	$t_{1/2}$ (h)	MRT (h)	Cl (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	AUC_D (h*kg*mlU/mL/mlU)
rFVIIIXTEN VWF-025	80	17,8	19,3	3,5	67,4	0,29
rFVIIIXTEN	74	3,4	3,8	13,1	63,68	0,08
Veze em melhora	1,1	5,2	5,1	3,8	0,9	3,6

#### Purificação da proteína de FVIII-XTEN

[000346] Uma XTEN AE288 foi inserida em C-terminal do BDD-FVIII para este estudo. Para purificar esta proteína, a etapa de filtração de fluxo tangencial (TFF) foi usada primeiro para trocar o tampão do meio condicionado. Produtos do filtrado foram então capturados utilizando uma cromatografia de troca aniônica forte, e, em seguida, adicionalmente purificados utilizando cromatografia de afinidade. Pureza da molécula foi aceitável por HPLC-SEC e foi ainda confirmada por Wes-

tern blotting. A atividade específica da molécula foi comparável para FVIII sem domínio B, como medido pelo ensaio de TTPA e ELISA.

#### Teste Cromogênico de FVIII

[000347] A atividade do FVIII foi medida utilizando o kit de COATEST SP FVIII da Diapharma (lote #N089019) e todas as incubações foram realizadas em uma placa aquecedora a 37°C com agitação.

[000348] A faixa de padrão de rFVIII foi de 100 mIU/ml a 0,78 mIU/mL. Um controle de plasma humano normal agrupado e amostras de plasma (diluídas com tampão 1X Coatest) foram adicionados em placas Immulon 2HB de 96 poços em duplicata (25 µL/poço). Mistura recém-preparada de IXa/FX/Fosfolípideo (50 µL), 25 µL de 25 mM de CaCl<sub>2</sub>, e 50 µL de substrato FXa foi adicionada sequencialmente em cada poço com 5 minutos de incubação entre cada adição. Após incubação com o substrato, 25 µL de 20% de ácido acético foi adicionado para terminar a reação de coloração, e a absorbância de OD405 foi medida com um instrumento SpectraMAX plus (Molecular Devices). Os dados foram analisados com o software Pro SoftMax (versão 5.2). O nível mais baixo de quantificação (LLOQ) é de 7,8 mIU/mL.

#### VWF ELISA:

[000349] Anticorpo anti-VWF humano de cabra (purificado por afinidade, afinidade biológica, GAVWF-AP) foi utilizado como anticorpo de captura em 0.5ug/poço e VWF-EIA-D (Affinity Biologicals, VWF-EIA-D, 1: 100 em diluição) foi utilizado como anticorpo de detecção para o ensaio VWF ELISA. Ensaio ELISA foi realizada seguindo o procedimento de ELISA padrão, TMB foi utilizado como o substrato HRP, tampão de PBST/1,5% de BSA/NaCl 0,5 M foi utilizado como tampão de ligação e de bloqueio. O intervalo padrão de ensaio é de 100 ng para 0,78ng e limite mais baixo de quantificação do ensaio (LLOQ) é 7,8ng/mL.

#### Exemplo 3: Constructo do plasmídeo de XTEN contendo constructos de FVIII/VWF



(a) Clonagem de pSYN-FVIII-161 (Figura 3)

[000350] O plasmídeo FVIII-161 compreende uma estrutura de Fc de cadeia simples (scFC) com sítios de clivagem de enzimas que são processados durante a síntese de uma célula. O constructo tem um domínio de ligação de FVIII de VWF de comprimento completo (D'D3).

[000351] O plasmídeo (pSYN-FVIII-161) foi concebido para a expressão de FVIII-Fc e heterodímero VWF-Fc, em que os domínios D'D3 para ligam FVIII e impedem a interação de FVIII com fosfolípidos e a proteína C ativada. A proteína de pSYN-FVIII -161 é expressa na célula como um polipeptídeo único, onde o C-terminal da subunidade FVIII-Fc é ligada ao N-terminal da subunidade de VWF D'D3-Fc por um ligante de polipeptídeo 6x (GGGGS) (SEQ ID NO : 64). Além disso, sequências RRRRS (SEQ ID NO: 11) e RKRRKR (SEQ ID NO: 10) foram inseridas na extremidade 5' e 3' na extremidade do ligante de polipeptídeos, respectivamente, para a clivagem intracelular por convertases pró-proteína após o último Arg em cada sequência. Assim, as células podem expressar uma cadeia dupla de heterodímero FVIII-Fc/D'D3-Fc onde a cadeia de FVIII-Fc tem uma sequência RRRRS (SEQ ID NO: 11) em C-terminal, mas o restante da sequência ligante foi removida. Um fragmento AE288 XTEN imediatamente seguido por polipeptídeo IS {5X (GGGGS)} LVPRGSGG (SEQ ID NO: 122) (contém o sítio de clivagem da trombina) é introduzido entre os domínios de VWF e a região Fc para facilitar a liberação do fragmento VWF de FVIII, uma vez a proteína heterodimérica FVIII-VWF é ativada pela trombina, permitindo a interação de FVIII com outros fatores de coagulação.

[000352] A sequência de proteína pSYN-FVIII-161 (SEQ ID NO: 101) (sequência de FVIII na posição de aminoácido 1-1457; região sublinhada representa a região Fc; sublinhado curvilíneo representa ligante clivável entre primeiro Fc e fragmento de VWF; região dupla sublinha-

da representa fragmento de VWF; região em **negrito** representa ligante clivável entre fragmento de VWF e Fc.

```

1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL
  GELPVDARFP
51  PRVPKSFPFN 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 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR
  KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR
  PYNIYPHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP
  TKSDPRCLTR
551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR
  NVILFSVFDE
601 NRSWYLTEI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
  FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF
  PFSGETVFMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED
  SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITRTTL QSDQEEIDYD
  DTISVEMKKE
801 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
  HVLNRNAQSG
851 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA
  EVEDNIMVTF
901 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPRKN FVKPNETKTY
  FWKVQHMAP

```

951 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGGLIGPL LVCHTNTLNP  
 AHGRQVTVQE  
 1001 FALFFTIFDE TKSIFYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN  
 YRFHAINGYI  
 1051 MDTLPGLVMA QDQIRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV  
 RKKEEYKMAL  
 1101 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL  
 VYSNKCQTPL  
 1151 GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK  
 EPFSWIKVDL  
 1201 LAPMIIHGK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY  
 RGNSTGTLMV  
 1251 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPH YSIRSTLRME  
 LMGCDLNSCS  
 1301 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR  
 SNAWRPQVNN  
 1351 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISSS  
 QDGHQWTLFF  
 1401 QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH  
 QIALRMEVLG  
 1451 CEAQDLYDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI  
SRTPEVTCVV  
 1501 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV  
SVLTVLHQDW  
 1551 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP  
SRDELTKNQV  
 1601 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS  
FFLYSKLTV  
 1651 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGKRRRRSG  
GGSGGGGSG  
 1701 GGSGGGGSG GGGSGGGGSR KRRKRSLSR PPMVKLVCPA  
DNLRAEGLEC  
 1751 TKTCQNYDLE CMSMGCVSGC LCPPGMVRHE NRCVALERCP  
CFHQKEYAP  
 1801 GETVKIGCNT CVCRRKWNK TDHVCDATCS TIGMAHYLTF  
DGLKYLEPGE  
 1851 COYVLVQDYC GSNPGTFRIL VGKKGCSHPS VKCKKRVTIL  
VEGGEIELFD  
 1901 GEVNVKRPMK DETHFEVVES GRYIILLGK ALSVVWDRHL  
SISVVLKQTY  
 1951 QEKVCGLCGN FDGIQNDLT SSNLOVEEDP VDFGNSWKVS  
SQCADTRKVP  
 2001 LDSSPATCHN NIMKQTMVDS SCRILTSDFV QDCNKLVDPE  
PYLDVCIYDT  
 2051 CSCSIGDCA AFCDTIAAYA HVCAQHKGKV TWRTATLCPQ  
SCEERNLREN  
 2101 GYESAEWRYNS CAPACQVTCQ HPEPLACPVO CVEGCHAHCP  
PGKILDELLO  
 2151 TCVDPEDCPV CEVAGRRFAS GKKVTLNPSD PEHCQICHCD  
VVNLTCACQ

2201	<u>EPISGTSESA</u> TPESGPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP
GSEPATSGSE	
2251	TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAPGSPA GSPTSTEEGT
SESATPESGP	
2301	GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSPAGS PTSTEEGSPA
GSPTSTEEGT	
2351	STEPSEGSAP GTSESATPES GPGTSESATP ESGPGTSESA
TPESGPGSEP	
2401	ATSGSETPGS EPATSGSETP GSPAGSPTST EEGTSTEPSE
GSAPGTSTEP	
2451	SEGSAPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GTSTEPSEGS
APDSGGGGSG	
2501	GGGSGGGGGSG GGGSGGGGSL VPRGSGGDKT <u>HTCPPCPAPE</u>
<u>LLGGPSVFLF</u>	
2551	<u>PPKPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVV</u> <u>VDVSHEDPEV</u> <u>KFNWYVDGVE</u>
<u>VHNAKTKPRE</u>	
2601	<u>EQYNSTYRVV</u> <u>SVLTVLHQDW</u> <u>LNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIE</u>
<u>KTISKAKGQP</u>	
2651	<u>REPQVYTLPP</u> <u>SRDELTKNQV</u> <u>SLTCLVKGFY</u> <u>PSDIAVEWES</u>
<u>NGQPENNYKT</u>	
2701	<u>TPPVLDSDGS</u> <u>FFLYSKLTVD</u> <u>KSRWQQGNVF</u> <u>SCSVMHEALH</u>
<u>NHYTQKSLSL</u>	
2751	<u>SPGK</u>

**(b) Clonagem de pSYN-FVIII-168, 175, 172 e 174 (Figura 4A-4D)**

[000353] pSYN-FVIII-168, 172, 174 e 175 são derivados de pSYN-FVIII-161. Mutações R1645A/R1648A foram introduzidas em pSYN-FVIII-161 para formar pSYN-FVIII-168, que produz uma isoforma SC-FVIII e um AE288 XTEN foi diretamente fundida em C-terminal de FVIII-HC para posterior extensão da meia-vida. Para o constructo pSYN-FVIII-175, a sequência de códon D'D3 foi removida para formar pSYN-FVIII-168 para avaliação do efeito da tecnologia de Fc e XTEN em extensão meia-vida de FVIII.

[000354] Para o constructo pSYN-FVIII-172, o fragmento AE288 XTEN foi diretamente fundido em C-terminal de FVIII-HC para posterior extensão da meia-vida, e a sequência de códons D'D3 foi removida do pSYN-FVIII-172 para formar pSYN-FVIII-174 para avaliação do efeito da tecnologia de Fc e XTEN em extensão meia-vida de FVIII.

**(c) Clonagem de pSYN-FVIII-170 (Figura 4E)**

[000355] pSYN-FVIII-170 foi construído de modo a avaliar o efeito de XTEN e fragmento D'D3 de extensão da meia-vida de FVIII. A sequência de códons do fragmento VWF-D1D2D'D3 e BDD-FVIII foram intro-

duzidos na extremidade 5' e na extremidade 3' de cassete de expressão, uma sequência de códons AE288 XTEN seguida por um ligante clivável trombina de 35 aa foi utilizado para conectar o VWF e molécula de FVIII. Após o processamento intracelular, a proteína secretada compreende um polipeptídeo que contém o fragmento de D'D3 da molécula madura de VWF, que está ligada ao N-terminal de BDD-FVIII maduro por um ligante clivável trombina AE288 XTEN/35 aa.

Sequência de proteína pSYN-FVIII-170 (SEQ ID NO: 102)

```

1  SLSCRPPMVK LVCPADNLRA EGGLECKTCQ NYDLECMMSG
   CVSGCLCPPG
51  MVRHENRCVA LERCPCFHQG KEYAPGETVK IGCNTCVCRD
   RKWNCTDHVC
101 DATCSTIGMA HYLTFDGLKY LFPGECQYVL VQDYCGSNPG
   TFRILVGNKG
151 CSHPSVKCKK RVTILVEGGE IELFDGEVNV KRPMKDETHF
   EVVESGRYII
201 LLLGKALSVV WDRHLSISVV LKQTYQEKVC GLCGNFDGIQ
   NNDLTSSNLQ
251 VEEDPVDFGN SWKVSSQCAD TRKVPLDSSP ATCHNNIMKQ
   TMVDSSCRIL
301 TSDVFQDCNK LVDPEPYLDV CIYDTCSCES IGDCAAFCDT
   IAAYAHVCAQ
351 HGKVVTWRTA TLCPQSCEER NLRENGYEA E WRYN SCAPAC
   QVTCQHPEPL
401 ACPVQCVEGC HAHCPPGKIL DELLQTCVDP EDCPVCEVAG
   RRFASGKKVT
451 LNPSDPEHCQ ICHCDVVNLT CEACQEPISG TSESATPESG
   PGSEPATSGS
501 ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
   TSTEPSEGSA
551 PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
   ESATPESGPG
601 SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGTSTEPS EGSAPGTSES
   ATPESGPGTS
651 ESATPESGPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGSEPATS
   GSETPGSPAG
701 SPTSTEEGTS TEPSEGSAPG TSTEPSEGSA PGSEPATSGS
   ETPGTSESAT
751 PESGPGTSTE PSEGSAPDSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG
   GGGSLVPRGS
801 GGASATRRYY LGAVELSWDY MQSDLGELPV DARFP PPRVPK
   SFPFNTSVVY
851 KKTLFVEFTD HLFNIAKPRP PWMGLLGPTI QAEVYDTVVI
   TLKNMASHPV
901 SLHAVGVSYW KASEGAEYDD QTSQREKEDD KVFP GGSHTY
   VWQVLKENG P
951 MASDPLCLTY SYLSHVDLVK DLNSGLIGAL LVCREGSLAK
   EKTQTLHKFI

```

1001 LLFAVFDEGK SWHSETKNSL MQDRDAASAR AWPKMHTVNG  
 YVNRSLPGLI  
 1051 GCHRSVYWH VIGMGTTPPEV HSIFLEGHTF LVRNHRQASL  
 EISPITFLTA  
 1101 QTLLMDLGQF LLFCHISSHQ HDGMEAYVKV DSCPEEPQLR  
 MKNNEEAEDY  
 1151 DDDLTDSEMD VVRFDDDNSP SFIQIRSVAK KHPKTWVHYI  
 AAEEDWDYA  
 1201 PLVLAPDDRS YKSQYLNNGP QRIGRKYKKV RFMAYTDETF  
 KTREAIQHE  
 1251 GILGPLLYGE VGDTLIIIFK NQASRPYNIY PHGITDVRPL  
 YSRRLPKGVK  
 1301 HLKDFPILPG EIFKYKWTVT VEDGPTKSDP RCLTRYISSF  
 VNMERDLASG  
 1351 LIGPLLYCYK ESVDQQRGNQI MSDKRNVLIF SVFDENRSWY  
 LTENIQRFLP  
 1401 NPAGVQLEDP EFQASNIMHS INGYVFDSLQ LSVCLHEVAY  
 WYILSIGAQT  
 1451 DFLSVFFSGY TFKHKMVEYED TLTLFPFSGE TVFMSMENPG  
 LWILGCHNSD  
 1501 FRNRGMTALL KVSSCDKNTG DYYEDSYEDI SAYLLSKNNA  
 IEPFSFSQNP  
 1551 PVLKRHQREI TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY  
 DEDENQSPRS  
 1601 FQKKTRHYFI AAVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVPQF  
 KKVVFQEFTD  
 1651 GSFTQPLYRG ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS  
 RPYSFYSSLI  
 1701 SYEEDQRQGA EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF  
 DCKAWAYFSD  
 1751 VDLEKDVHSG LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF  
 TIFDETKSWY  
 1801 FTENMERNCR APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP  
 GLVMAQDQRI  
 1851 RWYLLSMGSN ENIHSIHFGS HVFTVRKKEE YKMALYNLYP  
 GVFETVEMLP  
 1901 SKAGIWRVEC LIGELHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMASG  
 HIRDFQITAS  
 1951 GQYGQWAPKL ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI  
 IHGIKTQGAR  
 2001 QKFSSLYISQ FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV  
 DSSGIKHNI  
 2051 NPPIIARYIR LHPHTYSIRS TLRMELMGCD LNCSMPLGM  
 ESKAISDAQI  
 2101 TASSYFTNMF ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL  
 QVDFQKTMKV  
 2151 TGVTTQGVKS LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV  
 KVFQGNQDSF  
 2201 TPVVNSLDPP LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LY

Exemplo 4: Injeção hidrodinâmica de XTEN contendo constructos FVIII/VWF em camundongos deficientes de FVIII e VWF

[000356] Os constructos de DNA contendo XTEN nas Figuras 3 e 4 combinaram 2-3 elementos de extensão da meia-vida juntos. Para avaliar o seu potencial de extensão meia-vida de FVIII, um grupo seletivo de constructos de DNA na Figura 3 e Figura 4 foi introduzido em camundongos duplo knockout de FVIII/VWF (DKO) por injeção hidrodinâmica (HDI), na dose 100 ug/camundongo. Amostras de sangue foram então coletadas pela coleta retro orbital no sangue em 24 horas após HDI. A atividade de FVIII no plasma após HDI foi analisada por ensaio cromogênico de FVIII, e os resultados foram listadas na Tabela 17 e Figura 5. Em comparação com o tipo selvagem BDD-FVIII, todos DNA contendo constructos XTEN geraram atividade plasmática de FVIII significativamente maior após 24 horas de HDI, indicando as moléculas correspondentes que tinham meia-vida de proteína em circulação significativamente maior do que BDD-FVIII. A aplicação da combinação desses elementos que estendem a meia-vida também foi avaliada em animais hemofílicos.

TABELA 17: Atividade plasmática de FVIII após 24h de HDI em camundongos DKO FVIII/VWF

Constructo DNA	BDD-FVIII	FVIII-161	FVIII-168	FVIII-172	BDD-FVIII	FVIII-170
Dose DNA (µg/camundongo)	100	100	100	100	50	50
Atividade de FVIII (mU/mL)	219±72	2446±1012	2209±609	1671±223	197±21	399±30

Injeção hidrodinâmica:

[000357] Injeção hidrodinâmica é um método eficiente e seguro de liberação de gene não viral para o fígado em pequenos animais, como camundongos e ratos. Foi originalmente descrito como uma rápida injeção de uma solução de DNA de plasmídeo naked/solução salina isenta de endotoxina em um décimo de volume de peso corporal do

animal em cerca de 5-7 segundos. O DNA de plasmídeo naked contém o gene de interesse e o fígado produzido em um décimo do volume do peso corporal animal. A proteína alvo é produzida no fígado a partir do DNA injetado e pode ser detectada dentro de 24 horas após a injeção. As amostras plasmáticas foram então coletadas para estudar a propriedade terapêutica da proteína expressa.

[000358] Para todas as injeções hidrodinâmicas que foram realizadas aqui, 2 ml de DNA de plasmídeo em solução salina estéril 0,9% foi liberada por via de injeção intravenosa na veia da cauda dentro de cerca de 4-7 segundos para camundongos pesando 20-35 gramas. Os camundongos foram monitorados de perto para o primeiro par de horas até que a atividade normal fosse retomada. Após as amostras de sangue terem sido coletadas por meio de coleta de sangue retro-orbital, amostras plasmática foram obtidas e armazenadas a -80°C para posterior análise.

Exemplo 5: Construção do plasmídeo de sistema de co-transfecção para heterodímero FVIII-Fc-VWF contém inserções XTEN (Figura 6)

[000359] Para aumentar o rendimento da produção de proteínas, dois sistemas de co-transfecção foram gerados para produção de proteína, que contém três constructos de DNA. O primeiro constructo de DNA codifica uma proteína de fusão de FVIII-Fc em que um fragmento AE288 XTEN foi diretamente fundido ao C-terminal da cadeia pesada de FVIII e seguido por um fragmento de cadeia leve de FVIII de tipo selvagem (pSYN-FVIII-173, Figura 6B) ou um fragmento da cadeia leve de FVIII com mutações R1645A/R1648A (pSYN-FVIII-169, Figura 6A), a cadeia leve de FVIII foi então diretamente fundida com um único fragmento Fc. O segundo constructo de DNA é pSYN-VWF-031, que codifica uma proteína de fusão de Fc-D'D3 (Exemplo 1). As células HEK293F foram transfectadas com os dois plasmídeos juntamente com um terceiro plasmídeo (PC5) em proporção 80: 15: 5. As proteí-



nas secretadas foram sintetizadas como heterodímero FVIII (XTEN) Fc/D'D3Fc e dímero D'D3Fc e o heterodímero FVIII (XTEN) Fc/D'D3Fc foi separado do dímero D'D3Fc por purificação de proteínas.

**pSYN-FVIII-169 mature Sequência de proteína (SEQ ID NO: 103):**

```

1  ATRRYYLGA V ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFPF
   NTSVVYKCTL
51  FVEFTDHLFN IAKPRPPWMG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN
   MASHPVSLHA
101 VGVSYWKASE GA EYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV
   LKENGPMASD
151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ
   TLHKFILLFA
201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR
   SLPGLIGCHR
251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP
   ITFLTAQTLL
301 MDLQQLLLFC HISSHQHDGM EAYVKVDSCP EEPQLRMKNN
   EEAEDYDDDL
351 TDSEMDVVRF DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE
   EDWDYAPLVL
401 APDDRSYKSQ YLNNGPQRI G RYKKVRFMA YTD ETKTRE
   AIQHESGILG
451 PLYGEVGD T LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSRR
   LPKGVKHLKD

501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYSSSFVNME
   RDLASGLIGP
551 LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYL TEN
   IQRFLPNPAG
601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL
   SIGAQTDFLS
651 VFFSGYTFKH KVMYEDTLTL FPFSGETVFM SMENPGLWIL
   GCHNSDFRNR
701 GMTALLKVSS CDKNTGDY YE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR
   SFSQNGAPGT
751 SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSEPAT
   SGSETPGTSE
801 SATPESGPGT STEPSEGSAP GSPAGSPTST EEGTSESATP
   ESGPGSEPAT
851 SGSETPGTSE SATPESGPGS PAGSPTSTEE GSPAGSPTST
   EEGTSTEPSE
901 GSAPGTSESA TPESGPGTSE SATPESGPGT SESATPESGP
   GSEPATSGSE
951 TPGSEPATSG SETPGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT
   STEPSEGSAP
1001 GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAPASSP
   PVLKRHQAEI
1051 TRITLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEDENQSPRS
   FQKKTRHYFI

```

1101 AAVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVPQF KKVVFQEFTD  
GSFTQPLYRG  
1151 ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI  
SYEEDQRQGA  
1201 EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD  
VDLEKDVHSG  
1251 LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDETKSWY  
FTENMERNCR  
1301 APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI  
RWYLLSMGSN  
1351 ENIHSIHFG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GVFETVEMLP  
SKAGIWRVEC  
1401 LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMA SG HIRDFQITAS  
GQYGQWAPKL  
1451 ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR  
QKFSSLYISQ  
1501 FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNI  
NPPIIARYIR  
1551 LHPTHYSIRS TLRMELMGCD LNSCSMPLGM ESKAISDAQI  
TASSYFTNMF  
1601 ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV  
TGVTTQGVKS  
1651 LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF  
TPVVNSLDPP  
1701 LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LYDKTHTCP  
CPAPELLGGP  
  
1751 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAK  
1801 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL  
PAPIEKTISK  
1851 AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA  
VEWESNGQPE  
1901 NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM  
HEALHNHYTQ  
1951 KSLSLSPGK

pSYN-FVIII-173 sequência de proteína madura (SEQ ID NO: 104):

```

  1  ATRRYYLGA V ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFPF
    NTSVVYKCTL
 51  FVEFTDHLFN IAKPRPPWMG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN
    MASHPVSLHA
101  VGVSYWKASE GAEYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV
    LKENGPMASD
151  PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ
    TLHKFILLFA
201  VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR
    SLPGLIGCHR
251  KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP
    ITFLTAQTLL
301  MDLGQFLLFC HISSHQHDGM EAYVKVDSCP EEPQLRMKNN
    EEAEDYDDDL
351  TDSEMDVVR F DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE
    EDWDYAPLVL
401  APDDRSYKSQ YLNNGPQRIG RKYKKVRFMA YTDETFKTRE
    AIQHESGILG
451  PLYGEVGDT LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSR
    LPKGVKHLKD
501  FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYSSSFVNME
    RDLASGLIGP
551  LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYLTEN
    IQRFLPNPAG
601  VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL
    SIGAQTDFLS
651  VFFSGYTFSK KMVYEDTLTL FPFSGETVFM SMENPGLWIL
    GCHNSDFRNR
701  GMTALLKVSS CDKNTGDYIE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR
    SFSQNGAPGT
751  SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSEPAT
    SGSETPGTSE
801  SATPESGP GT STEPSEGSAP GSPAGSPTST EEGTSESATP
    ESGPGSEPAT
851  SGSETPGTSE SATPESGPGS PAGSPTSTEE GSPAGSPTST
    EEGTSTEPSE
901  GSAPGTSESA TPESGPGTSE SATPESGP GT SESATPESGP
    GSEPATSGSE
951  TPGSEPATSG SETPGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT
    STEPSEGSAP

```

```

1001  GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAPASSP
      PVLKRHQREI
1051  TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEDENQSPRS
      FQKKTRHYFI
1101  AAVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVPQF KKVVFQEFTD
      GSFTQPLYRG
1151  ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI
      SYEEDQRQGA
1201  EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD
      VDLEKDVHSG
1251  LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDETKSWY
      FTENMERNCR
1301  APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI
      RWYLLSMGSN
1351  ENIHSIHFGS HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GVFETVEMLP
      SKAGIWRVEC
1401  LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS
      GQYGQWAPKL
1451  ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR
      QKFSSLYISQ
1501  FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNIF
      NPPIIARYIR
1551  LHPHYSIRS TLRMELMGCD LNCSMPLGM ESKAISDAQI
      TASSYFTNMF
1601  ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV
      TGVTTQGVKS
1651  LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF
      TPVVNSLDPP
1701  LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LYDKTHTCPP
      CPAPELLGGP
1751  SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY
      VDGVEVHNAK
1801  TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL
      PAPIEKTISK
1851  AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
      VEWESNGQPE
1901  NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM
      HEALHNHYTQ
1951  KSLSLSPGK

```

**Exemplo 6.** Purificação da proteína para FVIII-169/VWF e FVIII 173/VWF-031

[000360] A etapa de filtração de fluxo tangencial (TFF) foi utilizada

para troca de tampão do meio condicionado clarificado. O heterodímero FVIII-169/ VWF-031 ou FVIII-173/VWF-031 foi então purificado utilizando um processo de cromatografia em duas etapas. Uma resina de troca aniônica fraca foi utilizada, seguido por cromatografia de afinidade. O produto final purificado tinha pureza aceitável por SEC-HPLC. A atividade específica era compatível com FVIII sem domínio B, como medido pelo ensaio cromogênico de FVIII e concentração em A280. A pureza e a presença de cada fração desta molécula foram confirmadas por SDS-PAGE e Western blotting.

