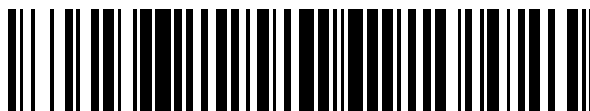


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 778**

51 Int. Cl.:

A61K 38/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2012** **PCT/US2012/041777**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012** **WO12170969**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2012** **E 12797036 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018** **EP 2717898**

54 Título: **Compuestos procoagulantes y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

10.06.2011 US 201161495818 P
13.06.2011 US 201161496540 P
13.06.2011 US 201161496543 P
13.06.2011 US 201161496541 P
13.06.2011 US 201161496542 P
17.02.2012 US 201261600237 P
01.03.2012 US 201261605540 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
16.09.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

THORN, KARINA;
TOBY, GARABET G. y
MEZO, ADAM R.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 724 778 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos procoagulantes y procedimientos de uso de los mismos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos procoagulantes útiles para el tratamiento de trastornos de la coagulación, tales como la hemofilia A y B.

Antecedentes de la invención

La ruta de coagulación sanguínea, en parte, implica la formación de un complejo enzimático de Factor VIIIa (FVIIIa) y Factor IXa (FIXa) (complejo Xasa) en la superficie de las plaquetas. FIXa es una serina proteasa con actividad catalítica relativamente débil sin su cofactor FVIIIa. El complejo Xasa escinde el factor X (FX) en el factor Xa (FXa), que a su vez interactúa con el factor Va (FVa) para escindir protrombina y generar trombina.

La hemofilia A es un trastorno hemorrágico causado por mutaciones y/o eliminaciones en el gen del Factor VIII (FVIII) que producen una deficiencia de actividad de FVIII. En algunos casos, los pacientes tienen niveles reducidos de FVIII debido a la presencia de inhibidores de FVIII, tales como anticuerpos anti-FVIII.

La hemofilia A se caracteriza por la hemorragia espontánea y el sangrado excesivo después de un traumatismo. Con el tiempo, la hemorragia repetida en los músculos y las articulaciones, que a menudo comienza en la primera infancia, produce artropatía hemofílica y daño articular irreversible. Este daño es progresivo y puede conducir a una movilidad de las articulaciones gravemente limitada, atrofia muscular y dolor crónico (Rodriguez-Merchan, E.C., Semin. Thromb. Hemost. 29:87-96 (2003).

La enfermedad se puede tratar mediante terapia de reemplazo dirigida a la restauración de la actividad de FVIII a niveles normales del 1 al 5 % para prevenir el sangrado espontáneo (véase, por ejemplo, Mannucci, P.M., et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-9 (2001)). Existen productos de FVIII recombinantes y derivados de plasma disponibles para tratar episodios de sangrado a demanda o para prevenir episodios de sangrado mediante tratamiento profiláctico. Basándose en la semivida de estos productos (10-12 h) (White G.C., et al., Thromb. Haemost. 77:660-7 (1997); Morfini, M., Haemophilia 9 (supl. 1):94-99; discussion 100 (2003)), los regímenes de tratamiento requieren administración intravenosa frecuente, comúnmente de dos a tres veces a la semana para la profilaxis y de una a tres veces al día para el tratamiento a demanda (Manco-Johnson, M.J., et al., N. Engl. J. Med. 357:535-544 (2007)). Dicha administración frecuente es dolorosa y molesta.

Aunque el tratamiento a demanda todavía se usa con frecuencia, existe una tendencia hacia la profilaxis y la prevención del daño articular (Blanchette P, et al., Haemophilia 2004; 10:679-683, Manco-Johnson, MJ, et al., N. Engl. J. Med. 2007; 357:535-544). Los productos actuales de FVIII se administran cada dos o tres días para la profilaxis debido a la semivida relativamente corta de 10-12 h para mantener un FVIII:C superior al 1 % en los pacientes (Morfini, M, Haemophilia 2003; 9 (supl 1):94-99; discussion 100, White GC, et al., Thromb. Haemost. 1997:77:660-7, Blanchette, P, et al., J. Thromb. Haemost. 2008 Aug;6(8):1319-26). Las terapias con FVIII de acción prolongada que proporcionan una protección prolongada contra el sangrado representarían una mejora en la calidad de vida de los pacientes con hemofilia A.