Exemplo 7. Avaliação da capacidade de ligação a VWF de FVIII-169/VWF-031 por ensaio de Octeto

[000361] A capacidade de ligação à VWF de FVIII-169/VWF-031 foi obtida pelas medições baseadas em interferometria de Bio-Camada (BLI) (ensaio de Octeto) a 25°C com um instrumento ForteBio Octet 384, utilizando tampão de ligação Tris (50 mM Tris, pH 7,2, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM). O ensaio octeto para a determinação da ligação a FVIII foi baseado na imobilização hidrofóbica de Fator de von Willebrand humano (Haematologic Technologies Catalog N.º HCVWF-0191) sobre APS Biosensor, então, seguido pela ligação de 1,0% Albumina de Soro Bovino (Jackson ImmunoResearch Catalog N.º 001-000-161). Resumidamente, hVWF (20 µg/mL) foi diluída em tampão Tris e carregado através APS Biosensors para 600 segundos, obtendo-se cerca de 3,0-3,5 nm de ligação sobre as sondas de reação. As sondas de controle APS foram carregadas com 1,0% de BSA na ausência de hVWF para subtração de referência. Após a carga, todas as sondas foram incubadas em tampão Tris durante 300 segundos para estabelecer uma linha de base nova. Subsequentemente, as sondas de biosensores foram incubadas em soluções de FVIII-XTEN 169 ou substância de droga FVIII-Fc (0, 0,6, 2, 6, 20, 60, 200, 600 IU/mL) durante 5 min em temperatura ambiente, seguido de etapa de dissociação de 5

minutos. Utilizando o software de análise de dados de octetos, a resposta de ligação (nm) foi obtida a partir dos dados subtraídos (sonda de reação menos sonda de referência). Nenhuma ligação à VWF imobilizado foi detectada para o FVIII-169/VWF-031 (Figura 7), indicando uma blindagem completa de FVIII a partir da molécula de VWF de comprimento completo pelo fragmento de D'D3.

Exemplo 8. FVIII-169/VWF-031 PK em HemA e camundongos DKO FVIII/VWF

[000362] O perfil PK de FVIII-169PK/VWF-031 foi testado em HemA e camundongos DKO FVIII/VWF para avaliar a capacidade do fragmento de D'D3 para proteger a fração do FVIII do VWF endógeno. HemA ou camundongos DKO FVIII/VWF foram tratados com uma dose intravenosa única de FVIII-169/VWF-031 a 200 IU/kg, as amostras plasmática foram coletadas em 5 min, 8h, 24h, 48h e 72 horas após a dosagem. A atividade de FVIII de amostra plasmática foi testada pelo ensaio cromogênico de FVIII, e meia-vida do FVIII-169/VWF-031 foi calculada utilizando o programa WinNonlin.

[000363] A inibição completa dos constructos de ligação para VWF imobilizado foi demonstrada por interferometria de biocamada (Figura 7) para o FVIII-169/VWF-031. Isto indica que o fragmento de D'D3 na molécula havia bloqueado com êxito a ligação a ligação de FVIII às moléculas de VWF nativas, portanto meia-vida semelhante de FVIII-169/VWF-031 foi previsto em duas cepas diferentes de camundongo. Como mostrado na Figura 8A e Tabela 18, como esperado, FVIII-169/VWF-031 apresentaram perfis PK semelhantes em ambos HemA e camundongos DKO FVIII/VWF, que demonstrou que a meia-vida de heterodímero FVIII<sub>169</sub>/VWF é independente do meia-vida de VWF endógeno. A separação da meia-vida de heterodímero FVIII<sub>169</sub>/VWF a partir da meia-vida de VWF endógeno, eliminou o limite de extensão de FVIII e abriu a possibilidade de ampliar ainda mais a meia-vida do

FVIII além do limite de meia-vida de duas vezes imposta por VWF endógeno.

**TABELA 18:** FVIII-169/VWF-031 PK em camundongos HemA e DKO FVIII/VWF

Cepa de camundongo	Recuperação (%)	$t_{1/2}$ (h)	MRT (h)	CI (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	AUC (h*kg*mlU/mL/mlU)
FVIII/VWF DKO	69	17,94	20,1	4,06	81,69	0,2461
HemA	83	16,65	18,44	3,57	85,72	0,28

[000364] A capacidade de proteger o FVIII da inserção de XTEN e fragmento D'D3 foi avaliada por comparação da meia-vida do FVIII-169/VWF-031 com FVIII-169/Fc e FVIII-Fc em camundongos DKO FVIII/VWF. Após uma única administração IV, amostras de sangue foram coletadas aos 5min, 8h, 24h, 48h e 72hr para FVIII-169/VWF-031, 5min, 8h, 24h, 32hr, 48hr para FVIII-169/Fc e aos 5min, 1, 2, 4, 6 e 8 horas para FVIII-Fc. A atividade de FVIII de amostra plasmática foi testada pelo ensaio cromogênico de FVIII, e meia-vida do FVIII-155/VWF-031 foi calculada utilizando o programa WinNonlin.

[000365] Os resultados do estudo estão resumidos na Figura 8B e na Tabela 19, rFVIII-Fc tem uma meia-vida de 1,6hr em camundongos DKO, devido à perda de proteção de VWF. Quando uma inserção XTEN foi introduzida na molécula FVIII-Fc, a molécula resultante FVIII-169/Fc tem uma meia-vida de 7 h, uma extensão da meia-vida de 4 vezes pela inserção XTEN. Finalmente, quando fragmento D'D3 foi incorporado na molécula para formar FVIII-169/VWF-031, foi observada um meia-vida de 17hr, 2,5 vezes mais outro aumento pelo fragmento de D'D3. Além disso, a melhoria de meia-vida melhorou o tempo de residência médio (MRT), eliminação (CI) e AUC foram também observadas como mostrado na Tabela 19.

[000366] FVIII-169/VWF-031 alcançou 17-18hr de  $t_{1/2}$  em ambos

HemA e camundongos DKO FVIII/VWF, que é o limite superior do teto de extensão de  $t_{1/2}$  que imposta pela eliminação de VWF. Mais elementos de extensão de  $t_{1/2}$  podem ser adicionalmente incorporados nesta molécula, como uma segunda inserção XTEN dentro de FVIII. O efeito sinérgico de fragmento D'D3 e inserções XTEN prevista a possibilidade da proteção completa para FVIII de sua via de eliminação, um avanço final de 2 vezes no limite de extensão de  $t_{1/2}$  em FVIII pode ser alcançado pelas variantes FVIII Fc/XTEN/VWF.

**TABELA 19.** FVIII-169/VWF-031 PK em camundongos DKO FVIII/VWF

Cepa de camundongo	Tratamento	Recuperação (%)	$t_{1/2}$ (h)	MRT (h)	Cl (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	AUC/D (h*kg*mlU/mL/mlU)
FVIII/VWF DKO	rFVIII Fc	35	1,6	2,1	57,7	120,2	0,0173
	rFVIII-169/ Fc	77	7,0	6,2	6,4	39,2	0,1573
	rFVIII-169/VWF-031	69	17,9	20,1	4,1	81,7	0,2461

**Exemplo 9:** PK de concentrado de meio celular com variantes de FVIII-XTEN em camundongos DKO FVIII/VWF expressando D'D3

[000367] A capacidade de fragmento D'D3 em estender a  $t_{1/2}$  de FVIII-XTEN foi avaliada no modelo de camundongos DKO FVIII/VWF expressando D'D3 (descrito no exemplo 2). Neste estudo, em vez de usar VWF-025 para introduzir o dímero D'D3 na circulação, foi utilizado constructo VWF-029 para introduzir o monômero D'D3 na circulação. Para preparar variantes da proteína FVIII-XTEN, um meio de cultura em pequena escala de transfecção transitória (50-100 mL) foi preparado, no dia 4 após a transfecção, a cultura de células foi colhida e concentrada para atingir 10-20 IU/mL de faixa de atividade de FVIII que é apropriada para estudo PK. Os meios celulares concentrados foram, em seguida, utilizados para o estudo PK padrão em camundongos DKO FVIII/VWF com ou sem D'D3 na circulação.



[000368] Total de seis variantes de FVIII-XTEN que contém inserções XTEN 1-3 foram testados no sistema, seus  $t_{1/2}$  foram resumidos na Tabela 20 e os dados a partir de variantes representativas foram representados graficamente na Figura 9A.

[000369] Meia-vida maior foi observada para todas as variantes FVIII-XTEN com os presentes de fragmento D'D3 na circulação (Tabela 20), o que demonstrou a proteção D'D3 para FVIII-XTEN de suas vias de eliminação. Além disso, quando comparado com sua meia-vida de 14h em camundongos HemA, LSD0055.021 tem uma  $t_{1/2}$  de 20,4hr em camundongos DKO que expressam D'D3 (Figura 9B, Tabela 20), indica o avanço final do teto da extensão da meia-vida em 2 para as moléculas de FVIII. Ao modificar ainda mais a molécula de FVIII (XTEN)/VWF, poderíamos potencialmente atingir ainda mais  $t_{1/2}$  de FVIII, e oferecer aos pacientes HemA uma proteína FVIII que requer apenas regime de administração de uma vez semanal ou menos frequente.

**TABELA 20.** FVIII-XTEN  $t_{1/2}$  em camundongos DKO FVIII/VWF expressando D'D3

FVIII-XTEN ID	# de inserções XTEN	Sítio de inserções	Tamanho XTEN	$t_{1/2}$ (h) Camundongos DKO	$t_{1/2}$ (h) pLIVE-D'D3/Camundongos DKO	$t_{1/2}$ (h) Camundongos HemA
pSD-0013	1	CT	144	3,3	7,9	
LSD0003.009	2	B*/CT	144/288	9,7	16,4	
LSD0038.015	2	1656/26	144/144	7,8	17,2	
LSD0049.002	3	18/B*/CT	144/144/288	12,6	17,5	
LSD0051.002	3	403/B*/CT	144/144/288	11,1	19,9	
LSD0055.021	3	1900/B*/CT	144/144/288	16	20,4	14

\* B indica uma sequência XTEN (por exemplo, 144) é inserida imediatamente a jusante do resíduo de aminoácido 745 correspondente à sequência de FVIII madura.

**Exemplo 10:** Estabilidade de variantes FVIII contendo VWF e XTEN

em plasma de camundongos duplo knockout (DKO) FVIII/VWF

[000370] Estabilidade plasmática de variantes de proteína rFVIII-Fc foi testada em plasma de camundongos duplo knockout (DKO) FVIII/VWF. Para o ensaio de estabilidade, as células HEK293 foram co-transfectadas com plasmídeos para dirigir a expressão de rFVIII-Fc ou FVIII-169 (rFVIII-Fc com 288 AE XTEN inserida na junção com o domínio B) e os plasmídeos que dirigem a expressão de IgG-Fc ou VWF-031 (região VWF D'D3 fundida com IgG-Fc). No quarto dia após a transfecção, o meio de cultura de células foi colhido e concentrado a 30 IU/mL com base na atividade cromogênica do FVIII. Meio de cultura celular concentrado foi então adicionado em plasma de camundongo DKO, para gerar uma atividade de FVIII de 5 IU/ml e incubadas a 37°C. As alíquotas foram coletadas em diferentes pontos do tempo para medição da atividade por ensaio cromogênico. Atividade em cada ponto de tempo foi medida em duplicada e a atividade média foi representada graficamente como uma função do tempo. A atividade de FVIII-Fc, uma molécula de FVIII de cadeia dupla (dc) em que as cadeias leve e pesada são mantidas juntas por interação não covalente, diminui com o tempo em plasma de camundongo DKO (Figura 10). A atividade de FVIII-169: Fc, que contém uma inserção de 288 AE XTEN na junção com o domínio B, decai a uma taxa reduzida em relação à rFVIII-Fc, indicando que a estabilidade melhorada é conferida pela inserção de XTEN. Dado que o VWF foi proposto para aumentar a estabilidade de FVIII in vivo, avaliamos a estabilidade do plasma de FVIII-169: VWF-031. Esta molécula heterodimérica, em que o elemento de FVIII e o elemento VWF D'D3 são fundidos com respectivos hemidomínios de Fc, apresentou estabilidade do plasma adicional em relação ao FVIII-169: Fc, indicando que o domínio de VWF D'D3 e XTEN tem um efeito sinérgico sobre a estabilidade do plasma de rFVIII-Fc.

Exemplo 11: O efeito sobre a meia-vida de FVIII da fusão Fc, inserção

XTEN e o fragmento de D'D3 de VWF.

[000371] Para avaliar o efeito de fusão Fc, inserção XTEN e fragmento D'D3 de VWF na meia-vida do FVIII, as propriedades farmacocinéticas do FVIII recombinante sem o domínio B (rBDD-FVIII), rFVIII-Fc, FVIII-169: Fc e FVIII-169: VWF-031 foram avaliados em camundongos duplo knockout (DKO) FVIII/FVW.

[000372] Camundongos DKO foram tratados com uma única administração intravenosa de 200 IU/kg de proteínas de FVIII, e amostras plasmática foram colhidas em pontos de tempo designados como indicado na Figura 11. A atividade de FVIII das amostras plasmáticas foi analisada por ensaio cromogênico FVIII e meia-vida foi calculada utilizando o programa WinNonlin-Phoenix. Os parâmetros de farmacocinética das moléculas testadas estão listados na Tabela 21. A curva de regressão de tempo de atividade de FVIII no plasma para cada variante de FVIII foi representada graficamente na Figura 11.

[000373] BDD-FVIII não modificado tinha uma meia-vida de 0,23 horas em camundongos DKO, a proteína de fusão FVIII-Fc tem uma longa meia-vida de 1,66 horas em camundongos DKO devido à reciclagem da proteína FVIII-Fc através da interação Fc: FcRn. Quando um resíduo 288 de polipeptídeo AEXTEN foi incorporado na região do domínio B de FVIII dentro da molécula FVIII-Fc, a meia-vida da proteína FVIII169/Fc resultante foi ampliada para 7,41 h em camundongos DKO. Finalmente, com a adição do domínio D'D3 de VWF, a meia-vida de heterodímero FVIII169/VWF031 atingiu 17,9 h em camundongos DKO (Figura 11, Tabela 21). Além da meia-vida, todos os outros parâmetros PK melhoraram também proporcionalmente com a adição de cada elemento (Tabela 21). FVIII pode tolerar múltiplos elementos de extensão da meia-vida, e este efeito sinérgico dos três elementos em extensão da meia-vida de FVIII, permitiu a melhoria da meia-vida do heterodímeros VWF FVIII-XTEN.

Tabela 21: Parâmetros de PK de variantes FVIII

FVIII	Isoforma FVIII	Inserções XTEN		T <sub>1/2</sub> (h)	MRT (h)	Cl (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	AUC_D kg*h/mL
		Sítio	Comprimento XTEN					
BDD-FVIII	dc			0,23	0,24	407,72	97,42	0,0025
FVIII <sub>Fc</sub>	dc			1,66	2,06	62,66	128,82	0,0161
FVIII169/ <sub>Fc</sub>	sc	B*	AE288	7,41	6,67	6,24	41,61	0,1603
FVIII169/VWF031	sc	B*	AE288	17,94	20,1	4,06	81,69	0,2463

\* B indica uma sequência XTEN (por exemplo, 144) é inserida imediatamente a jusante do resíduo de aminoácido 745 correspondente a sequência madura de FVIII.

#### Exemplo 12: Propriedades farmacocinéticas de diferentes heterodímeros de FVIII-XTEN\_VWF

[000374] Para avaliar o efeito combinado do fragmento VWF-D'D3 e inserções XTEN sobre a meia-vida do FVIII, as propriedades farmacocinéticas de heterodímeros FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc foram testadas em camundongos HemA e comparados com os da isoforma de cadeia única do BDD-FVIII (scBDD-FVIII) e FVIII-169: VWF-031 (exemplo 10). Sete novos constructos FVIII-XTEN-Fc foram gerados (sequências de proteínas foram listadas na Tabela 24). Diagramas esquemáticos destes constructos estão apresentados na Figura 14A-H. FVIII 195 e o FVIII-199, respectivamente, são a cadeia dupla de FVIII e isoformas de cadeia única que contém cada duas inserções XTEN nas posições 1900 e 1656. FVIII-196 e o FVIII-201, respectivamente, são a cadeia dupla de FVIII e isoformas de cadeia única que cada uma contém três inserções XTEN nas posições 26, 1656 e 1900. FVIII-203, -204 e -205 são moléculas sc-FVIII<sub>Fc</sub> com duas inserções XTEN na junção de domínio B e nas posições 1900, 403 ou 18, respectivamente. Cada constructo de FVIII-XTEN-Fc foi co-expresso com VWF-031 em células HEK293 para produzir proteínas heterodiméricas FVIII-XTEN-Fc/VWF. No quarto dia após a transfecção, meio de cultura celular foi colhido e

concentrado a 20 IU/mL com base na atividade cromogênica de FVIII (FVIII-195: VWF-031, FVIII-196: VWF-031, FVIII-199: VWF-031, FVIII-203: VWF-031 e FVIII-204: VWF-031) ou purificado (scBDD-FVIII, FVIII-169: VWF-031, FVIII-201: VWF-031 e FVIII-205: VWF-031). Tendo demonstrado a blindagem intramolecular completa da molécula de FVIII do VWF endógeno pelo fragmento de D'D3 no heterodímero FVIII-XTEN-Fc: Fc-VWF (FVIII-169: VWF-031, Exemplo 5), camundongos HemA foram escolhidos para as avaliações de PK. A proteína purificada ou concentrada de meio de cultura de células foi administrada em camundongos HemA de 8-12 semanas de idade por administração intravenosa, em uma dose de 200 IU/10 mL/kg. As amostras plasmática foram coletadas em 5 min, 8 h, 16 h, 24 h, 32 h, 48 h, 72 h, e 96 horas após a administração. Atividade de FVIII das amostras plasmática foi analisada por ensaio cromogênico de FVIII e meia-vida foi calculada utilizando o programa WinNonlin-Phoenix. Os parâmetros farmacocinéticos das moléculas testadas estão listados na Tabela 22. As atividades de FVIII no plasma nos pontos de tempo selecionados para as variantes de FVIII-XTEN-Fc/VWF-Fc foram representadas graficamente nas Figuras 12A-C.

[000375] Quando XTEN foi inserida em posições 1900 e 1656 (FVIII-195, FVIII-199) foi observada melhoria moderada da meia-vida para a isoforma scFVIII (FVIII-199: VWF-031) em comparação com o FVIII-169: VWF -031. No entanto, a isoforma dcFVIII exibiu uma meia-vida mais curta do que FVIII-169: VWF-031, indicando que a isoforma de cadeia única pode ser significativamente mais estável do que a correspondente isoforma de cadeia dupla (Tabela 22 e Figura 12A). Quando uma terceira inserção XTEN foi incorporada em FVIII-199 na posição 26, a meia-vida da molécula resultante FVIII-201: VWF-031 atingiu 24,6 h, que representa mais do que uma melhora de três vezes na meia-vida em relação a scBDD-FVIII (Tabela 22 e Figura 12C). Nós

também testamos o efeito de extensão da meia-vida da segunda inserção XTEN na posição 403 (domínio A2), 1900 (domínio A3) e 18 (domínio A1) cada uma em combinação com inserção XTEN de domínio B. Embora a adição da inserção A2 ou A3 XTEN não confere um benefício adicional de meia-vida (Tabela 22, Figura 12b), a adição da inserção A1 estendeu ainda mais a meia-vida do heterodímero FVIII-XTEN-Fc: Fc-VWF para 29,4 horas (Tabela 22, Figura 12C), que é mais do que três vezes maior do que o de scBDD-FVIII.

[000376] Quando XTENs foram incorporadas no constructo de heterodímero FVIII-Fc/VWF, o grau de melhoria da meia-vida das moléculas resultantes era variável, e não foi observada nenhuma correlação óbvia entre as meias-vidas e o local ou número de inserção XTEN, sugerindo que a meia-vida do heterodímero FVIII-XTEN-Fc/VWF é determinada pela integridade da molécula inteira, em vez de pelo número ou a colocação de inserções XTEN.

[000377] As meias-vidas de 24,6 h e 29,4 h observadas para heterodímeros FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc excederam claramente a limitação de 1,6 a 2 vezes em extensão da meia-vida de FVIII. Se esta descoberta se traduz para pacientes HemA, ela permitirá a administração uma vez por semana ou menos frequente para a profilaxia de FVIII.

**Tabela 22:** Parâmetros de PK de heterodímeros FVIII-XTEN-Fc/VWF-Fc

FVIII	FVIII Isoforma	Inserções XTEN		T <sub>1/2</sub> (h)	MRT (h)	Cl (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	AUC_D kg*h/mL
		Sítio	Comprimento XTEN					
scBDD-FVIII	sc			7,16	10,16	4,38	44,44	0,23
FVIII169/VWF031	sc	B*	AE288	16,65	18,44	3,57	65,79	0,28
FVIII195/VWF031	dc	1656/1900	AG144/ AE144	12,56	13,88	9,04	125,48	0,11
FVIII199/VWF031	sc	1656/1900	AG144/ AE144	18,57	20,09	6,24	125,28	0,16
FVIII201/VWF031	sc	26/1656/	AG144/AG144/	24,63	33,67	1,9	63,97	0,53

		1900	AE144					
FVIII203/VWF031	sc	403/B*	AE144/AE288	15,52	18	3,65	65,61	0,27
FVIII204/VWF031	sc	1900/B*	AE144/AE288	16,3	20,63	2,87	59,14	0,35
FVIII205/VWF031	sc	18/B*	AE144/AE288	29,4	37,06	1,82	67,39	0,55

\* B indica uma sequência XTEN (por exemplo, 144) é inserida imediatamente a jusante do resíduo de aminoácido 745 correspondente a sequência madura de FVIII.

[000378] Além da incorporação de XTEN na molécula de FVIII, também avaliamos o potencial de benefício de extensão da meia-vida ao incorporar XTEN como um ligante entre o fragmento de D'D3 e Fc. FVIII-155 (scFVIII-Fc) foi co-expresso com VWF-034 (VWF-Fc com AE 288 XTEN mais um ligante clivável trombina de 35 resíduos) em células HEK293. No dia 4 pós a transfecção, o meio de cultura de células foi colhido e concentrado a 20 IU/mL com base no ensaio de atividade de FVIII. Camundongos DKO FVIII/VWF foram doseados com o meio de cultura celular concentrado a 200 IU/10 ml/kg com uma única injeção intravenosa. As amostras plasmáticas foram coletadas em 5 min, 8 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas após a administração. A atividade de FVIII de amostras plasmática foi analisada por análise cromogênica do FVIII, e a curva de regressão de atividade de FVIII no plasma como uma função do tempo foi representada graficamente (Figura 13). FVIII-155/VWF-034 apresentou a mesma melhoria da meia-vida como FVIII-169/VWF-031, que tem AE 288 XTEN inserida na junção de domínio B do FVIII, como ilustrado pelas curvas de regressão sobrepostas para as duas moléculas (Figura 13). A demonstração de que inserção de XTEN no polipeptídeo de VWF-Fc confere melhoria da meia-vida de uma magnitude semelhante ao conferido pela inserção XTEN na junção de domínio B do polipeptídeo FVIII sugere que outra melhoria da meia-vida pode ser possível em uma molécula heterodimérica em que inserção XTEN intramolecular no polipeptídeo de FVIII é combinada com inserção XTEN interdomínios entre os ele-

mentos de VWF e Fc do polipeptídeo Fc-VWF.

Exemplo 13A: Propriedades farmacocinéticas de heterodímeros FVIII-XTEN\_VWF adicionais

[000379] Para além dos heterodímeros de FVIII-XTEN VWF que foram listados na Tabela 22, os heterodímeros de FVIII-XTEN VWF contendo diferente composição de inserções XTEN, versão de cadeia única e cadeia dupla de FVIII (Tabela 23A) são testados ou serão testados em HemA por suas propriedades farmacocinéticas. Vários constructos de FVIII (Tabela 23B) e constructos de VWF (Tabela 23C) são também descritos abaixo. Camundongos HemA serão tratados com uma dose única de administração intravenosa das proteínas heterodiméricas a 200 IU/10 mL/kg. As amostras plasmática irão depois ser recolhidas em 5 min, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a dosagem. Atividade de FVIII das amostras plasmática será analisada por ensaio cromogênico FVIII e meia-vida será calculada utilizando o programa WinNonlin-Phoenix. As sequências de proteínas dos heterodímeros listados foram listadas na Tabela 25.

Tabela 23A. Combinações plausíveis de heterodímero FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc para melhoria de PK e atividade.

	pSYN VWF-015	pSYN VWF-031	pSYN VWF-034 **	pSYN VWF-036
pSYN FVIII 010	-	t <sub>1/2</sub> 8,7 h Camundongos DKO	A ser testado	-
pSYN FVIII 155	t <sub>1/2</sub> 6.3 h Camundongos DKO	t <sub>1/2</sub> 10,8 h Camundongos HemA	t <sub>1/2</sub> 18,6 h Camundongos HemA	t <sub>1/2</sub> 13,3 h Camundongos HemA
pSYN FVIII 169 **	-	t <sub>1/2</sub> 16,7 h Camundongos HemA	t <sub>1/2</sub> 31,1 h Camundongos HemA	-
pSYN FVIII 173 **	-	t <sub>1/2</sub> 15,2 h Camundongos DKO	t <sub>1/2</sub> 28,9 h Camundongos HemA	A ser testado
pSYN FVIII 205	-	t <sub>1/2</sub> 29,4 h Camundongos	t <sub>1/2</sub> 32,4 h Camundongos	t <sub>1/2</sub> 29,7 h Camundongos



	pSYN VWF-015	pSYN VWF-031	pSYN VWF-034 **	pSYN VWF-036
		HemA	HemA	HemA
pSYN FVIII 266	-	t <sub>1/2</sub> 24,5 h Camundongos HemA	t <sub>1/2</sub> 27,4 h Camundongos HemA	-
pSYN FVII 267	-	t <sub>1/2</sub> 23,0 h Camundongos HemA	t <sub>1/2</sub> 25,7 h Camundongos HemA	
pSYN FVIII 268	-	A ser testado	A ser testado	A ser testado
Isoforma de ca- deia dupla de pSYN FVIII 268		A ser testado	A ser testado	A ser testado
**comprimento de XTEN pode ser alterado para 72, 144, 288, 324, 333, 576, ou 864.				

Tabela 23B. Constructos FVIII:

<b>pSYN FVIII 010</b>	cadeia dupla FVIII Fc
<b>pSYN FVIII 169</b>	Cadeia simples FVIII Fc com 288 AE XTEN em domínio B
<b>pSYN FVIII 173</b>	cadeia dupla FVIII Fc com 288 AE XTEN em domínio B
<b>pSYN FVIII 195</b>	cadeia dupla FVIII Fc com duas 144 XTENs em aminoácido 1656 e 1900
<b>pSYN FVIII 196</b>	cadeia dupla FVIII Fc com três 144 XTENs em aminoácido 26, 1656 e 1900
<b>pSYN FVIII 199</b>	Cadeia simples FVIII Fc com duas 144 XTENs em aminoácido 1656 e 1900
<b>pSYN FVIII 201</b>	Cadeia simples FVIII Fc com três 144 XTENs em aminoácido 26, 1656 e 1900
<b>pSYN FVIII 203</b>	Cadeia simples FVIII Fc com 144 AE XTEN em aminoácido 1900 e 288 AE XTEN em domínio B
<b>pSYN FVIII 204</b>	Cadeia simples FVIII Fc com 144 AE XTEN em aminoácido 403 e 288 AE XTEN em domínio B
<b>pSYN FVIII 205</b>	Cadeia simples FVIII Fc com 144 AE XTEN em aminoácido 18 e 288 AE XTEN em domínio B
<b>pSYN FVIII 207</b>	Cadeia simples FVIII (sem Fc, sem XTEN)
<b>pSYN FVIII 266</b>	Cadeia simples FVIII Fc com 42 AE XTEN em aminoácido 18 e 288 AE XTEN em domínio B
<b>pSYN FVIII 267</b>	Cadeia simples FVIII Fc com 72 AE XTEN em aminoácido 18 e 288 AE XTEN em domínio B
<b>pSYN FVIII 268</b>	Cadeia simples FVIII Fc com 144 AE XTEN em aminoácido 18
<b>pSYN FVIII 269</b>	Cadeia simples FVIII Fc com 72 AE XTEN em aminoácido 18
<b>pSYN FVIII 271</b>	Cadeia simples FVIII Fc com 42 AE XTEN em aminoácido 18

<b>pSYN FVIII 272</b>	Cadeia simples FVIII com 144 AE XTEN em aminoácido 18 e 288 AE XTEN em domínio B (no Fc)
-----------------------	--

Tabela 23C. Constructos VWF:

<b>pSYN VWF031</b>	VWF-D1D2D'D3- 48aa de comprimento clivável por trombina GS ligante-Fc com C1099A/C1142A
<b>pSYN VWF034</b>	VWF-D1D2D'D3- 288AE XTEN +35aa de comprimento clivável por trombina GS ligante-Fc com C1099A/C1142A
<b>pSYN VWF035</b>	VWF-D1D2D'D3- 72aa de comprimento clivável por trombina GS ligante-Fc com C1099A/C1142A
<b>pSYN VWF036</b>	VWF-D1D2D'D3- 98aa de comprimento clivável por trombina GS ligante-Fc com C1099A/C1142A
<b>pSYN VWF041</b>	VWF-D1D2D'D3 com 288 AE XTEN in D3 e 48aa de comprimento clivável por trombina GS ligante após D3-Fc com C1099A/C1142A

Exemplo 13B: Propriedades farmacocinéticas de heterodímeros adicionais FVIII-XTEN\_VWF

[000380] Heterodímeros FVIII-XTEN\_VWF foram testados em camundongos HemA para suas propriedades farmacocinéticas. Os heterodímeros testados são FVIII169/VWF034, FVIII205/VWF034, FVIII205/VWF036 e FVIII266/VWF031. Camundongos HemA foram administrados com uma dose única intravenosa de várias proteínas de heterodímero a 200 IU/10 mL/kg. As amostras plasmáticas foram coletadas em 5 min, 24, 48, 72, 96 e 120 hrs após a dosagem. A atividade de FVIII das amostras plasmáticas foi analisada por ensaio cromogênico de FVIII, e meias-vidas foram calculadas usando o programa WinNonlin-Phoenix. Os resultados de PK são mostrados na Tabela 24.

Tabela 24. FVIII-XTEN\_VWF adicionais - PK em Camundongos HemA

Tratamento	5min recuperação (%)	HL (h)	MRT (h)	CI (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	AUC_D (h*kg*mlU/mL/mlU)	Veze de aumento de t <sub>1/2</sub> vs scBDD-FVIII
ScBDD-FVIII		7,16	10,16	4,83	44,44	0,23	-
FVIII169/VWF034	76	<b>31,1</b>	34,57	1,73	59,77	0,58	4,3
FVIII205/VWF034	68	<b>32,41</b>	39,79	1,55	61,73	0,64	4,6
FVIII205/VWF036	74	29,71	36,35	1,61	58,43	0,62	4,1
FVIII266/VWF031	66	24,45	22,75	2,67	60,83	0,37	3,4

pSYNFVIII 010 sequência de nucleotídeo-(Cadeia dupla FVIII<sub>FC</sub>)

(SEQ	ID	NO:	125)
1	ATGCAAATAG	AGCTCTCCAC	CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT
	TGCGATTCTG		
51	CTTTAGTGCC	ACCAGAAGAT	ACTACCTGGG TGCAGTGGAA
	CTGTCATGGG		
101	ACTATATGCA	AAGTGATCTC	GGTGAGCTGC CTGTGGACGC
	AAGATTTCTT		
151	CCTAGAGTGC	CAAAATCTTT	TCCATTCAAC ACCTCAGTCG
	TGTACAAAAA		
201	GACTCTGTTT	GTAGAATTCA	CGGATCACCT TTTCAACATC
	GCTAAGCCAA		
251	GGCCACCCTG	GATGGGTCTG	CTAGGTCCTA CCATCCAGGC
	TGAGGTTTAT		
301	GATACAGTGG	TCATTACACT	TAAGAACATG GCTTCCCATC
	CTGTCAGTCT		
351	TCATGCTGTT	GGTGTATCCT	ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA
	GCTGAATATG		
401	ATGATCAGAC	CAGTCAAAGG	GAGAAAGAAG ATGATAAAGT
	CTTCCCTGGT		
451	GGAAGCCATA	CATATGTCTG	GCAGGTCCTG AAAGAGAATG
	GTCCAATGGC		
501	CTCTGACCCA	CTGTGCCTTA	CCTACTCATA TCTTTCTCAT
	GTGGACCTGG		
551	TAAAAGACTT	GAATTCAGGC	CTCATTGGAG CCCTACTAGT
	ATGTAGAGAA		
601	GGGAGTCTGG	CCAAGGAAAA	GACACAGACC TTGCACAAAT
	TTATACTACT		
651	TTTGTCTGTA	TTTGATGAAG	GGAAAAGTTG GCACTCAGAA
	ACAAAGAACT		
701	CCTTGATGCA	GGATAGGGAT	GCTGCATCTG CTCGGGCCTG
	GCCTAAAAATG		
751	CACACAGTCA	ATGGTTATGT	AAACAGGTCT CTGCCAGGTC
	TGATTGGATG		
801	CCACAGGAAA	TCAGTCTATT	GGCATGTGAT TGGAATGGGC
	ACCACTCCTG		
851	AAGTGCATC	AATATTCCTC	GAAGGTCACA CATTTCTTGT
	GAGGAACCAT		
901	CGCCAGGCGT	CCTTGGAAT	CTCGCCAATA ACTTTCCTTA
	CTGCTCAAAC		
951	ACTCTTGATG	GACCTTGGAC	AGTTTCTACT GTTTTGTCAT
	ATCTCTTCCC		
1001	ACCAACATGA	TGGCATGGAA	GCTTATGTCA AAGTAGACAG
	CTGTCCAGAG		
1051	GAACCCCAAC	TACGAATGAA	AAATAATGAA GAAGCGGAAG
	ACTATGATGA		
1101	TGATCTTACT	GATTCTGAAA	TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
	GATGACAACT		

1151 CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA  
 TCCTAAAAC  
 1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT  
 ATGCTCCCTT  
 1251 AGTCCTCGCC CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT  
 TTGAACAATG  
 1301 GCCCTCAGCG GATTGGTAGG AAGTACAAAA AAGTCCGATT  
 TATGGCATA  
 1351 ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT ATTCAGCATG  
 AATCAGGAAT  
 1401 CTTGGGACCT TTACTTTATG GGAAGTTGG AGACACACTG  
 TTGATTATAT  
 1451 TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA  
 CGGAATCACT  
 1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAGGTG  
 TAAAACATTT  
 1551 GAAGGATTTT CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT  
 AAATGGACAG  
 1601 TGAAGTGTAGA AGATGGGCCA ACTAAATCAG ATCCTCGGTG  
 CCTGACCCGC  
 1651 TATTACTCTA GTTTCGTAA TATGGAGAGA GATCTAGCTT  
 CAGGACTCAT  
 1701 TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA  
 AGAGGAAACC  
 1751 AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT  
 ATTTGATGAG  
 1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC  
 TCCCAATCC  
 1851 AGCTGGAGTG CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC  
 AACATCATGC  
 1901 ACAGCATCAA TGGCTATGTT TTTGATAGTT TGCAGTTGTC  
 AGTTTGTTTG  
 1951 CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC ATTGGAGCAC  
 AGACTGACTT  
 2001 CCTTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA  
 ATGGTCTATG  
 2051 AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAACTGT  
 CTTTATGTCG  
 2101 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAACT  
 CAGACTTTTCG  
 2151 GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT  
 GACAAGAACA  
 2201 CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTTTCAGC  
 ATACTTGCTG  
 2251 AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC TTCTCTCAAA  
 ACCCACCAGT  
 2301 CTTGAAACGC CATCAACGGG AAATAACTCG TACTACTCTT  
 CAGTCAGATC  
 2351 AAGAGGAAAT TGAATATGAT GATACCATAT CAGTTGAAAT  
 GAAGAAGGAA

2401 GATTTTGACA TTTATGATGA GGATGAAAAT CAGAGCCCCC  
 GCAGCTTTCA  
 2451 AAAGAAAACA CGACACTATT TTATTGCTGC AGTGGAGAGG  
 CTCTGGGATT  
 2501 ATGGGATGAG TAGCTCCCCA CATGTTCTAA GAAACAGGGC  
 TCAGAGTGGC  
 2551 AGTGTCCCTC AGTTCAAGAA AGTTGTTTTT CAGGAATTTA  
 CTGATGGCTC  
 2601 CTTTACTCAG CCCTTATACC GTGGAGAACT AAATGAACAT  
 TTGGGACTCC  
 2651 TGGGGCCATA TATAAGAGCA GAAGTTGAAG ATAATATCAT  
 GGTAACCTTC  
 2701 AGAAATCAGG CCTCTCGTCC CTATTCCTTC TATTCTAGCC  
 TTATTTCTTA  
 2751 TGAGGAAGAT CAGAGGCAAG GAGCAGAACC TAGAAAAAAC  
 TTTGTCAAGC  
 2801 CTAATGAAAC CAAAACCTAC TTTTGAAAG TGCAACATCA  
 TATGGCACCC  
 2851 ACTAAAGATG AGTTTGAAGT CAAAGCCTGG GCTTATTTCT  
 CTGATGTTGA  
 2901 CCTGGAAAAA GATGTGCACT CAGGCCTGAT TGGACCCCTT  
 CTGGTCTGCC  
 2951 AACTAACAC ACTGAACCCT GCTCATGGGA GACAAGTGAC  
 AGTACAGGAA  
 3001 TTTGCTCTGT TTTTCACCAT CTTTGATGAG ACCAAAAGCT  
 GGTACTTCAC  
 3051 TGAATATATG GAAAGAACT GCAGGGCTCC CTGCAATATC  
 CAGATGGAAG  
 3101 ATCCCACTTT TAAAGAGAAT TATCGCTTCC ATGCAATCAA  
 TGGCTACATA  
 3151 ATGGATACAC TACCTGGCTT AGTAATGGCT CAGGATCAAA  
 GGATTCGATG  
 3201 GTATCTGCTC AGCATGGGCA GCAATGAAAA CATCCATTCT  
 ATTCATTTCA  
 3251 GTGGACATGT GTTCACTGTA CGAAAAAAG AGGAGTATAA  
 AATGGCACTG  
 3301 TACAATCTCT ATCCAGGTGT TTTTGAGACA GTGGAAATGT  
 TACCATCCAA  
 3351 AGCTGGAATT TGGCGGGTGG AATGCCTTAT TGGCGAGCAT  
 CTACATGCTG  
 3401 GGATGAGCAC ACTTTTTCTG GTGTACAGCA ATAAGTGTC  
 GACTCCCCTG  
 3451 GGAATGGCTT CTGGACACAT TAGAGATTTT CAGATTACAG  
 CTTCAGGACA  
 3501 ATATGGACAG TGGGCCCCAA AGCTGGCCAG ACTTCATTAT  
 TCCGGATCAA  
 3551 TCAATGCCTG GAGCACCAG GAGCCCTTTT CTTGGATCAA  
 GGTGGATCTG  
 3601 TTGGCACCAA TGATTATTCA CGGCATCAAG ACCCAGGGTG  
 CCCGTCAGAA

3651 GTTCTCCAGC CTCTACATCT CTCAGTTTAT CATCATGTAT  
 AGTCTTGATG  
 3701 GGAAGAAGTG GCAGACTTAT CGAGGAAATT CCACTGGAAC  
 CTTAATGGTC  
 3751 TTCTTTGGCA ATGTGGATTC ATCTGGGATA AAACACAATA  
 TTTTAAACCC  
 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 CCAAAAGAGT GGCTGCAAGT GGAATTCCAG 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  
 CTTTGAATTC  
 4301 ACCCCCAGAG TTGGGTGCAC CAGATTGCCC TGAGGATGGA  
 GGTTCCTGGGC  
 4351 TGCGAGGCAC AGGACCTCTA CGACAAAAC CACACATGCC  
 CACCGTGCCC  
 4401 AGCTCCAGAA CTCCTGGGCG GACCGTCAGT CTTCTCTTC  
 CCCCCAAAAC  
 4451 CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC  
 ATGCGTGGTG  
 4501 GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT  
 GGTACGTGGA  
 4551 CGGCGTGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG  
 GAGCAGTACA  
 4601 ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA  
 CCAGGACTGG  
 4651 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG  
 CCTTCCAGC  
 4701 CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC  
 CGAGAACCAC  
 4751 AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA  
 GAACCAGGTC  
 4801 AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA  
 TCGCCGTGGA  
 4851 GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC  
 ACGCCTCCCG  
  
 4901 TGTTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT  
 CACCGTGGAC  
 4951 AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG  
 TGATGCATGA  
 5001 GGCTCTGCAC AACCCTACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG  
 TCTCCGGGTA  
 5051 AATGA

pSYNFVIII 010 sequência de proteína-(Cadeia dupla FVIII<sub>FC</sub>) (SEQ ID NO: 126)

```

1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL
  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 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 PILPGEIFKY KWTVTVEDGP
  TKSDPRCLTR
551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR
  NVILFSVFDE
601 NRSWYLTEI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
  FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF
  PFSGETVFMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYIED
  SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITRTTL QSDQEEIDYD
  DTISVEMKKE
801 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
  HVLRNRAQSG
851 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPIYRA
  EVEDNIMVTF
901 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY
  FWKVQHMAP
951 TKDEFDCAW AYFSDVDLEK DVHSGGLIGPL LVCHTNTLNP
  AHGRQVTVQE
1001 FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN
  YRFHAINGYI

```

```

1051  MDTLPGLVMA QDQIRRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV
      RKKEEYKMAL
1101  YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL
      VYSNKCQTPL
1151  GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK
      EPFSWIKVDL
1201  LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY
      RGNSTGTLMV
1251  FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME
      LMGCDLNSCS
1301  MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR
      SNAWRPQVNN
1351  PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISSS
      QDGHQWTLFF
1401  QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH
      QIALRMEVLG
1451  CEAQDLYDKT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
      SRTPEVTCVV
1501  VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
      SVLTVLHQDW
1551  LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
      SRDELTKNQV
1601  SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS
      FFLYSKLTVD
1651  KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

```

**Exemplo 14:** Uma nova classe de moléculas de fator VIII de coagulação com mais do que três vezes a extensão meia-vida em camundongos com hemofilia A

[000381] A nova classe de moléculas de FVIII foi concebida para conter dois polipeptídeos; um que consiste em um FVIII sem o domínio B de cadeia única (BDD) com XTEN inserida em um ou mais locais dentro da sequência de FVIII, e um que é um composto da região de D'D3 de VWF. Cada polipeptídeo foi também fundido de modo recombinante com a região Fc da IgG1 para permitir que a região D'D3 seja corretamente alinhada para ligar a fração de FVIII. As variantes de FVIII resultantes foram expressas em células HEK 293, por transfecção transitória, e purificadas a partir do meio condicionado. Atividade



de FVIII foi avaliada por ensaio cromogênico de FVIII e as propriedades farmacocinéticas foram avaliadas em ambos camundongos knockout FVIII (HemA) e duplo knockout FVIII/VWF (DKO).

[000382] Incorporar região XTEN e D'D3 de VWF em rFVIII levou ao desacoplamento da eliminação das proteínas de fusão de VWF endógeno enquanto estende sua meia-vida de circulação. FVIII nesta configuração de fusão está completamente protegido contra a interagir com VWF, como medido por análise de interferometria de biocamada (Octeto). Consistente com isto, os perfis farmacocinéticos em camundongos HemA e DKO foram considerados idênticos, indicando que a sua taxa de eliminação em camundongos foi efetivamente desconectada do VWF. Otimização de comprimento XTEN e os sítios de inserção XTEN identificaram um subconjunto de proteínas que excedeu o limite de VWF (16 horas), atingindo uma meia-vida de circulação de até 30 horas em camundongos HemA que representam uma melhoria de 4 vezes em relação a BDD- FVIII. É importante notar que estas proteínas mantiveram a sua funcionalidade, como avaliado por ensaio cromogênico de FVIII.

[000383] A dependência VWF estabeleceu uma limitação fundamental para a meia-vida do FVIII terapêutico. O desacoplamento de FVIII de vias de eliminação de VWF enquanto estende a meia-vida pela fusão da região D'D3 de VWF e XTEN gerou uma nova molécula de FVIII com uma extensão meia-vida de 4 vezes. Este é o primeiro relatório de um FVIII modificado que tenha excedido o limite de meia-vida observada através de esforços de toda a indústria no desenvolvimento de FVIII de longa duração, o que representa um avanço significativo no tratamento potencialmente profilático de hemofilia A.

Tabela 25: As sequências de proteínas de FVIII-XTEN-Fc e Fc-VWF constructos

FVIII 195 sequência de proteína (cadeia dupla FVIII-Fc com duas 144 AE XTENs em aminoácido 1656 e 1900) (SEQ ID NO: 105)

```

1      MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL
      GELPVDARFP
51  PRVPKSFPEF 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 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR
      KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR
      PYNIYPHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP
      TKSDPRCLTR
551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR
      NVILFSVFDE

```

601 NRSWYLTE NI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV  
 FDSLQLSVCL  
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF  
 PFSGETVFM  
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED  
 SYEDISAYLL  
 751 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITRTTL QGAPGTPGSG  
 TASSSPGASP  
 801 GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST  
 GTGPGTPGSG  
 851 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG  
 SPGSSTPSGA  
 901 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD  
 DTISVEMKKE  
 951 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP  
 HVLRNRAQSG  
 1001 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA  
 EVEDNIMVTF  
 1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY  
 FWKVQHMAP  
 1101 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP  
 AHGRQVTVQE  
 1151 FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG  
 SEPATSGSET  
 1201 PGTSSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS  
 TEPSEGSAPG  
 1251 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEESGSPAG  
 SPTSTEESGTS  
 1301 ESATPESGPG TSTEPSEGS A PGASSAPCNI QMEDPTFKEN  
 YRFHAINGYI  
 1351 MDTLPLGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV  
 RKKEEYKMAL  
 1401 YNLYPGVFET VEMLPKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL  
 VYSNKCQTPL  
 1451 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK  
 EPFSWIKVDL  
 1501 LAPMIIHGK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY  
 RGNSTGTLMV  
 1551 FFGNVDSGSI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME  
 LMGC DLNSCS  
 1601 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR  
 SNAWRPQVNN  
 1651 PKEWLQVDFQ KTMKVTVGTT QGVKSLLTSM YVKEFLISS  
 QDGHQWTLFF  
 1701 QNGKVVFQ NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH  
 QIALRMEVLG  
 1751 CEAQDLYDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI  
 SRTPEVTCVV  
 1801 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV  
 SVLTVLHQDW  
  
 1851 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP  
 SRDELTKNQV  
 1901 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS  
 FFLYSKLTVD  
 1951 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK\*

FVIII 196 sequência de proteína (cadeia dupla FVIIIc com três 144AE XTENs em aminoácido 26, 1656 e 1900) (SEQ ID NO: 106)

```

1      MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQSDI
GELPVGAPGS
51    SPSASTGTGP GSSPSASTGT GPGASPGTSS TGSPGASPGT
SSTGSPGSST
101   PSGATGSPGS SPSASTGTGP GASPGTSSTG SPGSSPSAST
GTGPGTPGSG
151   TASSSPGSST PSGATGSPGS STPSGATGSP GASPGTSSTG
SPASSDARFP
201   PRVPKSFPFN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL
LGPTIQAEVY
251   DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKA SEG AEYDDQTSQR
EKEDDKVFPG
301   GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG
LIGALLVCRE
351   GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD
AASARAWPKM
401   HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL
EGHTFLVRNH
451   RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME
AYVKVDSCPE
501   EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI
RSVAKKHPKT
551   WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR
KYKKVRFMAY
601   TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR
PYNIIYPHGIT
651   DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP
TKSDPRCLTR
701   YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR
NVILFSVFDE
751   NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
FDSLQLSVCL
801   HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEYEDTLTLF
PFSGETVFMS
851   MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYIED
SYEDISAYLL
901   SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITR TTL QGAPGTPGSG
TASSSPGASP
951   GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST
GTGPGTPGSG
1001  TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG
SPGSSTPSGA

```

1051 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD  
 DTISVEMKKE  
 1101 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP  
 HVLRNRAQSG  
 1151 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA  
 EVEDNIMVTF  
 1201 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY  
 FWKVQHMAP  
 1251 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP  
 AHGRQVTVQE  
 1301 FALFFTIFDE TKSIFYFTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG  
 SEPATSGSET  
 1351 PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS  
 TEPSEGSAPG  
 1401 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEESGSPAG  
 SPTSTEEGTS  
 1451 ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN  
 YRFHAINGYI  
 1501 MDTLPGLVMA QDQIRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV  
 RKKEEYKMAL  
 1551 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL  
 VYSNKCQTPL  
 1601 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK  
 EPFSWIKVDL  
 1651 LAPMIIHGK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY  
 RGNSTGTLMV  
 1701 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME  
 LMGCDLNSCS  
 1751 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR  
 SNAWRPQVNN  
 1801 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISS  
 QDGHQWTLFF  
 1851 QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH  
 QIALRMEVLG  
 1901 CEAQDLYDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI  
 SRTPEVTCVV  
 1951 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV  
 SVLTVLHQDW  
 2001 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP  
 SRDELTKNQV  
 2051 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS  
 FFLYSKLTVD  
 2101 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK\*