Las estrategias para prolongar la semivida de los factores de coagulación incluyen pegilación (Rostin J, et al., Bioconj. Chem. 2000; 11:387-96), glucopegilación (Stennicke HR, et al., Thromb. Haemost. 2008; 100:920-8), formulación con liposomas pegilados (Spira J, et al., Blood 2006;108:3668-3673, Pan J, et al., Blood 2009;114:2802-2811) y conjugación con albúmina (Schulte S., Thromb. Res. 2008; 122 Supl 4:S14-9).

D K Liles et al. (1997) Blood Vol 90 No 10, Supplement 1 (463a, poster abstract) divulga un péptido de FVIII que puede promover la activación de FX mediada por FIXa en una superficie de fosfolípidos. Sin embargo, en presencia de FVIIIa, el péptido inhibe la activación de FX mediada por FIXa. Una publicación revisada por pares de estos autores que confirma los resultados divulgados no estaba disponible al momento de esta solicitud.

Blostein et al (2000) Biochemistry 39:12000-12006 divulga que las hélices alfa anfipáticas pueden interactuar con los dominios FIXa Gla y aumentan la activación de FX en ausencia de fosfolípido.

En condiciones normales, las plaquetas activadas proporcionan la superficie lipídica que soporta la coagulación. Dado que las plaquetas son activadas por la trombina, que se forma en los sitios de lesión vascular, los procesos de coagulación están restringidos a los sitios de las lesiones. Sin embargo, no es deseable proporcionarle al cuerpo péptidos que sean sustitutos generales de los lípidos procoagulantes, ya que esto causaría la coagulación sistémica y finalmente conduciría a la coagulación intravascular diseminada (DIC).

Las patentes de EE.UU. N.º 7.109.170 y 6.624.289 divulgan regiones del dominio de proteasa FIXa que interaccionan con FVIIIa y que comprenden el sitio de unión a FVIIIa de FIXa. Los péptidos inhiben la unión de FIXa a FVIIIa. Los péptidos divulgados pueden ser útiles como anticoagulantes para prevenir o tratar la trombosis.

El documento US20010014456A1 divulga moléculas de unión para FVIII humano y proteínas similares a FVIII. Estos polipéptidos se unen a polipéptidos similares a FVIII y/o FVIII y son útiles para la detección y purificación de FVIII humano y/o polipéptidos similares a FVIII a partir de soluciones tales como sangre o medios acondicionados.

En la patente de EE.UU. N.º 7.033.590 se usan anticuerpos activadores de FIX/FIXa y derivados de anticuerpos para aumentar la actividad amidolítica de FIXa, y para tratar trastornos de la coagulación sanguínea tales como hemofilia A y diátesis hemorrágica.

La patente de EE.UU. N.º 7.084.109 divulga antagonistas de FVIIa que son péptidos e inhiben la actividad de FVIIa. Los péptidos pueden ser útiles para la prevención de la trombosis arterial en combinación con terapia trombolítica.

La hemofilia B (también conocida como enfermedad de Christmas) es uno de los trastornos hemorrágicos hereditarios más comunes en el mundo. Da como resultado una disminución de la actividad de coagulación sanguínea *in vivo* e *in vitro* y requiere un control médico extenso durante toda la vida del individuo afectado.

En ausencia de intervención, el individuo afectado puede sufrir sangrado espontáneo en las articulaciones, lo que produce un dolor intenso y una inmovilidad debilitante. El sangrado en los músculos da como resultado la acumulación de sangre en esos tejidos. El sangrado espontáneo en la garganta y el cuello puede causar asfixia si no se trata de inmediato. También son prevalentes hemorragias en la orina y hemorragias graves después de la cirugía, lesiones accidentales menores o extracciones dentales.

La hemofilia B es causada por una deficiencia en el Factor IX que puede resultar de la disminución de la síntesis de la proteína del Factor IX o de una molécula defectuosa con actividad reducida.