FVIII 199 sequência de proteína (cadeia simples FVIII<sub>FC</sub> com três 144AE XTENs em aminoácido 1656 e 1900) (SEQ ID NO: 107)

```

1      MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL
      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    HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL
      EGHTFLVRNH
301    RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME
      AYVKVDSCPE
351    EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI
      RSVAKKHPKT
401    WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR
      KYKKVRFMAY
451    TDETFTKREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR
      PYNIYPHGIT
501    DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP
      TKSDPRCLTR
551    YYSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR
      NVILFSVFDE
601    NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
      FDSLQLSVCL
651    HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF
      PFSGETVFMS
701    MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED
      SYEDISAYLL
751    SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQAEITRTTL QGAPGTPGSG
      TASSSPGASP
801    GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST
      GTGPGTPGSG
851    TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG
      SPGSSTPSGA
901    TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD
      DTISVEMKKE
951    DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
      HVLNRNRAQSG
1001   SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPIYRA
      EVEDNIMVTF
1051   RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY
      FWKVQHMAP
1101   TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGILIGPL LVCHTNTLNP
      AHGRQVTVQE
1151   FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG
      SEPATSGSET
1201   PGTSESATPE SGPGSEPA TS GSETPGTSES ATPESGPGTS
      TEPSEGSAPG
1251   TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG
      SPTSTEEGTS
1301   ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN
      YRFHAINGYI

```

1351 MDTLPGLVMA QDQIRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV  
 RKKEEYKMAL  
 1401 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL  
 VYSNKCQTPL  
 1451 GMASGHIRDF QITASGQYGO WAPKLARLHY SGSINAWSTK  
 EPFSWIKVDL  
 1501 LAPMIIHGK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY  
 RGNSTGTLMV  
 1551 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME  
 LMGC DLNSCS  
 1601 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR  
 SNAWRPQVNN  
 1651 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISS  
 QDGHQWTLFF  
 1701 QNGKVKVFQ NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH  
 QIALRMEVLG  
 1751 CEAQDLYDKT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI  
 SRTPEVTCVV  
 1801 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV  
 SVLTVLHQDW  
 1851 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP  
 SRDELTKNQV  
 1901 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS  
 FFLYSKLTVD  
 1951 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK\*

### FVIII 201 sequência de proteína (cadeia simples FVIII<sub>FC</sub> com três 144

### AE XTENs em aminoácido 26, 1656 & 1900) (SEQ ID NO: 108)

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL  
 GELPVGAPGS  
 51 SPSASTGTGP GSSPSASTGT GPGASPGTSS TGSPGASPGT  
 SSTGSPGSST  
 101 PSGATGSPGS SPSASTGTGP GASPGTSSTG SPGSSPSAST  
 GTGPGTPGSG  
 151 TASSSPGSST PSGATGSPGS STPSGATGSP GASPGTSSTG  
 SPASSDARFP  
 201 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL  
 LGPTIQAEVY  
 251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR  
 EKEDDKVFP  
 301 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG  
 LIGALLVCRE  
 351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD  
 AASARAWPKM  
 401 HTVNGYVNRN LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL  
 EGHTFLVRNH  
 451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME  
 AYVKVDSCPE  
 501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI  
 RSVAKKHPKT

551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR  
 KYKKVRFMAY  
 601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR  
 PYNIPHGIT  
 651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP  
 TKSDPRCLTR  
 701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR  
 NVILFSVFDE  
 751 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV  
 FDSLQLSVCL  
 801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYT FKHK MVYEDTLTLF  
 PFSGETVFMS  
 851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYIED  
 SYEDISAYLL  
 901 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQAEITRTTL QGAPGTPGSG  
 TASSSPGASP  
 951 GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST  
 GTGPGTPGSG  
 1001 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG  
 SPGSSTPSGA  
 1051 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD  
 DTISVEMKKE  
 1101 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP  
 HVLRNRAQSG  
 1151 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPIYIRA  
 EVEDNIMVTF  
 1201 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY  
 FWKVQHMAP  
 1251 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP  
 AHGRQVTVQE  
 1301 FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG  
 SEPATSGSET  
 1351 PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS  
 TEPSEGSAPG  
 1401 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEESGSPAG  
 SPTSTEEGTS  
 1451 ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN  
 YRFHAINGYI  
 1501 MDTLPGLVMA QDQIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV  
 RKKEEYKMAL  
 1551 YNLYPGVFET VEMPLSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL  
 VYSNKCQTPL  
 1601 GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK  
 EPFSWIKVDL  
 1651 LAPMIIHGK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY  
 RGNSTGTLMV  
 1701 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME  
 LMGCDLNSCS  
 1751 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR  
 SNAWRPQVNN



```

1801 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISSS
    QDGHQWTLFF
1851 QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH
    QIALRMEVLG
1901 CEAQDLYDKT HTPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
    SRTPEVTCVV
1951 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV
    SVLTVLHQDW
2001 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
    SRDELTKNQV
2051 SLTCLVKGFY PS DIAVEWES NGQ PENNYKT TPPVLDSGGS
    FFLYSKLTVD
2101 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

```

**FVIII 203 sequência de proteína (cadeia simples FVIII<sub>Fc</sub> com duas AE  
XTENs; uma 288AE XTEN em domínio B e uma 144 AE XTEN em  
aminoácido 1900) (SEQ ID NO: 109)**

```

1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL
    GELPVDARFP
51  PRVPKSF PFN TSVVYKKT LF VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL
    LGPTIQAEVY
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKA SEG 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 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR
    KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR
    PYNIYPHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP
    TKSDPRCLTR
551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR
    NVILFSVFDE
601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
    FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF
    PFSGETV FMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED
    SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET
    PGTSESATPE
801 SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
    SPAGSPTSTE

```

851 EGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGSP  
 AGSPTSTEEG  
 901 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES  
 ATPESGPGTS  
 951 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP  
 TSTEEGTSTE  
 1001 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE  
 SGPGTSTEPS  
 1051 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE  
 MKKEDFDIYD  
 1101 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR  
 AQSGSVPQFK  
 1151 KVVFEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI  
 MVTFRNQASR  
 1201 PYSFYSSLIS YEEDQRQGA PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH  
 HMAPTKDEFD  
 1251 CKAWAYFSDV DLEKDVHSL IGPLLCHTN TLNPAHGRQV  
 TVQEFALFFT  
 1301 IFDETKSWYF TENMERNCRG APTSESATPE SGPGSEPATS  
 GSETPGTSES  
 1351 ATPESGPGSE PATSGSETPG TSESATPESG PGTSTEPSEG  
 SAPGTSESAT  
 1401 PESGPGSPAG SPTSTEEGSP AGSPTSTEEG SPAGSPTSTE  
 EGTSESATPE  
 1451 SGPGTSTEPS EGSAPGASSA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI  
 NGYIMDTLPG  
 1501 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY  
 KMALYNLYPG  
 1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC  
 QTPLGMASGH  
 1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI  
 KVDLLAPMII  
 1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG  
 TLMVFFGNVD  
 1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL  
 NSCSMPLGME  
 1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP  
 QVNNPKEWLQ  
 1801 VDFQKTMKVT GVTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW  
 TLFFQNGKVK  
 1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM  
 EVLGCEAQDL  
 1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV  
 TCVVVDVSHE  
 1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL  
 HQDWLNGKEY  
 2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT  
 KNQVSLTCLV  
 2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQ  
 2101 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK\*

FVIII 204 sequência de proteína (cadeia simples FVIII<sub>FC</sub> com duas AE XTENS; uma 288AE XTEN em domínio B e uma 144 AE XTEN em aminoácido 403) (SEQ ID NO: 110)

```

1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL
  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 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL
  EGHTFLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME
  AYVKVDSCPE
351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI
  RSVAKKHPKT
401 WWHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDGAPTSTEP SEGSA PGSPA
  GSPTSTEEGT
451 STEPSEGSAP GTSTEPSEGS APGTSESATP ESGPGTSTEP
  SEGSA PGTSE
501 SATPESGPGS EPATSGSETP GTSTEPSEGS APGTSTEPSE
  GSAPGTSESA
551 TPESGPGTSE SATPESGPGA SSDRSYKSQY LNNGPQRIGR
  KYKKVRFMAY
601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR
  PYNIIYPHGIT
651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP
  TKSDPRCLTR
701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR
  NVILFSVFDE
751 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
  FDSLQLSVCL
801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYT FKHK MVYEDTLTLF
  PFSGETVFM S
851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED
  SYEDISAYLL
901 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET
  PGTSESATPE
951 SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
  SPAGSPTSTE
1001 EGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGSP
  AGSPTSTEEG
1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES
  ATPESGPGTS
1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP
  TSTEEGTSTE

```

1151 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE  
 SGPGTSTEPS  
 1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE  
 MKKEDFDIYD  
 1251 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR  
 AQSGSVPQFK  
 1301 KVVFEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI  
 MVTFRNQASR  
 1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH  
 HMAPTKDEFD  
 1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV  
 TVQEFALFFT  
 1451 IFDETKSWYF TENMERN CRA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI  
 NGYIMDTLPG  
 1501 LVMAQDQIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY  
 KMALYNLYPG  
 1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC  
 QTPLGMA SGH  
 1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI  
 KVDLLAPMII  
 1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG  
 TLMVFFGNVD  
 1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL  
 NSCSMPLGME  
 1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP  
 QVNNPKEWLQ  
 1801 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW  
 TLFFQNGKVK  
 1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM  
 EVLGCEAQDL  
 1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV  
 TCVVVDVSHE  
 1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL  
 HQDWLNGKEY  
 2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT  
 KNQVSLTCLV  
 2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQ  
 2101 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK\*

FVIII 205 sequência de proteína (cadeia simples FVIII<sub>FC</sub> com duas AE XTENS; uma 288AE XTEN em domínio B e uma 144 AE XTEN em aminoácido 18) (SEQ ID NO: 111)

```

1  MQIELSTCFF    LCLLRFCFSA    TRRYYLGAVE    LSWDYMQGAP
TSESATPESG
51  PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
    ESATPESGPG
101 TSTEPSEGS A PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA
    TSGSETPGTS

151 ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSSDL
    GELPVDARFP
201 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL
    LGPTIQAEVY
251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR
    EKEDDKVFPG
301 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG
    LIGALLVCRE
351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD
    AASARAWPKM
401 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL
    EGHTFLVRNH
451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME
    AYVKVDSCPE
501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI
    RSVAKKHPKT
551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDRSYKSQY LNNGPQRIGR
    KYKKVRFMAY
601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDIT LIIFKNQASR
    PYNIYPHGIT
651 DVRELYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP
    TKSDPRCLTR
701 YYSFVNMR DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR
    NVILFSVFDE
751 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
    FDSLQLSVCL
801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF
    PFSGETVFMS
851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED
    SYEDISAYLL
901 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET
    PGTSESATPE
951 SGPGSEPAT S GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
    SPAGSPTSTE
1001 EGTSESATPE SGPGSEPAT S GSETPGTSES ATPESGPGSP
    AGSPTSTEEG
1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES
    ATPESGPGTS
1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP
    TSTEETSTTE
1151 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE
    SGPGTSTEPS
1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE
    MKKEDFDIYD
1251 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR
    AQSGSVPPQFK
1301 KVVFPQFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI
    MVTFRNQASR
1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH
    HMAPTKDEFD

```

1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCNTN TLNPAHGRQV  
 TVQEFALFFT  
 1451 IFDETKSWYF TENMERNCR PCNIQMEDPT FKENYRFHAI  
 NGYIMDTLPG  
 1501 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY  
 KMALYNLYPG  
 1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC  
 QTPLGMASGH  
 1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI  
 KVDLLAPMII  
 1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG  
 TLMVFFGNVD  
 1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL  
 NSCSMPLGME  
 1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP  
 QVNNPKEWLQ  
 1801 VDFQKTMKVT GVTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW  
 TLFFQNGKVK  
 1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM  
 EVLGCEAQDL  
 1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV  
 TCVVVDVSHE  
 1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL  
 HQDWLNGKEY  
 2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT  
 KNQVSLTCLV  
 2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQ  
 2101 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK\*

**pSYN FVIII 266 sequência de proteína (FVIII Fc com 42 AE-XTEN em aminoácido 18 e 288 AE XTEN em domínio B) SEQ ID NO: 112**

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP  
 GSPAGSPTST  
 51 EEGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPASSS DLGELPVDAR  
 FPPRVPKSFP  
 101 FNTSVVYKKT LFVEFTDHLF NIAKPRPPWM GLLGPTIQAE  
 VYDTVVITLK  
 151 NMASHPVSLH AVGVSYWKAS EGAEYDDQTS QREKEDDKVF  
 PGGSHTYVWQ  
 201 VLKENGPMAS DPLCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC  
 REGSLAKEKT  
 251 QTLHKFILLF AVFDEGKSWH SETKNLSMQD RDAASARAWP  
 KMHTVNGYVN  
 301 RSLPGLIGCH RKSVMWHVIG MGTTPPEVHSI FLEGHTFLVR  
 NHRQASLEIS  
 351 PITFLTAQTL LMDLGQFLLF CHISSHQHDG MEAYVKVDSC  
 PEEPQLRMKN  
 401 NEEAEDYDDD LTDSEMDVVR FDDDNSPSFI QIRSVAKKHP  
 KTWVHYIAAE

451 EEDWDYAPLV LAPDDRSYKS QYLNNGPQRI GRKYKKVRFM  
 AYTDETFKTR  
 501 EAIQHESGIL GPLLYGEVGD TLLIIFKNQA SRPYNIYPHG  
 ITDVRPLYSR  
 551 RLPKGVKHLK DFPILPGEIF KYKWTVTVED GPTKSDPRCL  
 TRYISSFVNM  
 601 ERDLASGLIG PLLICYKESV DQRGNQIMSD KRNVLFSVF  
 DENRSWYLTE  
 651 NIQRFLPNPA GVQLEDPEFQ ASNIMHSING YVFDSLQLSV  
 CLHEVAYWYI  
 701 LSIGAQTDFL SVFFSGYTFK HKMVYEDTLT LFPFSGETVF  
 MSMENPGLWI  
 751 LGCHNSDFRN RGMTALLKVS SCDKNTGDYY EDSYEDISAY  
 LLSKNNAIEP  
 801 RSFSQNGAPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT  
 PESGPGSEPA  
 851 TSGSETPGTS ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGSPAGSPTS  
 TEEGTSESAT  
 901 PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG SPAGSPTSTE  
 EGSPAGSPTS  
 951 TEEGTSTEPS EGSAPGTSES ATPESGPGTS ESATPESGPG  
 TSESATPESG  
 1001 PGSEPATSGS ETPGSEPATS GSETPGSPAG SPTSTEEGTS  
 TEPSEGSAPG  
 1051 TSTEPSEGSA PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGTSTE  
 PSEGSAPASS  
 1101 PPVLKRHQAE ITRTTLQSDQ EEIDYDDTIS VEMKKEDFDI  
 YDEDENQSPR  
 1151 SFQKKTRHYF IAAVERLWDY GMSSSPHVLR NRAQSGSVPQ  
 FKKVVFQEFT  
 1201 DGSFTQPLYR GELNEHLGLL GPYIRAEVED NIMVTFRNQA  
 SRPYSFYSSL  
 1251 ISYEEDQRQG AEPRKNFVKP NETKTYFWKV QHHMAPTKDE  
 FDCKAWAYFS  
 1301 DVDLEKDVHS GLIGPLLCH TNTLNPAHGR QVTVQEFALF  
 FTIFDETKSW  
 1351 YFTENMERNR RAPCNIQMED PTFKENYRFH AINGYIMDTL  
 PGLVMAQDQR  
 1401 IRWYLLSMGS NENIHSIHFS GHVFTVRKKE EYKMALYNLY  
 PGVFETVEML  
 1451 PSKAGIWRVE CLIGEHLHAG MSTLFLVYSN KCQTPLGMAS  
 GHIRDFQITA  
 1501 SGQYGQWAPK LARLHYSISI NAWSTKEPFS WIKVDLLAPM  
 IIHGIKTQGA  
 1551 RQKFSSLYIS QFIIMYSLDG KKWQTYRGNS TGTLMVFFGN  
 VDSSGIKHNI  
 1601 FNPPIIARYI RLHPHTHSIR STLRMELMGC DLNSCSMPLG  
 MESKAISDAQ  
 1651 ITASSYFTNM FATWSPSKAR LHLQGRSNAW RPQVNNPKEW  
 LQVDFQKTMK

```

1701 VTGVTTQGVK SLLTSMYVKE FLISSSQDGH QWTLFFQNGK
    VKVFQGNQDS
1751 FTPVVNSLDP PLLTRYLRH PQSWVHQIAL RMEVLGCEAQ
    DLYDKTHTCP
1801 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
    HEDPEVKFNW
1851 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
    EYKCKVSNKA
1901 LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
    LVKGFYPSDI
1951 AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
    QQGNVFSCSV
2001 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK *

```

**pSYN FVIII 267 sequência de proteína (FVIII Fc com 72 AE-XTEN em aminoácido 18 e 288**

**AE XTEN em domínio B) SEQ ID NO: 113**

```

1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP
    TSESATPESG
51  PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
    ESATPESGPG
101 TSTEPSEGS A PGASSSDLGE LPVDARFPPR VPKSFPPNTS
    VVYKKTLEVE
151 FTDHLFNI A PRPPWMGLLG PTIQAEVYDT VVITLKNMAS
    HPVSLHAVGV
201 SYWKASEGAE YDDQTSQREK EDDKVFPFGS HTYVWQVLKE
    NGPMASDPLC
251 LTYSYLSHVD LVKDLNSGLI GALLVCREGS LAKEKTQTLH
    KFILLFAVFD
301 EGKSWHSETK NSLMQDRDAA SARAWPKMHT VNGYVNRSLP
    GLIGCHRKSV
351 YWHVIGMGTT PEVHSIFLEG HTFLVRNHRQ ASLEISPITF
    LTAQTLLMDL
401 GQFLLFCHIS SHQHDGMEAY VKVDSCPEEP QLRMKNNEEA
    EDYDDDLTDS
451 EMDVVRFDDD NSPSFIQIRS VAKKHPKTWV HYIAAEEEDW
    DYAPLVLAPD
501 DRSYKSQYLN NGPQRIGRKY KKVRFMAYTD ETFKTREAIQ
    HESGILGPLL
551 YGEVGDTLII IFKNQASRPY NIYPHGITDV RPLYSRRLPK
    GVKHLKDFPI
601 LPGEIFKYKW TVTVEDGPTK SDPRCLTRYI SSFVNMERDL
    ASGLIGPLLI
651 CYKESVDQRG NQIMSDKRN I LFSVFDENR SWYLTENIQR
    FLPNPAGVQL
701 EDPEFQASNI MHSINGYVFD SLQLSVCLHE VAYWYILSIG
    AQTDFLSVFF
751 SGYTFKHKMW YEDTLTLFPP SGETVFMSME NPGLWILGCH
    NSDFRNRGMT
801 ALLKVSSCDK NTGDYYEDSY EDISAYLLSK NNAIEPRSF
    QNGAPGTSES

```



851 ATPESGPGSE PATSGSETPG TSESATPESG PGSEPATSGS  
 ETPGTSESAT  
 901 PESGPGTSTE PSEGSAPGSP AGSPTSTEEG TSESATPESG  
 PGSEPATSGS  
 951 ETPGTSESAT PESGPGSPAG SPTSTEEGSP AGSPTSTEEG  
 TSTEPSEGS  
 1001 PGTSESATPE SGPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGSE  
 PATSGSETPG  
 1051 SEPATSGSET PGSPAGSPTS TEEGTSTEPS EGSAPGTSTE  
 PSEGSAPGSE  
 1101 PATSGSETPG TSESATPESG PGTSTEPSEG SAPASSPPVL  
 KRHQAEITRT  
 1151 TLQSDQEEID YDDTISVEMK KEDFDIYDED ENQSPRSFQK  
 KTRHYFIAAV  
 1201 ERLWDYGMSS SPHVLRNRAQ SGSVPQFKKV VFQEFTDGSF  
 TQPLYRGELN  
 1251 EHLGLLGPYI RAEVEDNIMV TFRNQASRPY SFYSSLISYE  
 EDQRQGAEP  
 1301 KNFVKPNETK TYFWKVQHMM APTKDEFDCK AWAYFSDVDL  
 EKDVHSGLIG  
 1351 PLLVCHTNTL NPAHGRQVTV QEFALFFTIF DETKSWYFTE  
 NMERNCRAPC  
 1401 NIQMEDPTFK ENYRFHAING YIMDTLPGLV MAQDQIRRWY  
 LLSMGSNENI  
 1451 HSIHFSGHVF TVRKKEEYKM ALYNLYPGVF ETVEMLPSKA  
 GIWRVECLIG  
 1501 EHLHAGMSTL FLVYSNKCQT PLGMASGHIR DFQITASGQY  
 GQWAPKLARL  
 1551 HYSGSINAWS TKEPFSWIKV DLLAPMIIHG IKTQGARQKF  
 SSLYISQFII  
 1601 MYSLDGKKWQ TYRGNSTGTL MVFFGNVDSS GIKHNIFNPP  
 IIARYIRLHP  
 1651 THYSIRSTLR MELMGCDLNS CSMPLGMESK AISDAQITAS  
 SYFTNMFATW  
 1701 SPSKARLHLQ GRSNAWRPQV NNPKEWLQVD FQKTMKVTGV  
 TTQGVKSLLT  
 1751 SMYVKEFLIS SSQDGHQWTL FFQNGKVQVF QGNQDSFTPV  
 VNSLDPPLLT  
 1801 RYLRIHPQSW VHQIALRMEV LGCEAQDLYD KTHTCPPCPA  
 PELLGGPSVF  
 1851 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG  
 VEVHNAKTKP  
 1901 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP  
 IEKTISKAKG  
 1951 QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW  
 ESNGQPENNY  
 2001 KTHPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA  
 LHNHYTQKSL  
 2051 SLSPGK\*

pSYN FVIII 268 sequência de proteína (FVIII Fc com 144 AE-XTEN em aminoácido 18) SEQ ID NO: 114

```

1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQGAP
   TSESATPESG
51  PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
   ESATPESGPG
101 TSTEPSEGSa PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA
   TSGSETPGTS
151 ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSSDL
   GELPVDARFP
201 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL
   LGPTIQAEVY
251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR
   EKEDDKVFPG
301 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG
   LIGALLVCRE
351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD
   AASARAWPKM
401 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL
   EGHTFLVRNH
451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME
   AYVKVDSCPE
501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI
   RSVAKKHPKT
551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR
   KYKKVRFMAY
601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR
   PYNIIYPHGIT
651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP
   TKSDPRCLTR
701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR
   NVILFSVFDE
751 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
   FDSLQLSVCL
801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF
   PFSGETVFMS
851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED
   SYEDISAYLL
901 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQAEITRTTL QSDQEEIDYD
   DTISVEMKKE
951 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
   HVLNRNRAQSG
1001 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPIYIRA
   EVEDNIMVTF
1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY
   FWKVQHMAP
1101 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGGLIGPL LVCHTNLNP
   AHGRQVTVQE
1151 FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN
   YRFHAINGYI

```

1201 MDTLPGLVMA QDQIRRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV  
 RKKEEYKMAL  
 1251 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL  
 VYSNKCQTPL  
 1301 GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK  
 EPFSWIKVDL  
 1351 LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY  
 RGNSTGTLMV  
 1401 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME  
 LMGCDLNSCS  
 1451 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR  
 SNAWRPQVNN  
 1501 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVT T QGVKSLLTSM YVKEFLISS  
 QDGHQWTLFF  
 1551 QNGKVKVFQ NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH  
 QIALRMEVLG  
 1601 CEAQDLYDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI  
 SRTPEVTCVV  
 1651 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV  
 SVLTVLHQDW  
 1701 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP  
 SRDELTKNQV  
 1751 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS  
 FFLYSKLTVD  
 1801 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK\*

**pSYN FVIII 269 sequência de proteína (FVIII Fc com 72 AE-XTEN em aminoácido 18) SEQ ID NO: 115**

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYILGAVE LSWDYMQGAP  
 TSESATPESG  
 51 PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS  
 ESATPESGPG  
 101 TSTEPSEGS PGASSDLGE LPVDARFPPR VPKSFPPNTS  
 VVYKKTLEVE  
 151 FTDHLFNIK PRPPWMGLLG PTIQAEVYDT VVITLKNMAS  
 HPVSLHAVGV  
 201 SYWKASEGAE YDDQTSQREK EDDKVFPNGS HTYVWQVLKE  
 NGPMASDPLC  
 251 LTYSYLSHVD LVKDLNSGLI GALLVCREGS LAKEKTQTLH  
 KFILLFAVFD  
 301 EGKSWHSETK NSLMQDRDAA SARAWPKMHT VNGYVNRSLP  
 GLIGCHRKSV  
 351 YWHVIGMGTT PEVHSIFLEG HTFLVRNHRQ ASLEISPITF  
 LTAQTLLMDL  
 401 GQFLLFCHIS SHQHDGMEAY VKVDSCPEEP QLRMKNNEEA  
 EDYDDDLTDS  
 451 EMDVVRFDDD NSPSFIQIRS VAKKHPKTWV HYIAAEEEDW  
 DYAPLVLPD  
 501 DRSYKSQYLN NGPQRIGRKY KKVRFMAYTD ETFKTREAIQ  
 HESGILGPLL

551 YGEVGDTHLLI IFKNQASRPY NIYPHGITDV RPLYSRRLPK  
 GVKHLKDFPI  
 601 LPGEIFKYKW TVTVEDGPTK SDPRCLTRY Y SSFVNMERDL  
 ASGLIGPLLI  
 651 CYKESVDQRG NQIMSDKRN ILFSVFDENR SWYLTENIQR  
 FLPNPAGVQL  
 701 EDPEFQASNI MHSINGYVFD SLQLSVCLHE VAYWYILSIG  
 AQTDFLSVFF  
 751 SGYTFKHKMY YEDTLTLFPF SGETVFMSME NPGLWILGCH  
 NSDFRNRGMT  
 801 ALLKVSSCDK NTGDYYEDSY EDISAYLLSK NNAIEPRSF  
 QNPPVLKRHQ  
 851 AEITRTTLQS DQEEIDYDDT ISVEMKKEDF DIYDEDENQS  
 PRSFQKKTRH  
 901 YFIAAVERLW DYGMSSSPHV LRNRAQSGSV PQFKKVVFQE  
 FTDGSFTQPL  
 951 YRGELNEHLG LLGPYIRAEV EDNIMVTFRN QASRPYSFYS  
 SLISYEEDQR  
 1001 QGAEPKKNFV KPNETKTYFW KVQHMAPTK DEFDCWAY  
 FSDVDLEKDV  
 1051 HSGLIGPLL V CHTNTLNPAH GRQVTVQEFA LFTTIFDETK  
 SWYFTENMER  
 1101 NCRAPCNIQM EDPTFKENYR FHAINGYIMD TLPGLVMAQD  
 QRIRWYLLSM  
 1151 GSNENIHSIH FSGHVFTVRK KEEYKMALYN LYPGVFETVE  
 MLPSKAGIWR  
 1201 VECLIGEHLH AGMSTLFLVY SNKCQTPLGM ASGHIRDFQI  
 TASGQYGQWA  
 1251 PKLARLHYS SINAWSTKEP FSWIKVDLLA PMIIHGKTQ  
 GARQKFSSLY  
 1301 ISQFIIMYSL DGKKWQTYRG NSTGTLMVFF GNVDSGSIKH  
 NIFNPPIAR  
 1351 YIRLHPHYS IRSTLRMELM GCDLNSCSMP LGMESKAISD  
 AQITASSYFT  
 1401 NMFATWSPSK ARLHLQGRSN AWRPQVNNPK EWLQVDFQKT  
 MKVTGVTTQG  
 1451 VKSLTSMYV KEFLISSSQD GHQWTLFFQN GKVVFQGNQ  
 DSFTPVVNSL  
 1501 DPPLLTRYLR IHPQSWVHQI ALRMEVLGCE AQDLYDKTHT  
 CPPCPAPELL  
 1551 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF  
 NWYVDGVEVH  
 1601 NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN  
 KALPAPIEKT  
 1651 ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNG  
 1701 QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC  
 SVMHEALHNNH  
 1751 YTQKSLSLSP GK\*

pSYNFVIII 271 sequência de proteína (FVIII Fc com 42 AE-XTEN em aminoácido 18) SEQ ID NO: 116

```

1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP
   GSPAGSPTST
51  EEGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPASSS DLGELPVDAR
   FPPRPVKSFP
101 FNTSVVYKKT LFVEFTDHLF NIAKPRPPWM GLLGPTIQAE
   VYDTVVITLK
151 NMASHPVSLH AVGVSYWKAS EGAEYDDQTS QREKEDDKVF
   PGGSHTYVWQ
201 VLKENGPMAS DPLCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC
   REGSLAKEKT
251 QTLHKFILLF AVFDEGKSWH SETKNSLMQD RDAASARAWP
   KMHTVNGYVN
301 RSLPGLIGCH RKSVMYWHVIG MGTTPVHISI FLEGHTFLVR
   NHRQASLEIS
351 PITFLTAQTL LMDLGQFLLF CHISSHQHDG MEAYVKVDSC
   PEEPQLRMKN
401 NEEAEDYDDD LTDSEMDVVR FDDDNSPSFI QIRSVAKKHP
   KTWVHYIAAE
451 EEDWDYAPLV LAPDDRSYKS QYLNNGPQRI GRKYKKVRFM
   AYTDETFKTR
501 EAIQHESGIL GPLLYGEVGD TLLIIFKNQA SRPYNIYPHG
   ITDVRPLYSR
551 RLPKGVKHLK DFPILPGEIF KYKWTVTVED GPTKSDPRCL
   TRYSSSFVNM
601 ERDLASGLIG PLLICYKESV DQRGNQIMSD KRNVILFSVF
   DENRSWYLTE
651 NIQRFLPNPA GVQLEDPEFQ ASNIMHSING YVFDSLQLSV
   CLHEVAYWYI
701 LSIGAQTDFL SVFFSGYTFK HKMVYEDTLT LFPFSGETVF
   MSMENPGLWI
751 LGCHNSDFRN RGMTALLKVS SCDKNTGDYY EDSYEDISAY
   LLSKNNAIEP
801 RSFSQNPPVL KRHQAEITRT TLQSDQEEID YDDTISVEMK
   KEDFDIYDED
851 ENQSPRSFQK KTRHYFIAAV ERLWDYGMSS SPHVLNRNQ
   SGSPQFQKV
901 VFQEFTDGSF TQPLYRGELN EHLGLLGPYI RAEVEDNIMV
   TFRNQASRPY
951 SFYSSLISYE EDQRQGAEPK KNFVKPNETK TYFWKVQHMM
   APTKDEFDCK
1001 AWAYFSDVDL EKDVHSGDIG PLLVCHTNTL NPAHGRQVTV
   QEFALFFTIF
1051 DETKSWYFTE NMERNCRAPC NIQMEDPTFK ENYRFHAING
   YIMDTLPGLV
1101 MAQDQIRIRWY LLSMGSNENI HSIHFSGHVF TVRKKEEYKM
   ALYNLYPGVF
1151 ETVEMLPSKA GIWRVECLIG EHLHAGMSTL FLVYSNKCQT
   PLGMASGHIR

```

1201 DFQITASGQY GQWAPKLARL HYSGSINAWS TKEPFSWIKV  
 DLLAPMIHIG  
 1251 IKTQGARQKF SSLYISQFII MYSLDGKKWQ TYRGNSTGTL  
 MVFFGNVDSS  
 1301 GIKHNIFNPP IIARYIRLHP THYSIRSTLR MELMGCDLNS  
 CSMPLGMESK  
 1351 AISDAQITAS SYFTNMFATW SPSKARLHLQ GRSNAWRPQV  
 NNPKEWLQVD  
 1401 FQKTMKVTGV TTQGVKSLLT SMYVKEFLIS SSQDGHQWTL  
 FFQNGKVKVF  
 1451 QGNQDSFTPV VNSLDPPLLT RYLRIHPQSW VHQIALRMEV  
 LGCEAQDLYD  
 1501 KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC  
 VVVDVSHEDP  
 1551 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ  
 DWLNGKEYKC  
 1601 KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN  
 QVSLTCLVKG  
 1651 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTHPPVLDSD GSFFLYSKLT  
 VDKSRWQQGN  
 1701 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK\*

**pSYN FVIII sequência de proteína 272 (FVIII com 144 AE XTEN em aminoácido 18 e 244 AE XTEN em domínio B - sem Fc) SEQ ID NO: 117**

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQGAP  
 TSESATPESG  
 51 PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS  
 ESATPESGPG  
 101 TSTEPSEGS A PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA  
 TSGSETPGTS  
 151 ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSSDL  
 GELPVDARFP  
 201 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL  
 LGPTIQAEVY  
 251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR  
 EKEDDKVFPG  
 301 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG  
 LIGALLVCRE  
 351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD  
 AASARAWPKM  
 401 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL  
 EGHTFLVRNH  
 451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME  
 AYVKVDSCPE  
 501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI  
 RSVAKKHPKT  
 551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR  
 KYKKVRFMAY  
 601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR  
 PYNIPHGIT

651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP  
 TKSDPRCLTR  
 701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR  
 NVILFSVFDE  
 751 NRSWYLTEI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV  
 FDSLQLSVCL  
 801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF  
 PFSGETVFMS  
 851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED  
 SYEDISAYLL  
 901 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET  
 PGTSESATPE  
 951 SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG  
 SPAGSPTSTE  
 1001 EGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGSP  
 AGSPTSTEEG  
 1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES  
 ATPESGPGTS  
 1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP  
 TSTEEGTSTE  
 1151 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE  
 SGPGTSTEPS  
 1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE  
 MKKEDFDIYD  
 1251 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR  
 AQSGSVPQFK  
 1301 KVVVFQFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI  
 MVTFRNQASR  
 1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH  
 HMAPTKDEFD  
 1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGI IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV  
 TVQEFALFFT  
 1451 IFDETKSWYF TENMERN CRA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI  
 NGYIMDTLPG  
 1501 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY  
 KMALYNLYPG  
 1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC  
 QTPLGMASGH  
 1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI  
 KVDLLAPMII  
 1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG  
 TLMVFFGNVD  
 1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL  
 NSCSMPLGME  
 1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP  
 QVNNPKEWLQ  
 1801 VDFQKTMKVT GVTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW  
 TLFFQNGKVK  
 1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM  
 EVLGCEAQDL  
 1901 Y\*

pSYN VWF 031 sequência de proteína ( VWF D1D2D'D3- 48aa de comprimento GS ligante-Fc clivável por trombina) SEQ ID NO: 118

```

1  MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS
   DFVNTFDGSM
51  YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE
   FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI
   DGSGNFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS
   WALSSGEQWC
201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL
   VDPEPFVALC
251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA
   CSPVCPAGME
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG
   LCVESTECPC
351 VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECVL
   TGQSHFKSFD
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC
   TRSVTVRLPG
451 LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGDL RIQHTVTASV
   RLSYGEDLQM
501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG
   LAEPRVEDFG
551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP
   TFEACHRAVS
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV
   AWREPGRCCL
651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP
   PGLYMDERGD
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM
   SGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK
   TCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE
   TVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ
   YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE
   VNVKRPMKDE
951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE
   KVCGLCGNFD
1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD
   SSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS
   CESIGDCAAF
1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY
   EAEWRYNSCA

```



1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC  
 VDPEDCPVCE  
 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP  
 ISGGGGSGGG  
 1251 GSGGGSGGG GSGGGSGGG GSLVPRGSGG GSGGGGSDK  
 THTCPPCPAP  
 1301 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE  
 VKFNWYVDGV  
 1351 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK  
 VSNKALPAPI  
 1401 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF  
 YPSDIAVEWE  
 1451 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRRWQGNV  
 FSCSVMHEAL  
 1501 HNHYTQKSL LSPGK\*

**pSYN VWF 034 sequência de proteína (VWF D1D2D'D3- 288AE**

**XTEN- 35aa de comprimento GS ligante-Fc clivável por trombina) SEQ**

**ID NO: 119**

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS  
 DFVNTFDGSM  
 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE  
 FFDIHLFVNG  
 101 TVTQGDQRV MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI  
 DGSGNFQVLL  
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS  
 WALSSGEQWC  
 201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL  
 VDPEPFVALC  
 251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA  
 CSPVCPAGME  
 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG  
 LCVESTECPC  
 351 VHS GKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV  
 TGQSHFKSFD  
 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC  
 TRSVTVRLPG  
 451 LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV  
 RLSYGEDLQM  
 501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG  
 LAEPRVEDFG  
 551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP  
 TFEACHRAVS  
 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV  
 AWREPGRCEL  
 651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCT SLSYPDEECN EACLEGCFCP  
 PGLYMDERGD  
 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM  
 SGVPGSLLPD  
 751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVC PADN LRAEGLECTK  
 TCQNYDLECM

801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE  
 TVKIGCNTCV  
 851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ  
 YVLVQDYCGS  
 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTLVE GGEIELFDGE  
 VNVKRPMKDE  
 951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE  
 KVCGLCGNFD  
 1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD  
 SSPATCHNNI  
 1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS  
 CESIGDCAAF  
 1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY  
 EAEWRYNCA  
 1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC  
 VDPEDCPVCE  
 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP  
 ISGTSESATP  
 1251 ESGPGSEPAT SGSETPGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP  
 GTSESATPES  
 1301 GPGTSTEPSE GSAPGSPAGS PTSTEEGTSE SATPESGPGS  
 EPATSGSETP  
 1351 GTSESATPES GPGSPAGSPT STEEGSPAGS PTSTEEGTST  
 EPSEGSAPGT  
 1401 SESATPESGP GTSESATPES GPGTSESATP ESGPGSEPAT  
 SGSETPGSEP  
 1451 ATSGSETPGS PAGSPTSTEE GTSTEPSEGS APGTSTEPSE  
 GSAPGSEPAT  
 1501 SGSETPGTSE SATPESGPGT STEPSEGSAP DIGGGGGSGG  
 GGSLVPRGSG  
 1551 GDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV  
 TCVVVDVSHE  
 1601 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL  
 HQDWLNGKEY  
 1651 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT  
 KNQVSLTCLV  
 1701 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQ  
 1751 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK\*

pSYN VWF 036 sequência de proteína (VWF D1D2D'D-98aa de com-  
primento GS ligante-Fcclivável por trombina) SEQ ID NO: 120

```

1  MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS
   DFVNTFDGSM
51  YSFAGYCSYL LAGGCQKRSE SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE
   FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI
   DGSGNFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS
   WALSSGEQWC

201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL
   VDPEPFVALC
251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA
   CSPVCPAGME
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG
   LCVESTCEPC
351 VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECIV
   TGQSHFKSFD
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC
   TRSVTVRLPG
451 LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV
   RLSYGEDLQM
501 DWDGRGRLLV KLSFVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG
   LAEPRVEDFG
551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP
   TFEACHRAVS
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV
   AWREPGRCEL
651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCT SLSYPDEECN EACLEGCFCP
   PGLYMDERGD
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM
   SGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVC PADN LRAEGLECTK
   TCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE
   TVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ
   YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVITLVE GGEIELFDGE
   VNVKRPMKDE
951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE
   KVCGLCGNFD
1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD
   SSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDP EPY LDVCIYDTCS
   CESIGDCAAF
1101 CDTIAAYAHV CAQH GKVV TW RTATLCPQSC EERNLRENGY
   EAEWRYNSCA
1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC
   VDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP
   ISGGGGSGGG
1251 GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG
   GSGGGGSGGG
1301 GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSLVPRGSGG GSGGGGSGDK
   THTCPPCPAP
1351 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
   VKFNWYVDGV
1401 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
   VSNKALPAPI

```

1451 EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF  
 YPSDIAVEWE  
 1501 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV  
 FSCSVMHEAL  
 1551 HNHYTQKSLS LSPGK\*

pSYN Fc-015 sequência de proteína (domínio IgG-Fc) SEQ ID NO:

121

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APELLGGPSV  
 FLFPPKPKDT  
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK  
 PREEQYNSTY  
 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK  
 GQPREPQVYT  
 151 LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN  
 YKTTTPVLDS  
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS  
 LSLSPGK\*

Exemplo 15: heterodímeros FVIII-XTEN-Fc: VWF-Fc tiveram mantidas as atividades específicas de FVIII normal, em comparação com o tipo selvagem do BDD-FVIII.

[000384] A atividade específica FVIII de heterodímeros FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc foi determinada. Heterodímeros foram purificados utilizando um processo de cromatografia em duas etapas. Uma resina de troca aniônica fraca foi utilizada, seguido por cromatografia de afinidade. O produto final purificado tinha pureza aceitável por SEC-HPLC. A atividade específica foi comparada com o FVIII sem domínio B (BDD-FVIII), como medido pelo ensaio cromogênico de FVIII e concentração de A280. Os dados são apresentados na Tabela 26. Todas as moléculas testadas demonstraram atividades específicas de FVIII comparáveis para o BDD-FVIII. A pureza e a presença de cada fração das moléculas foram confirmadas por SDS-PAGE e Western blotting.

**Tabela 26:** atividade específica de FVIII de heterodímeros FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc

Constructo	FVIII 207 scBDDFVIII	FVIII-66 dcBDD FVIII)	FVIII 155 / vWF31	FVIII 155 / vWF39	FVIII 169 / vWF31	FVIII 205 / vWF31	FVIII 169 / vWF34
Atividade especí-fica medida (IU/nmol)	1473	1592	1534	1796	1511	1345	1505

[000385] As meias-vidas de rFVIII-XTEN/D'D3 e do BDD-FVIII foram comparados em camundongos HemA (Figura 15; Tabela 27). Como a Figura 15 mostra, rFVIII-XTEN/D'D3 atingiu uma meia-vida que foi quatro vezes mais longa do que a meia-vida obtida pelo BDD-FVIII.

**Tabela 27:** rFVIII-XTEN/D'D3 e BDD-FVIII em Camundongos HemA

Trata- mento	5 minutos Recu- peração (%)	HL (h)	MRT (h)	Cl (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	AUC_D (h*kg*mIU/mL/mL)
BDD-FVIII	89	7,6	11	4,5	49,2	0,22
rFVIII-Fc	78	16	20	2,9	57,8	0,35
rFVIII- XTEN/D'D3	86	30	36	1,8	63,4	0,57

**Exemplo 16:** potência de heterodímero FVIII-XTEN-Fc: VWF-Fc (atividade de FVIII) na hemostasia como medido pelo ensaio de TTPA de uma fase

[000386] A potência de heterodímeros FVIII-XTEN-Fc: VWF-Fc na hemostasia foi avaliada pela sua atividade aPTT específica de FVIII como resumido na Tabela 28. Como demonstrado na Tabela 28, enquanto que a adição do fragmento VWF D'D3 e a inserção de XTEN nas intradomínios de FVIII reduz a atividade de aPTT específica de FVIII dos heterodímeros (como indicado pelos dados FVIII155/VWF031 e os dados FVIII205/VWF031), inserções XTEN na região do domínio B do FVIII ou C-terminal do fragmento VWF D'D3 não tem nenhum efeito negativo sobre a atividade específica aPTT de FVIII (como indicado pelos dados FVIII169/VWF031 e os dados FVIII169/VWF034). Em compara-

ção com BDD-FVIII de cadeia dupla (dcBDD-FVIII), FVIII155/VWF031, FVIII169/VWF031, FVIII169/VWF034 e VWF205/VWF031 mostrou redução da atividade aPTT específica por 2,5 vezes, 2,8 vezes, 2,6 vezes e 5,5 vezes, respectivamente.

**Tabela 28:** atividade aPTT específica de FVIII de heterodímeros FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc

<b>Construto</b>	FVIII 207 scBDD-FVIII	FVIII-66 dcBDD-FVIII	FVIII 155 / VWF31	FVIII 169 / VWF31	FVIII 205 / VWF31	FVIII 169 / VWF34
<b>Atividade específica de aPTT (IU/nmol)</b>	818 ± 153	1188 ± 213	448 ± 111	416 ± 70	214 ± 38	436 ± 189

#### Ensaio aPTT específico de FVIII

[000387] As variantes de FVIII foram diluídas com tampão de aPTT (0,15 M de NaCl, 0,05 M Tris-HCl, 1% BSA, pH 7,4) para o ensaio de faixa linear (200- 1,6 mU/mL). 50 µL de amostras diluídas ou padrões foram misturados sequencialmente, com 50 µL de 37°C plasma agrupado de HemA humano naïve, 50 µL de reagente 37°C aPTT (ACTIN® FSL reagente ativado cefaloplastina - Dade Behring, referência # B4219-2) e incubados a 37°C por 4 minutos. 50 µL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM (Dade Behring [referência ORFO37 #]) foi então adicionada à mistura de reação para iniciar as reações de coagulação. Usando o tempo de coagulação de cada amostra (o intervalo de tempo desde a adição de CaCl<sub>2</sub> até o início da formação de coágulo), a atividade APTT foi calculada contra o padrão que foi gerada com o 8º padrão internacional concentrado de FVIII. Atividade específica aPTT foi calculada por comparação com a concentração de proteína de cada molécula medido por OD280.

Exemplo 17: eficácia *in vivo* de heterodímero FVIII-XTEN-Fc: VWF-Fc em modelo de sangramento em clip de cauda de camundongos HemA [000388] Para acessar ainda mais a potência da hemostasia dos he-

terodímeros, a eficácia aguda de FVIII169/VWF034 e FVIII205/VWF031 foi avaliada em comparação com BDD-FVIII no modelo de sangramento de clipe em cauda de camundongos HemA. Camundongos HemA foram tratados com uma única injeção IV de BDD-FVIII em 200, 65 e 20 IU/kg para gerar o nível de controle de perda de sangue da lesão do clipe após a cauda. A perda de sangue a partir de camundongos tratados com 200 IU/kg de FVIII169/ou VWF034 FVIII205/VWF031 foi comparada com os camundongos do grupo de controle tratado com BDD-FVIII para avaliar a sua potência na hemostasia. Animais tratados com veículo foram usados para gerar a perda de sangue de linha de base para o modelo. Como mostrado na Figura 16, a redução significativa da perda de sangue foi observada a partir de todos os grupos de tratamento em comparação com a de FVIII dos animais tratados com veículo ( $p < 0,05$ ). Ambos FVIII169/VWF034 e FVIII205/VWF031 são eficazes no modelo de clipe na cauda de camundongos HemA. Em comparação com o BDD-FVIII, cerca de 3 vezes menor potência foi observado para FVIII169/VWF034, como demonstrado pela redução de perda de sangue semelhante conseguida por 65 IU/kg de BDD-FVIII e 200 IU/kg de FVIII169/VWF034. Como para FVIII205/VWF034, foi observada uma redução de potência de 10 vezes, como demonstrado pela redução de perda de sangue semelhante conseguida por 20 IU/kg de BDD-FVIII e 200 IU/kg de FVIII205/VWF031.

[000389] Embora FVIII169/VWF034 e FVIII205/VWF031 tiveram atividade cromogênica de FVIII específica semelhante em comparação com rBDD-FVIII, sua atividade aPTT de FVIII e potência *in vivo* foram ambas reduzidas devido às modificações das moléculas. Estes dados indicam que a atividade aPTT de uma molécula de FVIII é uma medição mais precisa em prever sua potência *in vivo* na hemostasia do que a atividade cromogênica do FVIII.

Modelo de sangramento em clipe de cauda de camundongos HemA

[000390] Camundongos machos HemA de 8-10 semanas de idade foram utilizados para o estudo. Antes da lesão na cauda por clipe, os camundongos foram anestesiados com 50 mg/kg de cetamina/0,5 mg/kg de coquetel dexmedetomidina e colocados sobre uma almofada de aquecimento a 37°C para ajudar a manter a temperatura do corpo. As caudas dos camundongos foram, em seguida, imersas em água 37°C durante 10 minutos para dilatar a veia lateral. Após a dilatação venosa, rFVIII ou solução veículo foram injetados através da veia caudal e 5 min depois, os distais 1 cm da cauda foram cortados com um bisturi # 11 com borda reta. O sangue derramado foi recolhido em 13 ml de soro fisiológico morno a 37°C durante 30 minutos e, em seguida, os camundongos foram sacrificados, ainda sob anestesia por toracotomia bilateral. A perda de sangue foi quantificada por gravimetria por mudança de peso dos tubos de coleta de sangue antes e depois do sangue ter sido coletado em grama, que se traduziu em mililitros (mL) de volume de perda de sangue (1 g alteração de peso = 1 mL perda de sangue).

[000391] A descrição anterior das modalidades específicas irá revelar tão plenamente a natureza geral da invenção que outros podem, por aplicação do conhecimento dentro da especialidade da técnica, prontamente modificar e/ou adaptar para várias aplicações tais modalidades específicas, sem experimentação indevida, sem se afastar do conceito geral da presente invenção. Por conseguinte, estas adaptações e modificações pretendem estar dentro do significado e faixa de equivalentes das especificações reveladas, com base nos ensinamentos e orientações aqui apresentados. Deve ser compreendido que a fraseologia ou terminologia aqui utilizada é para o propósito de descrição e não de limitação, de tal modo que a terminologia ou fraseologia da presente especificação deve ser interpretada pelo especialista à luz



dos ensinamentos e orientação.

[000392] Outras modalidades da invenção serão evidentes para os especialistas na técnica a partir da consideração do relatório descritivo e da prática da invenção aqui revelada. Pretende-se que a especificação e os exemplos sejam considerados como apenas exemplificativos, com o verdadeiro escopo e espírito da invenção indicados pelas reivindicações que se seguem.

[000393] Todas as patentes e publicações aqui citadas são aqui incorporadas por referência na sua totalidade.