FIX humano, un miembro del grupo de polipéptidos dependientes de la vitamina K, es una glucoproteína monocatenaria con un peso molecular de 57 kDa, que es secretada por células hepáticas en el torrente sanguíneo como un zimógeno inactivo de 415 aminoácidos. Contiene 12 residuos de ácido γ -carboxi-glutámico localizados en el dominio Gla N-terminal del polipéptido. Los residuos de Gla requieren vitamina K para su biosíntesis. Tras el dominio Gla, hay dos dominios del factor de crecimiento epidérmico, un péptido de activación y un dominio de serina proteasa de tipo tripsina. Las modificaciones postraduccionales de FIX abarcan hidroxilación (Asp 64), N-(Asn157 y Asn167), así como glucosilación de tipo O (Ser53, Ser61, Thr159, Thr169 y Thr172), sulfatación (Tyr155) y fosforilación (Ser158). FIX se convierte en su forma activa, Factor IXa, por proteólisis del péptido de activación en Arg145-Ala146 y Arg180-Va1181, lo que causa la formación de dos cadenas polipeptídicas, una cadena ligera N-terminal (18 kDa) y una cadena pesada C-terminal (28 kDa), que se mantienen unidas por un puente disulfuro. La escisión de activación del Factor IX se puede lograr *in vitro*, por ejemplo, mediante el Factor XIa o el Factor VIIa/TF. El Factor IX está presente en el plasma humano a una concentración de 5-10 $\mu\text{g/ml}$. Se descubrió que la semivida plasmática terminal del Factor IX en seres humanos era de aproximadamente 15 a 18 horas (White G C et al. 1997. Recombinant factor IX. Thromb Haemost. 78: 261-265; Ewenstein B M et al. 2002. Pharmacokinetic analysis of plasma-derived and recombinant F IX concentrates in previously treated patients with moderate or severe hemophilia B. Transfusion 42:190-197).

El tratamiento de la hemofilia B ocurre al reemplazar el factor de coagulación faltante por concentrados de factor exógenos altamente enriquecidos en Factor IX. Sin embargo, generar dicho concentrado a partir de la sangre es difícil. La purificación del Factor IX a partir del plasma (Factor IX derivado del plasma; pdFIX) produce casi exclusivamente el Factor IX activo. Sin embargo, dicha purificación de FIX a partir de plasma es muy difícil porque FIX solo está presente en concentraciones bajas en plasma (Andersson, Thrombosis Research 7: 451 459 (1975). Además, la purificación a partir de sangre requiere la eliminación o inactivación de agentes infecciosos tales como el VIH y el VHC. Además, pdFIX tiene una semivida corta y, por lo tanto, requiere una dosificación frecuente. También está disponible el FIX recombinante (rFIX), pero adolece de la misma semivida corta y la necesidad de una dosificación frecuente (por ejemplo, 2-3 veces por semana para profilaxis) que pdFIX.

Un producto de FVIIa recombinante es comercializado por Novo Nordisk (NovoSeven).

La reducción de la mortalidad, la prevención del daño articular y la mejora de la calidad de vida han sido logros importantes debido al desarrollo de factores de coagulación recombinantes y derivados de plasma. La protección prolongada contra la hemorragia representaría otro avance clave en el tratamiento de pacientes con hemofilia. Sin embargo, hasta la fecha, no se han desarrollado productos que permitan una protección prolongada.

Sin embargo, sigue existiendo una gran necesidad de terapias procoagulantes mejoradas para el tratamiento (por ejemplo, tratamiento profiláctico) de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación sanguínea que sea más tolerables y más efectivos que las terapias actuales. Las terapias de moléculas pequeñas, que pueden administrarse por vía no intravenosa son particularmente útiles.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente divulgación proporciona compuestos de bajo peso molecular (por ejemplo, péptidos o derivados peptídicos) con actividad procoagulante útiles para el tratamiento (por ejemplo, tratamiento intravenoso o no intravenoso) de diátesis hemorrágica (por ejemplo, trastornos de coagulación sanguínea/coagulopatías, tales como hemofilia A y hemofilia B) o para el tratamiento de deficiencias en al menos uno de Factor V (FV), Factor FVII (FVII), Factor VIII (FVIII), Factor IX (FIX), Factor X (FX), Factor XI (FXI), Factor XII (FXII), Factor XIII (FXIII) y Factor de von Willebrand (vWF). En un ejemplo, los compuestos actuales exhiben una mayor estabilidad *in vivo* que los tratamientos conocidos (por ejemplo, FVIII, FIX o FVIIa) y tienen el potencial de reducir significativamente el coste de tratar los trastornos de la coagulación.

En diversos aspectos, los compuestos de la presente divulgación son capaces de aumentar la actividad catalítica de un factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, FIXa o FVIIa). En otros aspectos, los compuestos de la divulgación exhiben actividad biológica en presencia de FVIII (es decir, poseen actividad aditiva con FVIII). En otro ejemplo, los compuestos actuales son útiles para el tratamiento de la coagulación alterada en pacientes con inhibidores de FVIII.