## REIVINDICAÇÕES

1. Proteína quimérica, caracterizada pelo fato de que compreende (i) uma primeira cadeia polipeptídica e (ii) uma segunda cadeia polipeptídica,

em que a primeira cadeia polipeptídica compreende

(1) um fragmento de Fator de von Willebrand (VWF) compreendendo um domínio D' e um domínio D3 de VWF,

(2) uma primeira sequência de polipeptídeo de comprimento estendido (XTEN),

(3) uma primeira região Fc, e

em que o segundo polipeptídeo compreende

(4) uma proteína de fator VIII (FVIII),

(5) um segundo XTEN, e

(6) uma segunda região Fc;

em que a proteína FVIII compreende uma deleção total ou parcial do domínio B; em que o fragmento de VWF compreende aminoácidos correspondendo aos aminoácidos 764 a 1240 da SEQ ID NO: 2, em que o fragmento de VWF compreende uma substituição de um aminoácido diferente de cisteína na posição correspondente ao resíduo 1099, resíduo 1142 ou ambos os resíduos 1099 e 1142 da SEQ ID NO: 2, em que o fragmento de VWF inibe a interação da proteína FVIII com VWF endógeno e em que a primeira sequência de XTEN é ligada ao C-terminal do fragmento de VWF, e em que a primeira região Fc está ligada ao C-terminal da primeira sequência XTEN por um ligante clivável e em que a primeira região Fc está associada à segunda região Fc por uma ligação covalente.

2. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o fragmento de VWF contém uma alanina nos resíduos correspondentes ao resíduo 1099 e resíduo 1142 da SEQ ID NO: 2.

3. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o primeiro XTEN compreende a sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, ou qualquer combinação das mesmas.

4. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o segundo XTEN compreende a sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, ou qualquer combinação das mesmas.

5. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a primeira ou segunda sequência XTEN é SEQ ID NO: 39 ou SEQ ID NO: 131.

6. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o segundo XTEN é inserido dentro da proteína FVIII imediatamente a jusante de um sítio de inserção correspondente ao resíduo 745 de FVIII humano maduro nativo (SEQ ID NO: 4).

7. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que a segunda região Fc está ligada ao C-terminal da proteína FVIII.

8. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a proteína FVIII compreende uma deleção parcial do domínio B.

9. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que

a primeira cadeia polipeptídica compreende uma sequência de aminoácidos conforme apresentada na SEQ ID NO: 119; e

a segunda cadeia polipeptídica compreende uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 103.

10. Proteína quimérica, caracterizada pelo fato de que compreende (i) uma primeira cadeia polipeptídica e (ii) uma segunda cadeia polipeptídica,

a primeira cadeia polipeptídica compreendendo

(1) um fragmento de VWF compreendendo uma sequência de aminoácidos de acordo com os aminoácidos 764 a 1240 da SEQ ID NO: 119,

(2) um primeiro XTEN compreendendo uma sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, ou qualquer combinação das mesmas, e

(3) uma primeira região Fc;

a segunda cadeia polipeptídica compreendendo

(4) uma proteína FVIII compreendendo uma sequência de aminoácidos de acordo com os aminoácidos 1 a 745 e 1649-2332 de FVIII humano maduro nativo (SEQ ID NO: 4),

(5) um segundo XTEN compreendendo uma sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID

NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, ou qualquer combinação das mesmas, e

(6) uma segunda região Fc;

em que a primeira sequência XTEN está ligada ao C-terminal do fragmento VWF,

em que o fragmento de VWF inibe a interação da proteína FVIII com o VWF endógeno; em que a primeira região Fc está ligada ao C-terminal da primeira sequência XTEN por um ligante clivável;

em que a segunda região Fc está ligada ao C-terminal da proteína FVIII;

em que a proteína FVIII compreende uma deleção total ou parcial do domínio B;

em que o segundo XTEN é inserido dentro da proteína FVIII em um local de inserção imediatamente a jusante do aminoácido 745 de acordo com FVIII humano maduro nativo (SEQ ID NO: 4), e

em que a primeira região Fc e a segunda região Fc estão associadas por uma ligação dissulfeto.

11. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a primeira região Fc e a segunda região Fc estão associadas por duas ligações dissulfeto.

12. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a proteína quimérica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

Figura 1: diferentes construtos de VWF

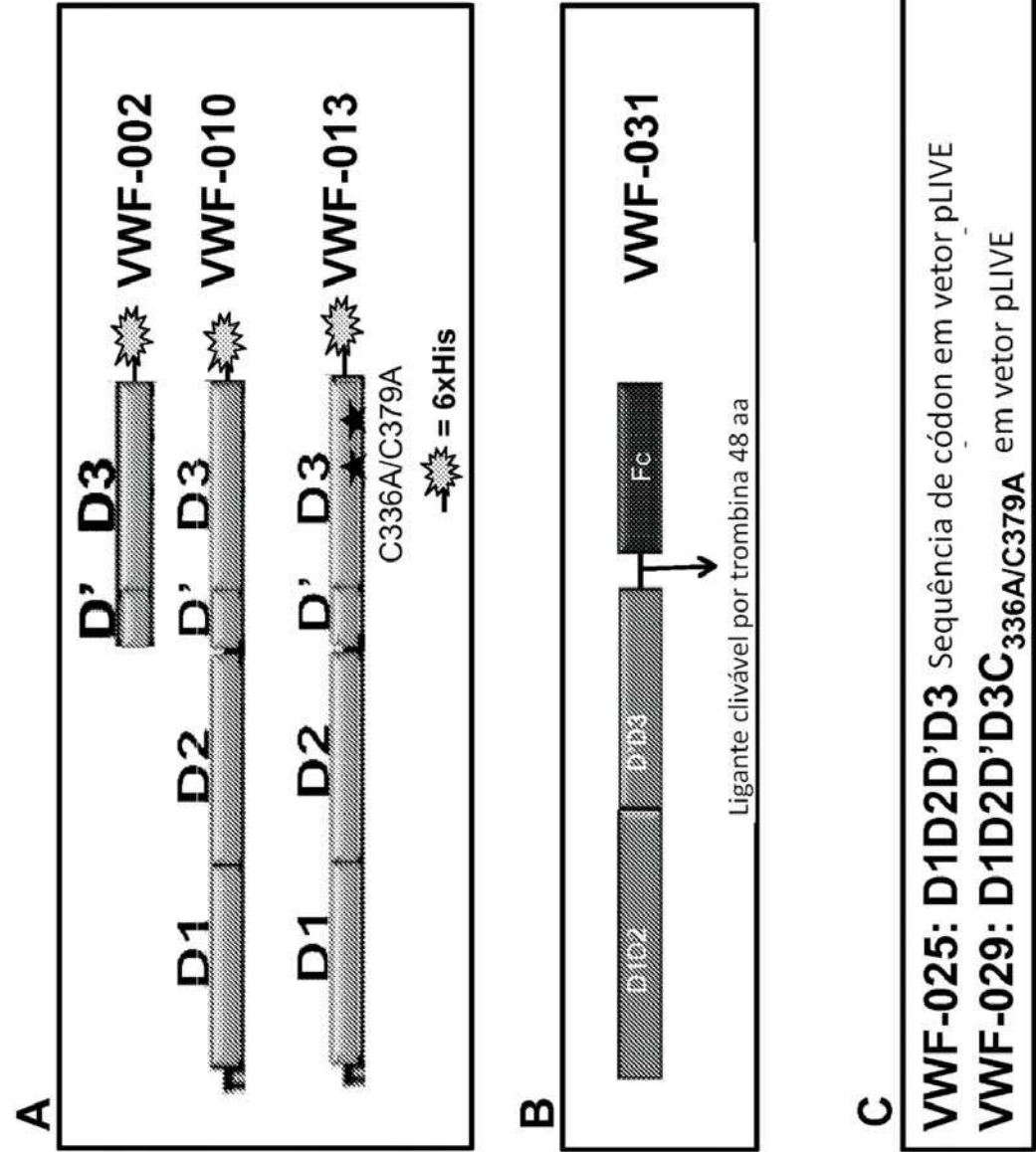
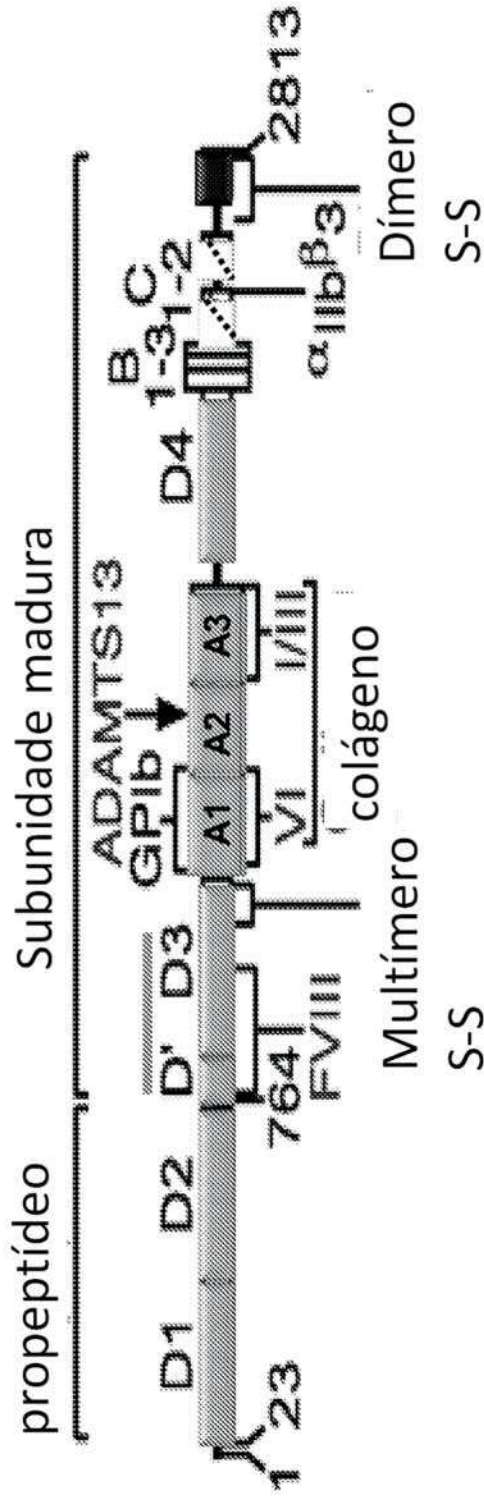
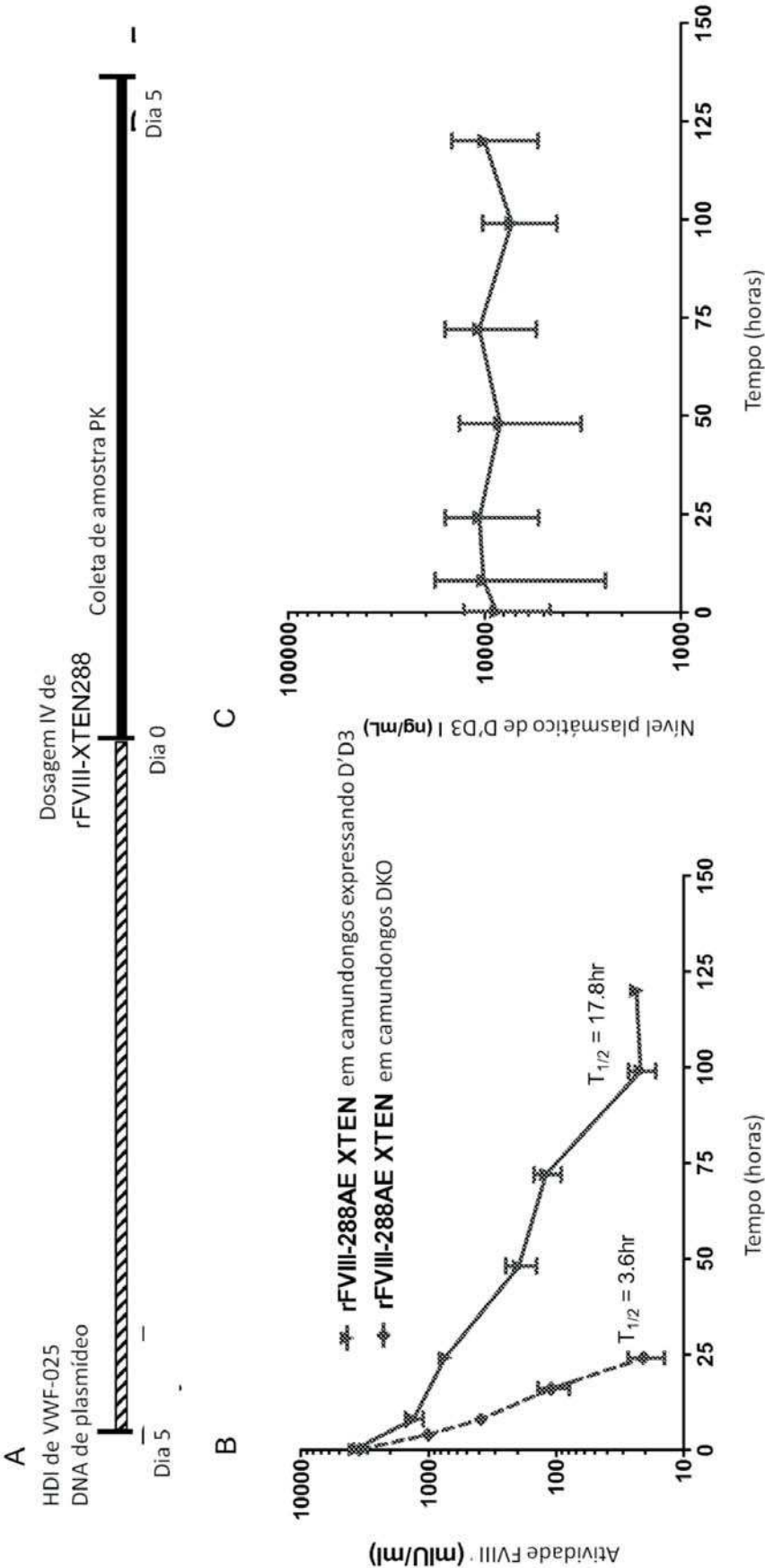


Figura 1D: fator de von Willebrand



- Proteína de ~258 kDa, forma multímeros (>20MDa) por ligação dissulfeto
  - , Associa com FVIII (95-98%) em complexo não covalente:
    - Protege FVIII de ativação/clivagem por protease
    - Estabilizada cadeia pesada e leve
    - Impede a eliminação de FVIII de receptores limpadores
  - Eliminação de complexo FVIII-vWF por receptores vWF
    - Impede pinocitose e reciclagem de rFVIIIc?
- Estende a meia-vida
- Limita a meia-vida

Figura 2: rFVIII-XTEN PK em camundongos expressando VWF D'D3



Extensão adicional de 5 vezes de FVIII-XTEN de fragmento D'D3



Figura 3: construtos de heterodímero FVIII/VWF (ligante variável)