La presente divulgación proporciona además conjugados que contienen un polipéptido seleccionado de entre factores de coagulación sanguínea (por ejemplo, FVIII, FIX, FVIIa) y restos de direccionamiento a plaquetas (por ejemplo, PDG-13), donde el polipéptido está unido a un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido procoagulante o un derivado peptídico), opcionalmente a través de un enlazador. La presente divulgación proporciona además conjugados donde un compuesto (por ejemplo, un péptido o un derivado peptídico) tiene actividad procoagulante.

La presente divulgación proporciona un compuesto (por ejemplo, un péptido o un derivado peptídico) que comprende: (a) una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula (I):



o (b) una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa de la secuencia de aminoácidos de (a). Un compuesto puede estar presente como una sal farmacéuticamente aceptable. En la Fórmula (I), L es L-leucina; A es L-alanina; S es L-serina; Y es L-tirosina, donde uno o dos de L, A, S e Y se reemplazan opcionalmente con un aminoácido de reemplazo seleccionado independientemente de entre D- y L-aminoácidos. Los aminoácidos y aminoácidos de reemplazo ejemplares para L, A, S e Y se describen en el presente documento.

En algunos aspectos, un compuesto de la presente divulgación incluye al menos 9 y no más de aproximadamente 500 residuos de aminoácidos. En algunos aspectos, un compuesto de la presente divulgación incluye al menos 12 y no más de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos. Otros intervalos adecuados para el número de aminoácidos en los compuestos de la presente divulgación se describen en el presente documento.

En la Fórmula (I), C^1 y C^2 se seleccionan independientemente de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral, donde las cadenas laterales de C^1 y C^2 están unidas para formar un bucle. En un ejemplo, C^1 y C^2 se seleccionan independientemente de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral que comprende un grupo -S-H, y donde las cadenas laterales de C^1 y C^2 están unidas reversiblemente a través de un enlace disulfuro. En otro ejemplo, las cadenas laterales de C^1 y C^2 están unidas covalentemente a través de un enlace amida para formar un anillo de lactama. En otro ejemplo más, las cadenas laterales de C^1 y C^2 están unidas covalentemente a través de un resto triazol opcionalmente sustituido.

La divulgación proporciona además un compuesto (por ejemplo, un péptido o un derivado peptídico) que contiene una

secuencia de aminoácidos que tiene C¹ y C², donde C¹ y C² son aminoácidos seleccionados independientemente que tienen una cadena lateral, donde las cadenas laterales de C¹ y C² están unidas, y donde C¹ y C² están separados por 4, 5 o 6 aminoácidos, donde un compuesto incluye al menos 9 y no más de 500 aminoácidos. En un aspecto, C¹ y C² están separados por 4 aminoácidos.

5

En un ejemplo, los compuestos de la presente divulgación tienen una CE₅₀ de aproximadamente 5 µM o menos en un ensayo de generación de Factor Xa (FXa) que mide la conversión del Factor X (FX) en FXa (por ejemplo, en presencia de FIXa). Un ensayo de generación de FXa adecuado se describe en el ejemplo 2 de esta solicitud. En un ejemplo particular, un compuesto tiene una CE₅₀ de aproximadamente 1 µM o menos (por ejemplo, 200 nM o menos). Ciertos

- 10 compuestos de la presente divulgación, a una concentración de 5 µM o menos, aumentan la actividad catalítica (k_{cat}) de al menos un factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, FIXa o FVIIa). Por ejemplo, los compuestos de la presente divulgación, a una concentración de 5 µM o menos, aumentan la actividad catalítica (k_{cat}) del Factor IXa (FIXa) o FVIIa para la conversión de FX en FXa en un ensayo de generación de FXa en comparación con una actividad catalítica de referencia de FIXa o FVIIa medida en ausencia del compuesto. En un ejemplo, un compuesto aumenta
- 15 la actividad catalítica (k_{cat}) de FIXa en al menos 50 veces o al menos 100 veces.

En otro ejemplo, un compuesto aumenta la actividad catalítica (k_{cat}) de FVIIa en al menos 200 veces, al menos 400 veces o al menos 1000 veces.

- 20 La divulgación proporciona además conjugados polipeptídicos que comprenden (a) un polipéptido seleccionado de entre FVIII, FIX, FVIIa y restos de direccionamiento a plaquetas, y (b) un compuesto de la presente divulgación, donde el compuesto está unido al polipéptido, opcionalmente a través de un enlazador.

Los compuestos y conjugados de la presente divulgación, tras la administración a un ser humano u otro animal, pueden producir un efecto profiláctico o terapéutico aumentado, una menor dosificación y/o frecuencia de dosificación de los factores de coagulación, o un aumento de la actividad específica y la actividad catalítica de los factores de coagulación.