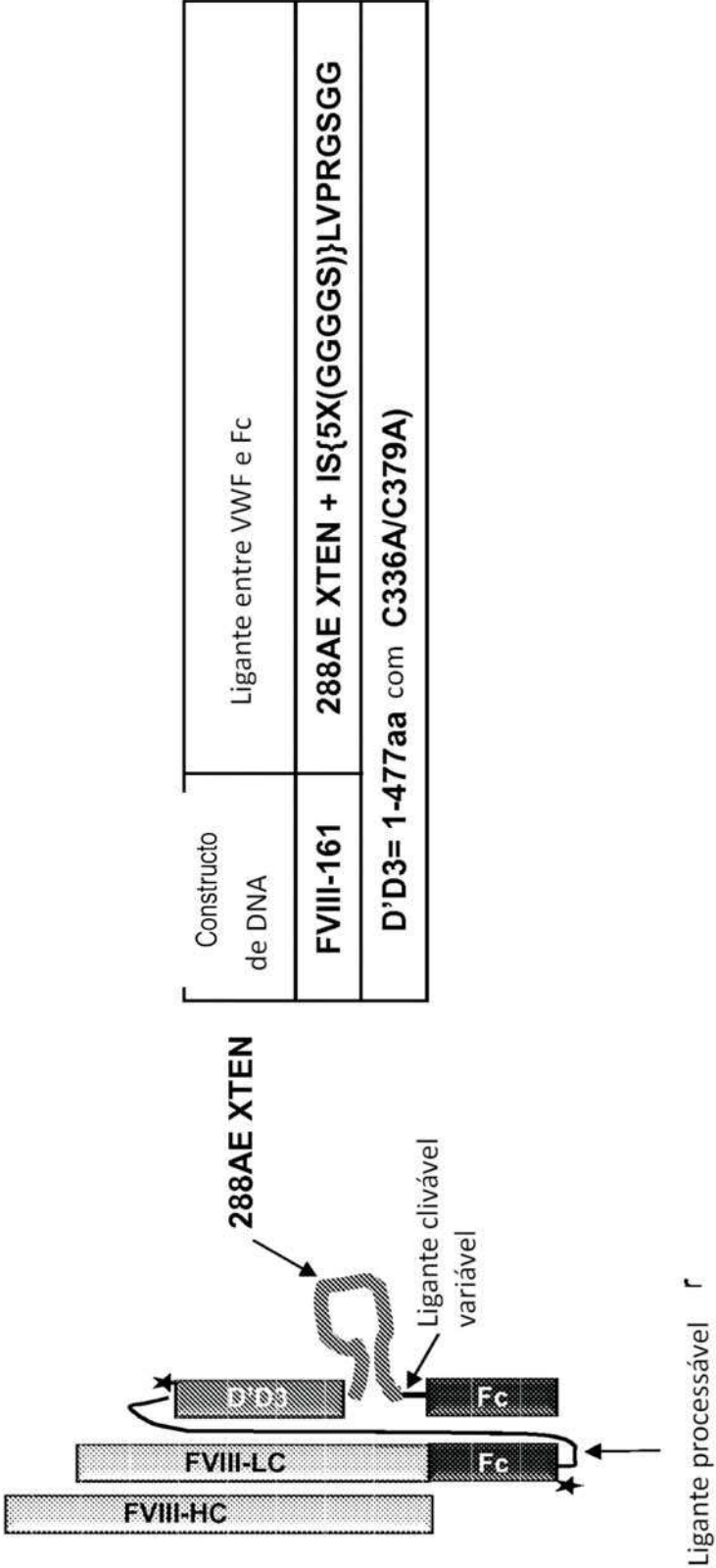


Figura 4: construtos de FVIII/VWF com inserções XTEN

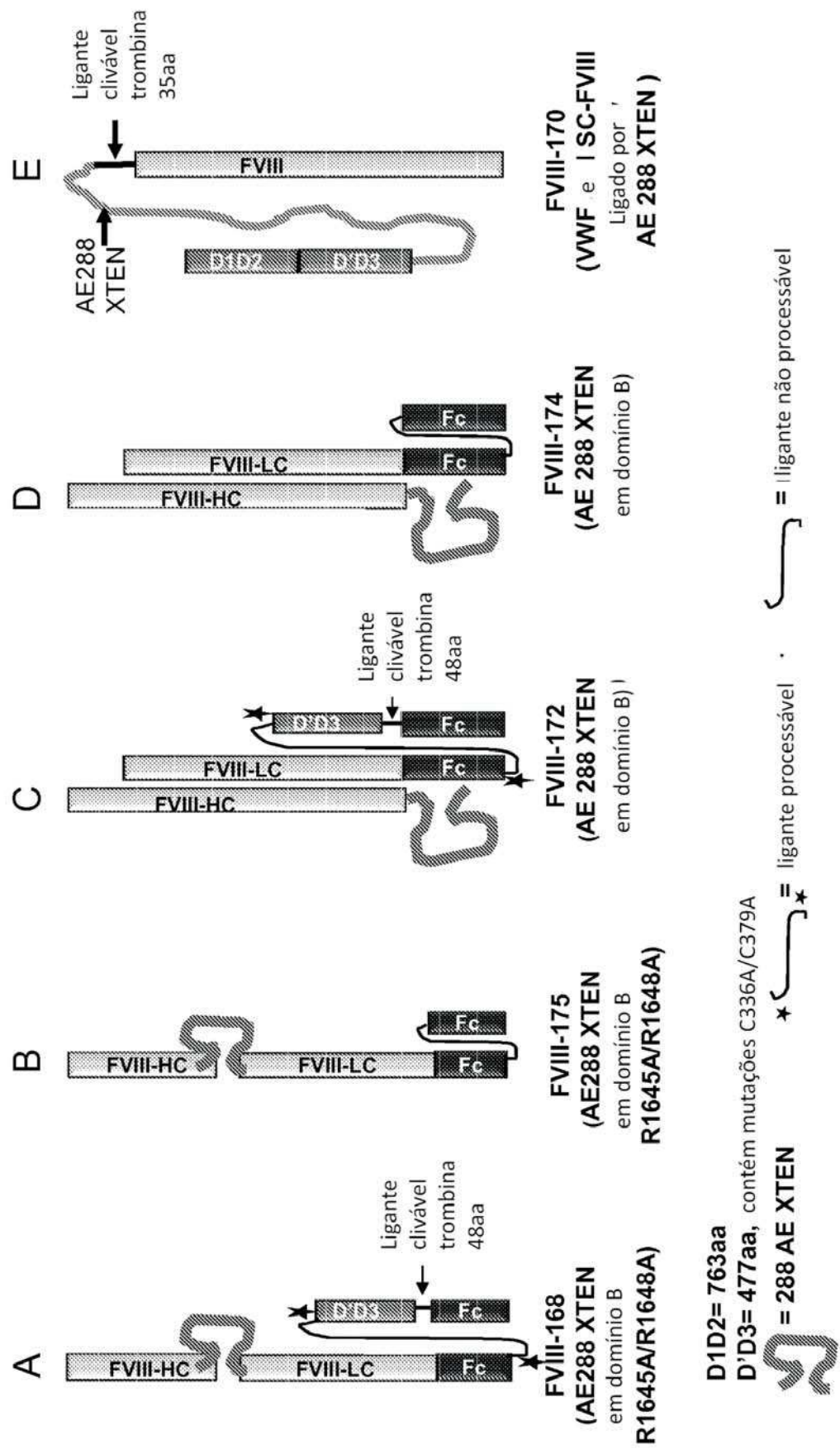


Figura 5: inserção de XTEN melhora a PK de heterodímeros FVIII/VWF

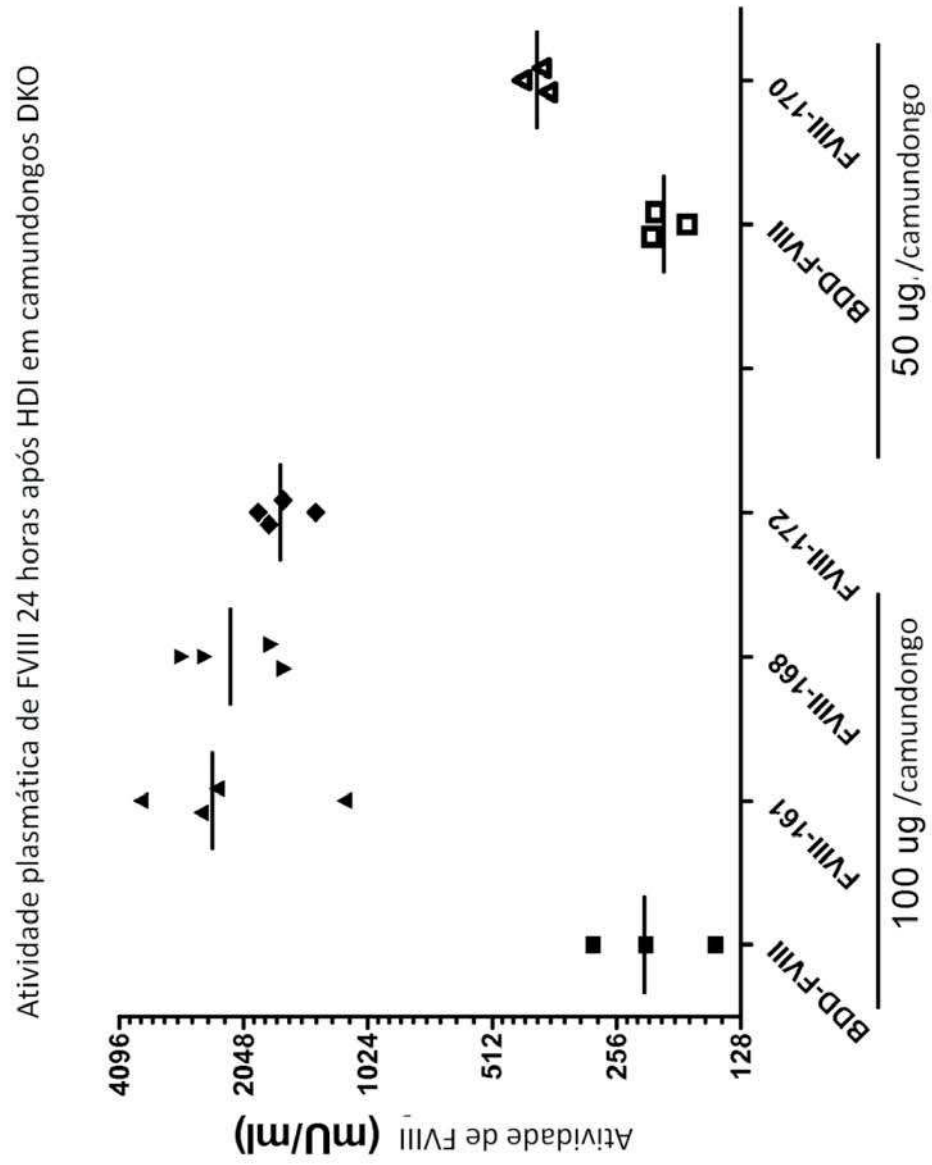
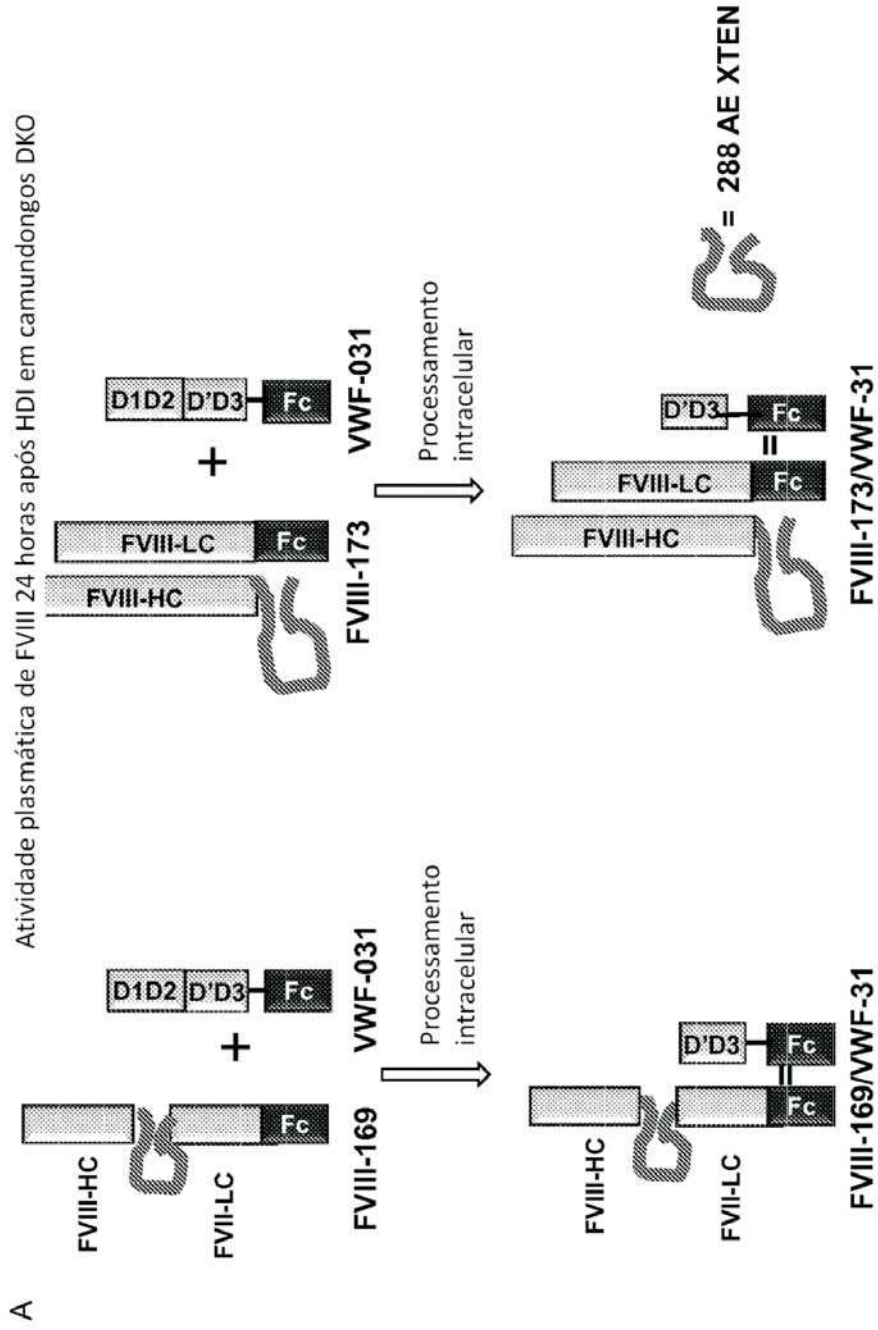
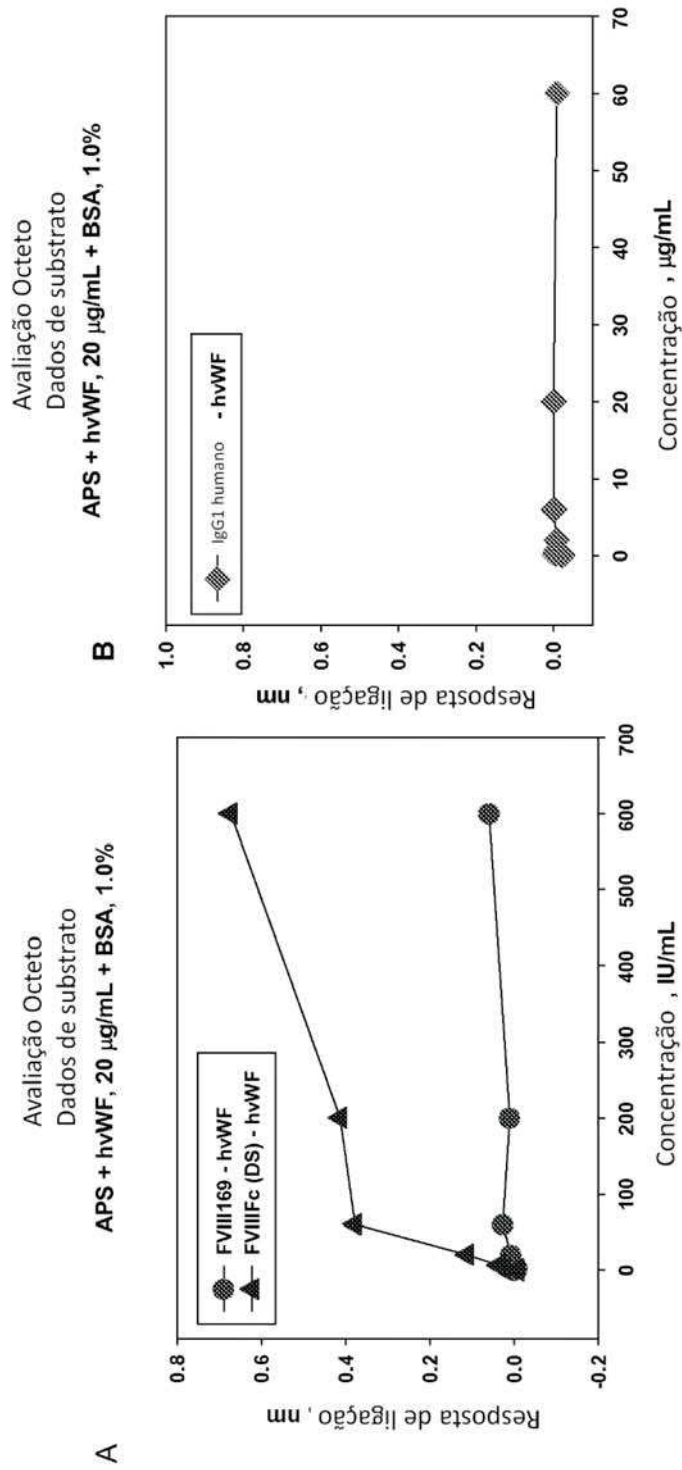


Figura 6: construtos FVIII (sistema de co-transfecção)



<b>FVIII-169</b>	<b>SC- FVIII R1645A/R1648A</b> com inserção de 288 AE XTEN domínio B diretamente fundido a um Fc único
<b>FVIII-173</b>	Cadeia dupla - FVIII com inserção 288 AE XTEN domínio B diretamente fundido com um Fc único
<b>VWF-031</b>	Fragmento D1D2D'D3 (763aa-477aa//C336A/C379A) ligado a um Fc único com um ligante clivável por trombina de 48aa

Figura 7: FVIII-169/VWF não tem ligação detectável na direção de hVWF imobilizado



Analito	Sonda APS + hVWF	Sonda de Proteína G
FVIII-169/VWF-031	-	+
rFVIII Fc	+	+
IgG1 humana	-	+

Figura 8A : FVIII-169/VWF-031 PK em Hema

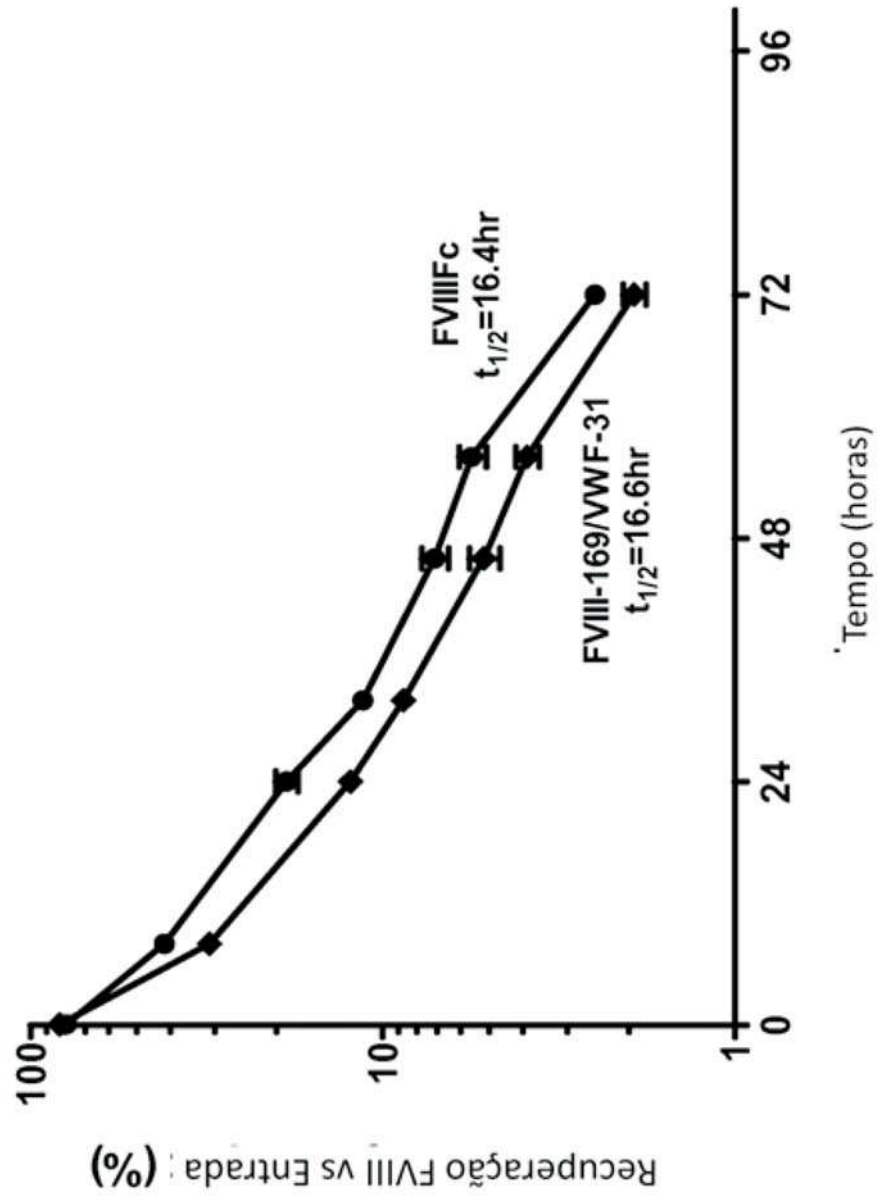


Figura 8B: FVIII-169/VWF-031 PK em camundongos DKO FVIII/VWF

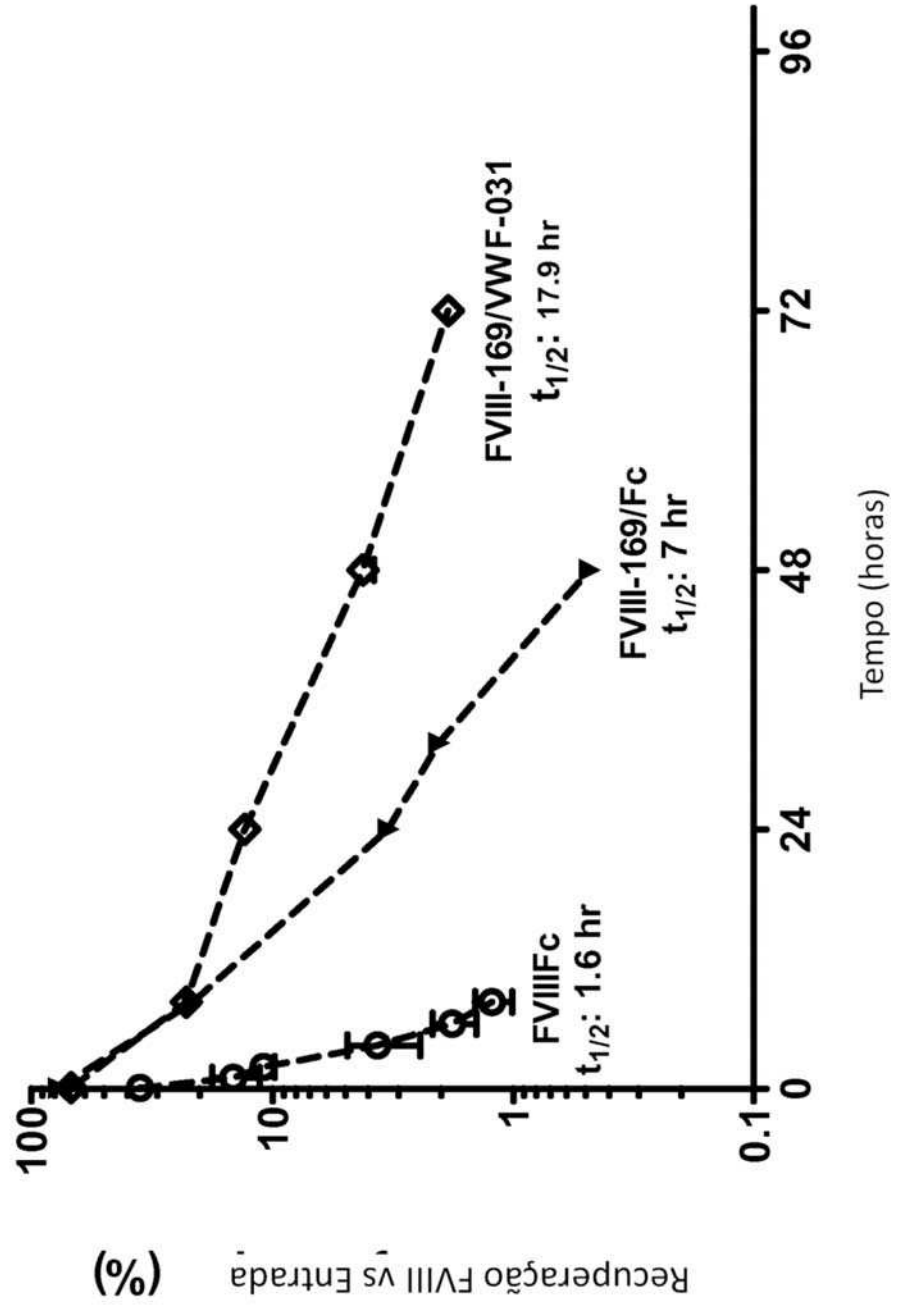




Figura 9A: meia-vida de variantes FVIII-XTEN em camundongos DKO FVIII/VWF expressando D'D3

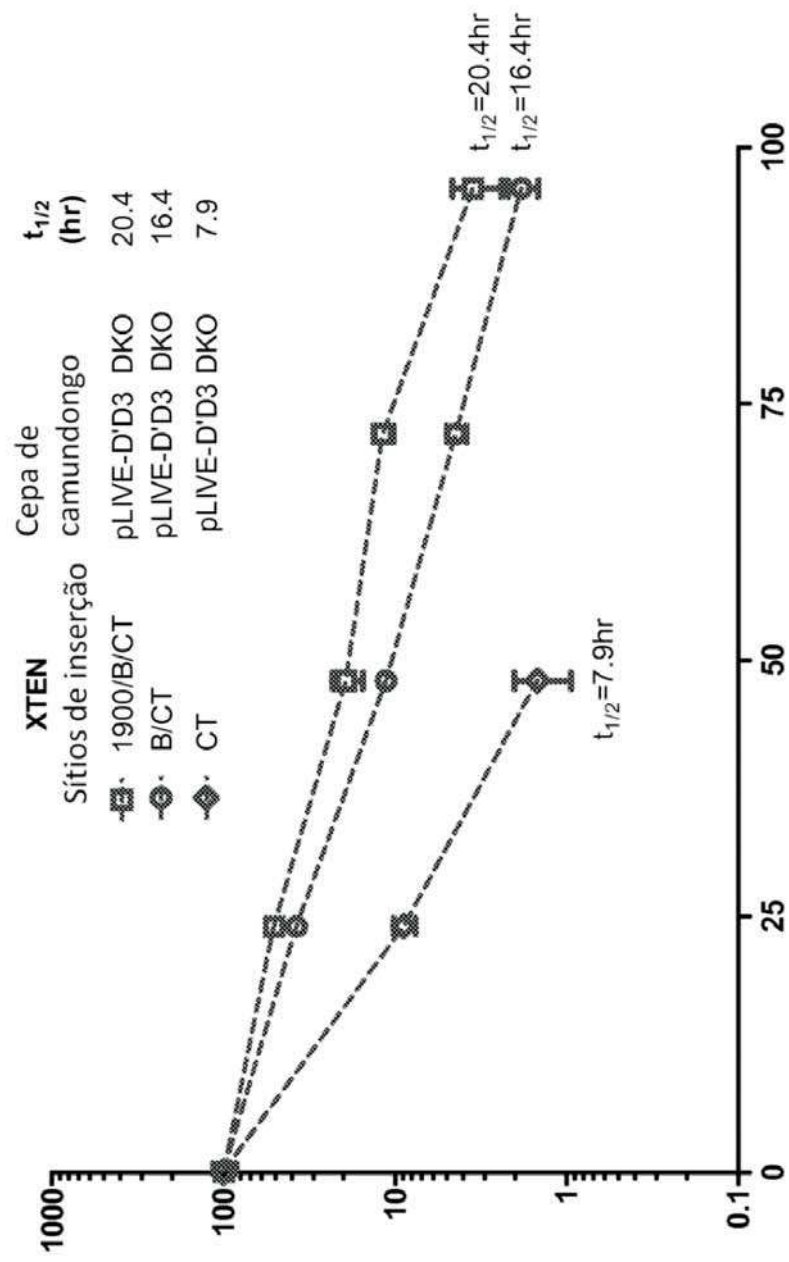




Figura 9B: PK de FVIII-XTEN com três inserções XTEN

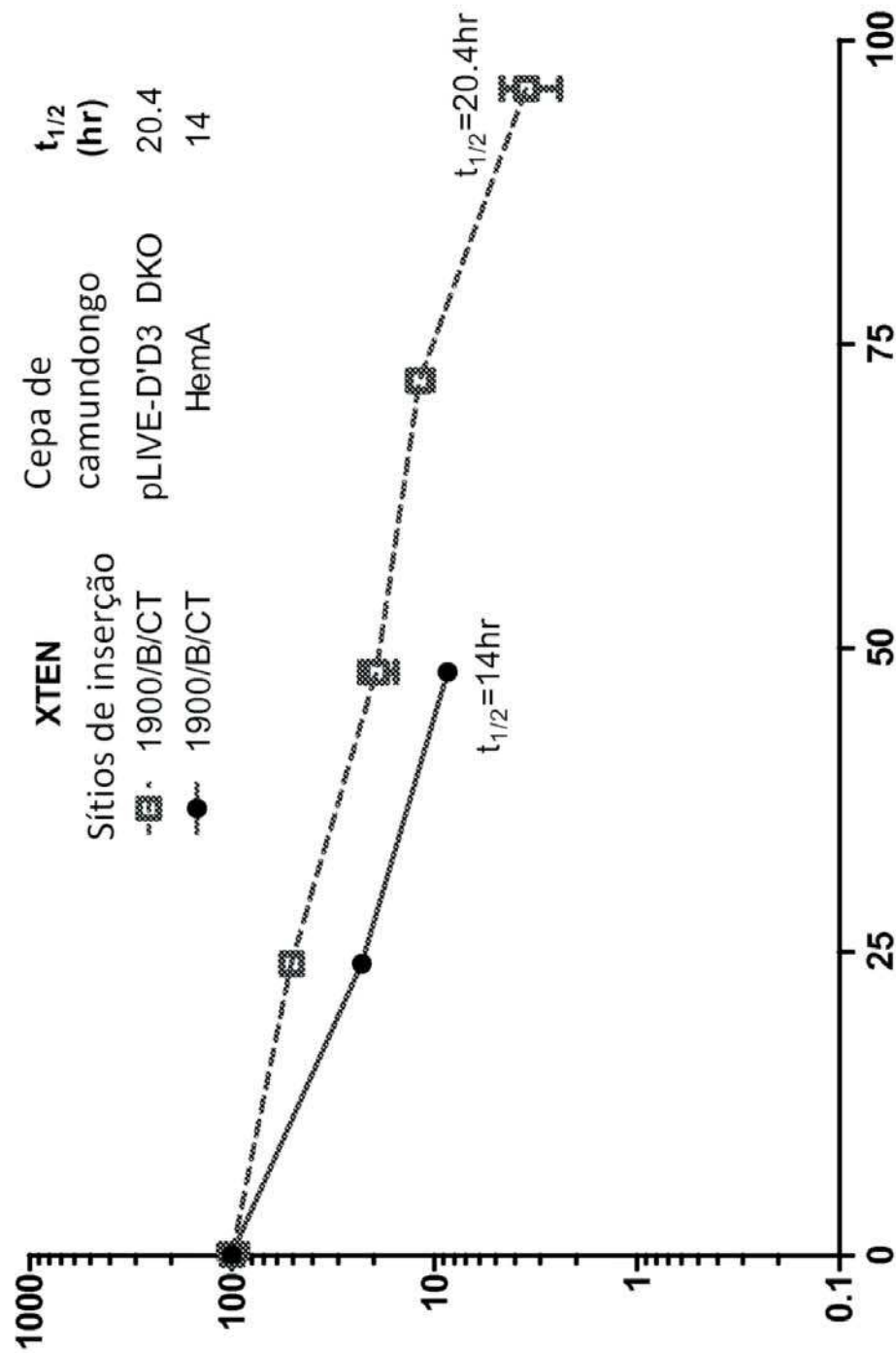


Figura 10: atividade de FVIII em plasma de camundongos DKO

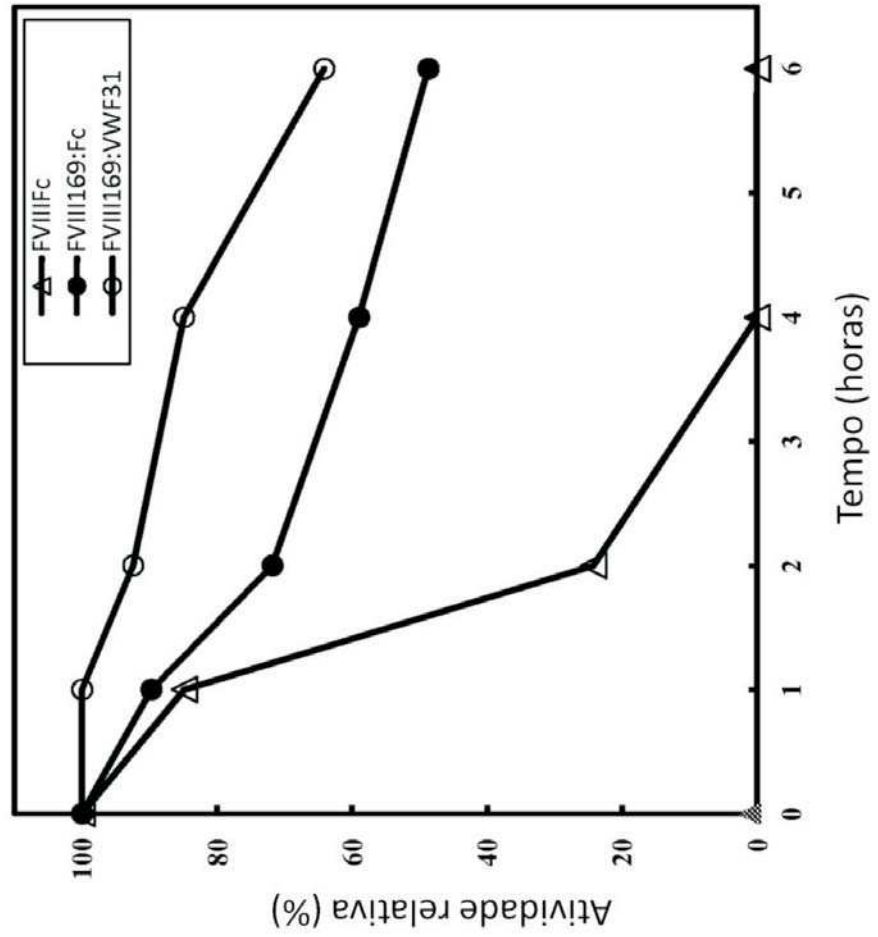


Figura 11: efeito aditivo de Fc, XTEN e fragmento VWF-D'D3 em extensão de meia-vida FVIII

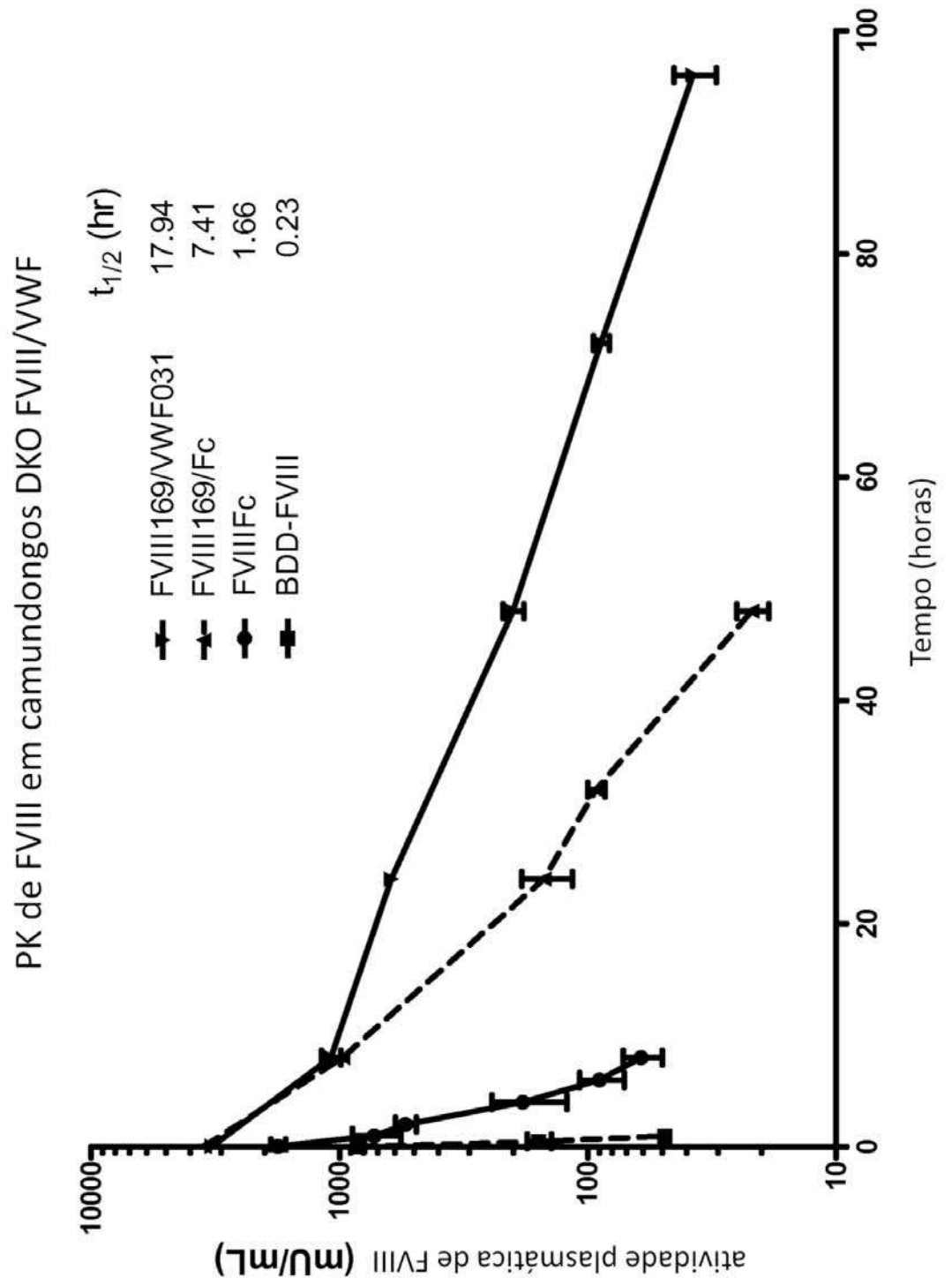


Figura 12A: efeito de PK em diferentes XTEN em heterodímero em rFVIII-XTEN/VWF em camundongos Hema

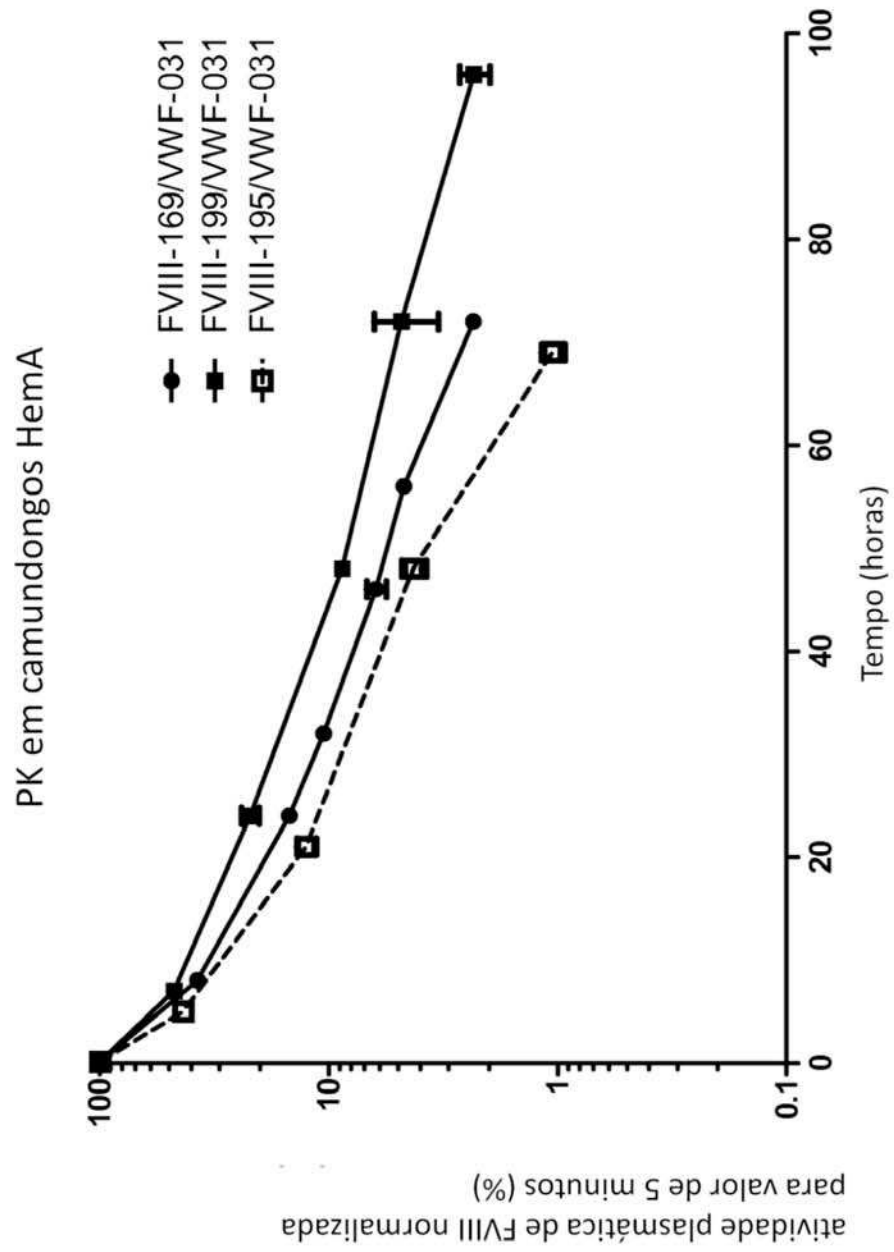


Figura 12B: efeito de PK em diferentes XTEN em heterodímero em rFVIII-XTEN/VWF em camundongos HemA

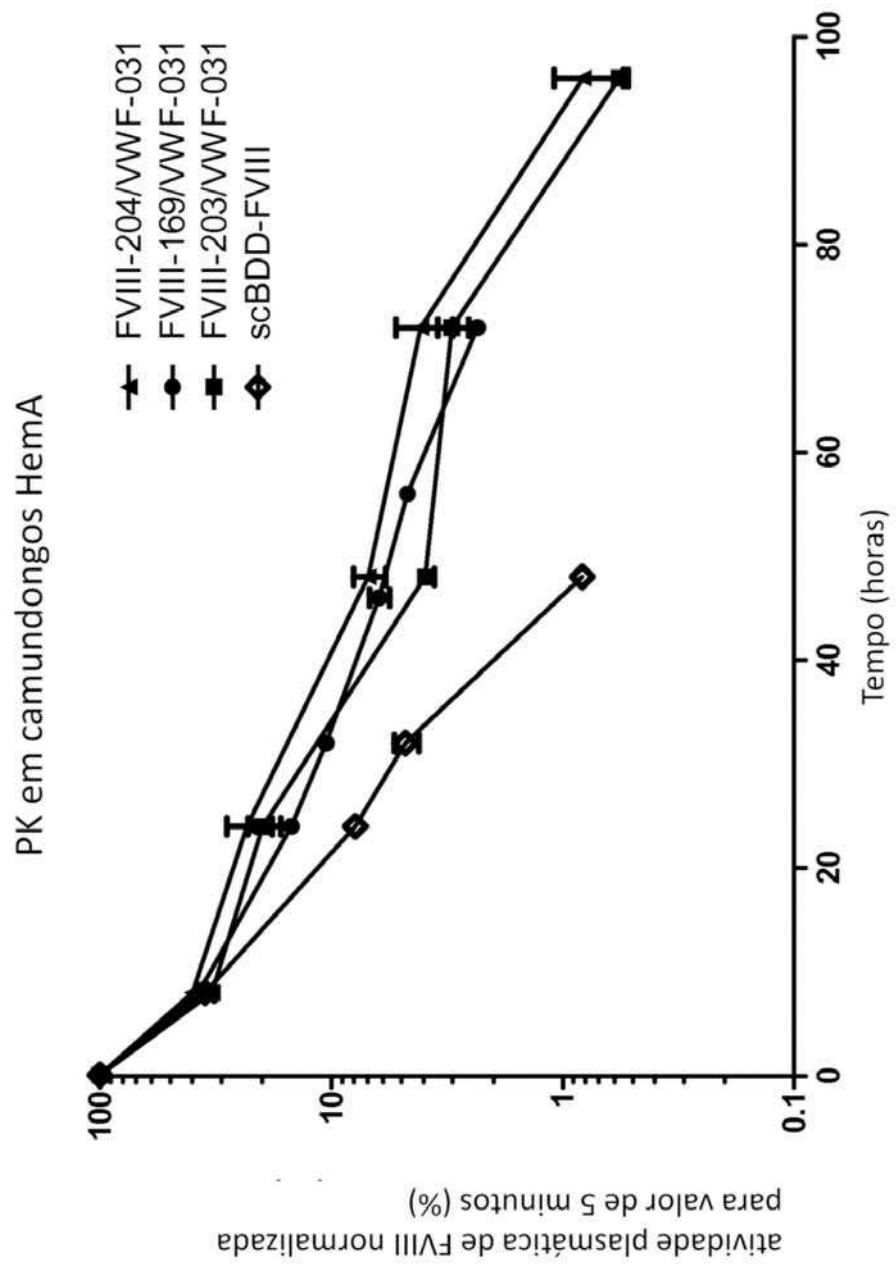


Figura 12C: efeito de PK em diferentes XTEN em heterodímero em rFVIII-XTEN/VWF em camundongos Hema

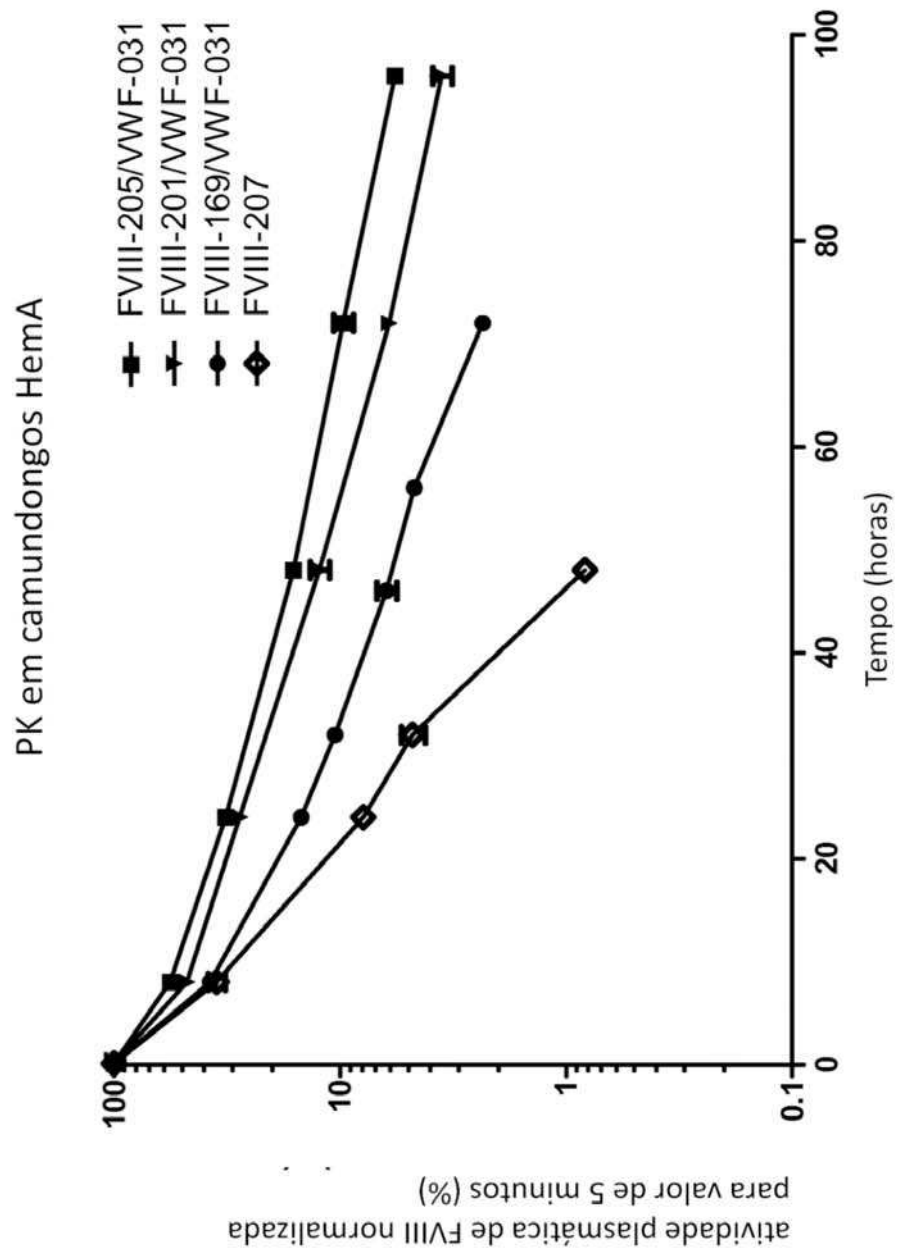


Figura 13: PK em diferentes heterodímeros rFVIII-XTEN/VWF-XTEN em camundongos DKO FVIII/VWF

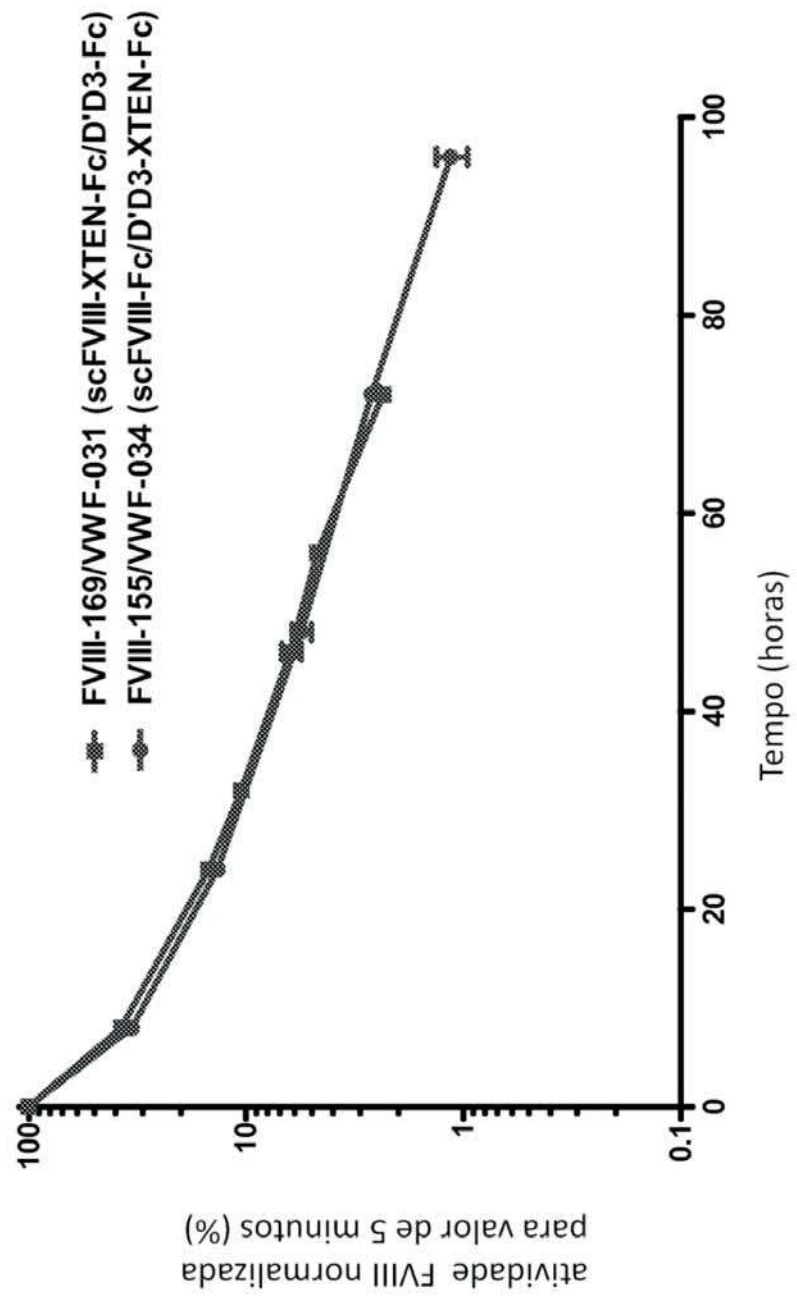




Figura 14: PK de heterodímero rFVIII-XTEN/VWF em camundongos Hema

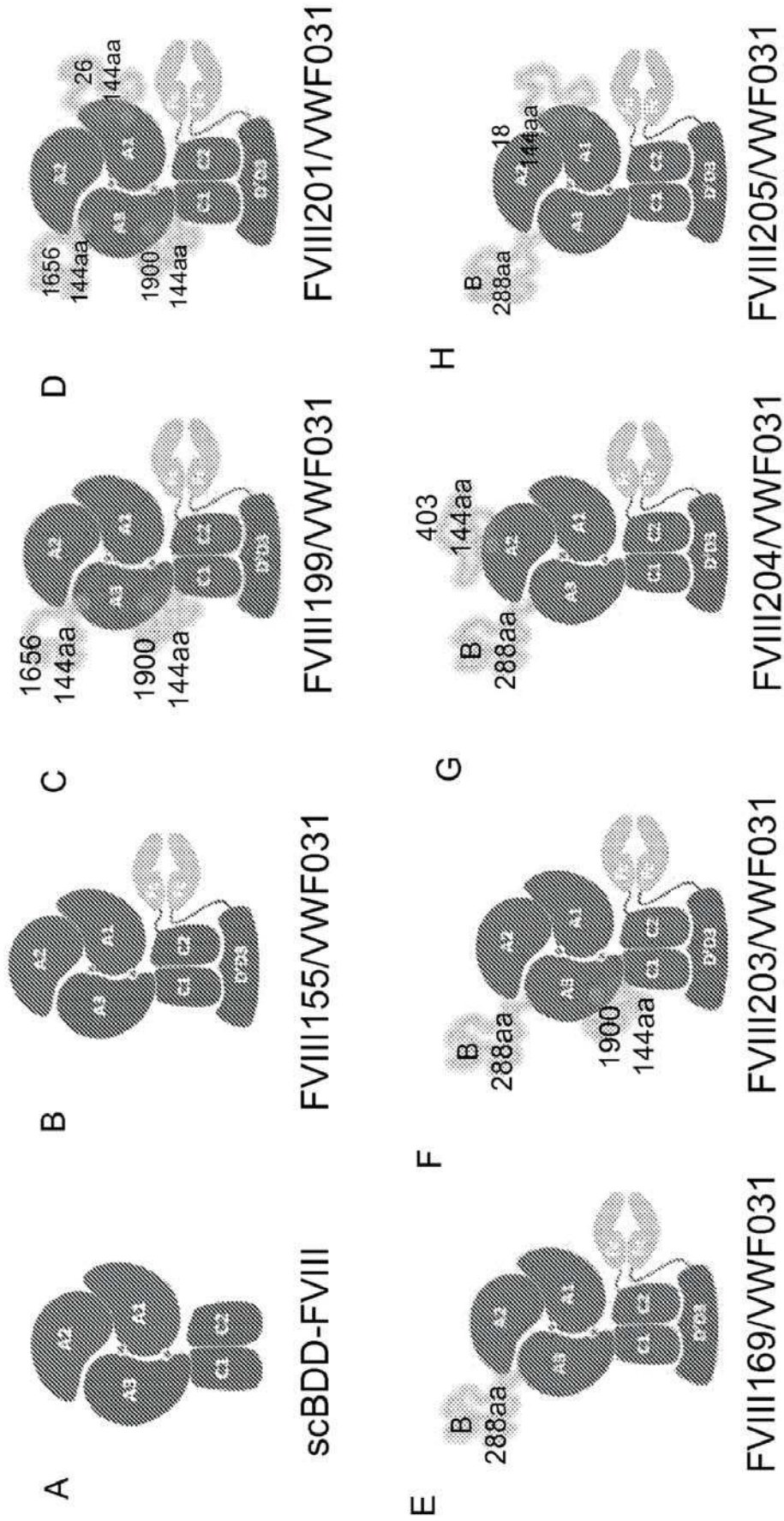




Figura 15:  
extensão de meia-vida em camundongos Hema por rFVIII-XTEN/VWF

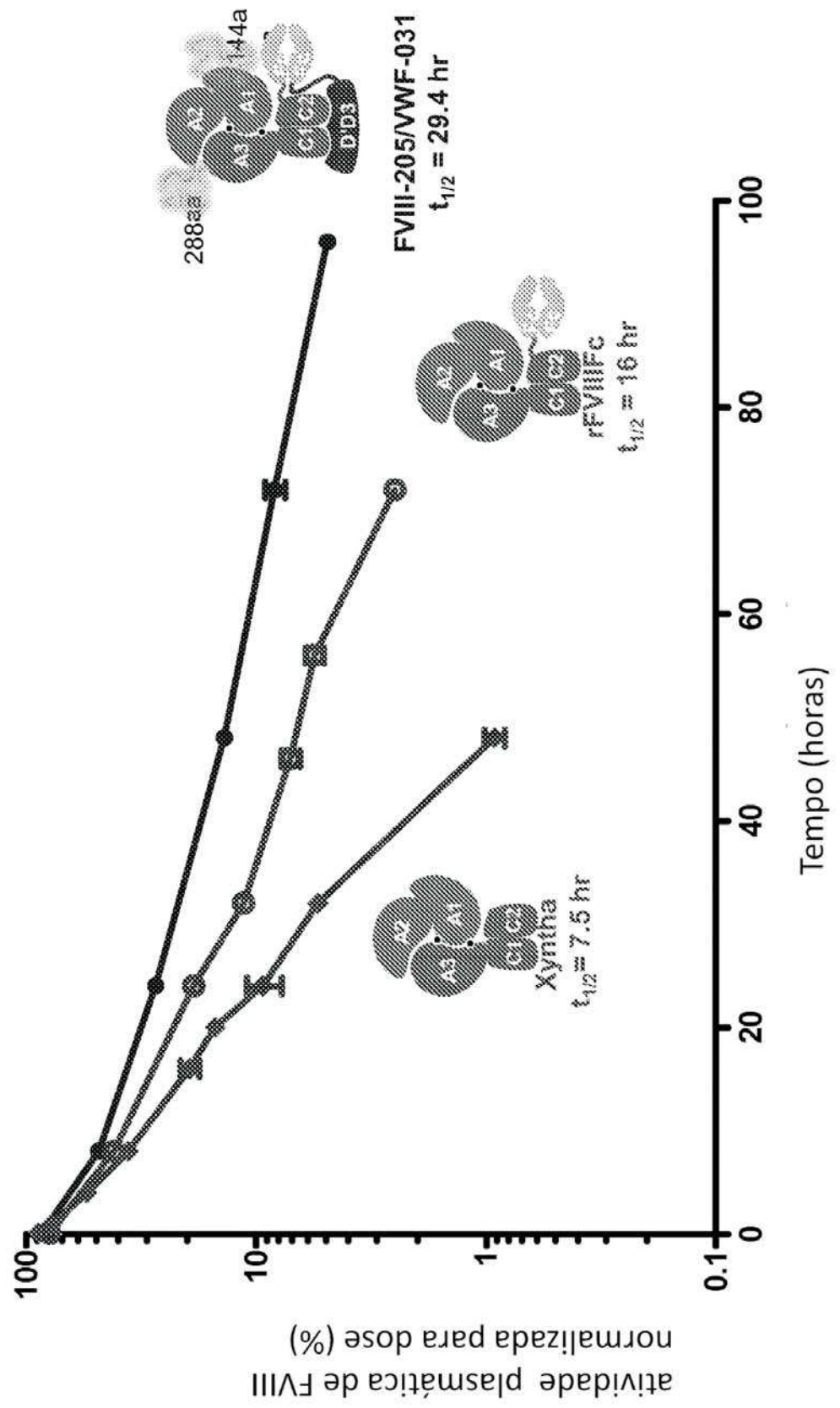


Figura 16: eficácia aguda de heterodímero FVIII-XTEN-Fc em modelo de sangramento de clipe em cauda de camundongos Hema