25

La divulgación proporciona además una composición farmacéutica que contiene al menos un compuesto o conjugado de la presente divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables

30 adecuados se describen en el presente documento.

La divulgación proporciona además un procedimiento de aumento de la actividad catalítica (k_{cat}) de un factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, FIXa o FVIIa). El procedimiento incluye poner en contacto el factor de coagulación sanguínea (*in vitro* o *in vivo*) con un compuesto o conjugado de la presente divulgación. En un ejemplo,

35 un compuesto o conjugado interactúa con el factor de coagulación sanguínea en una región correspondiente a la secuencia de aminoácidos: MFCAG (SEQ ID NO: 1). En un ejemplo particular, el factor de coagulación sanguínea que se pone en contacto con un compuesto o conjugado de la presente divulgación es FIXa o FVIIa.

35

La divulgación proporciona además un procedimiento para tratar la diátesis hemorrágica en un sujeto mamífero (por ejemplo, un sujeto humano). Un procedimiento ejemplar incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o conjugado de la presente divulgación o una composición farmacéutica de la presente divulgación. En un ejemplo, la diátesis hemorrágica está causada por un trastorno de la coagulación sanguínea, tal como hemofilia (por ejemplo, hemofilia A) o la enfermedad de von Willebrand (vWD).

40

La divulgación proporciona además procedimientos para preparar los compuestos y conjugados de la presente divulgación. Un procedimiento ejemplar incluye la formación de un péptido que incorpora una secuencia amino deseada (o una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa de la misma) usando la síntesis peptídica en fase sólida. En un ejemplo, el procedimiento incluye además unir covalentemente el péptido a un resto heterólogo que puede prolongar la semivida de un compuesto, por ejemplo, seleccionado de entre un resto PEG, Fc, IgG, ligando de unión a FcRn, albúmina, ligando de unión a albúmina, transferrina, PAS, un polipéptido de prolongación de la semivida (es decir, XTEN) o un almidón hidroxietílico

50

En función de la divulgación contenida en el presente documento, la presente invención proporciona un compuesto que comprende:

- 55 (a) una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula (I):



donde

60

L es L-leucina;

A es L-alanina;

S es L-serina;

Y es L-tirosina;

5 C¹ y C² son cisteína;

donde la secuencia de aminoácidos comprende al menos una de:

SEQ ID NO: 4, 9-22, 24-38, 43-54, 61-64, 66-91, 93-97, 99, 104-146, 148-183, 200-202, 204-208, 214-216, 219-222,
10 226-233, 239-242, 244-246, 260, 265-267, 269-272, 282-293, 296, 307, 315, 337, 339, 346-348, 360, 362, 364, 367-375, 380, 383-386, 389, 392, 400-402, 406, 409-415, 419-421, 424-463, 471-487, 492-495, 526-529, 531, 533, 536-537, 543, 545, 547, 550-555 y PRIRTVGPGSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA; o

(b) una retrovariante, una variante inversa o una variante retro-inversa de la secuencia de aminoácidos de (a); o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

15

La presente invención y sus realizaciones se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 La figura 1 es un esquema que ilustra un ensayo de generación de FXa ejemplar. En un ejemplo, el ensayo de generación de FXa se realiza usando FIXa humano (hFIXa), por ejemplo, a 10 nM, y FX humano (hFX), por ejemplo, a 100 nM. En otro ejemplo, el ensayo de generación de FXa se realiza usando FVIIa humano (hFVIIa) y FX humano (hFX).

La figura 2 es un gráfico que ilustra el efecto aditivo entre FVIII y el compuesto 5 de la presente invención en un ensayo de generación de trombina (TGA) que utiliza 0,1 pM de factor tisular lipídado (TF) como activador de la cascada de coagulación. Los resultados indican que el compuesto 5 no compete con FVIII, sino que muestra una actividad de generación de trombina aditiva con el FVIII. El compuesto 5 aumenta el pico de trombina en presencia de bajas cantidades de rFVIII.

La figura 3 es un gráfico que ilustra que el compuesto 5 mejora la generación de trombina en plasma deficiente en FVIII humano. La generación de trombina se midió para el compuesto 5 a 10 µM y 5 µM en un ensayo de generación de trombina (TGA) usando lipTF 0,1 pM como activador. En este experimento, el compuesto 5 tiene un tiempo de retardo más corto que 0,1 o 0,25 U/ml de FVIII. La cantidad de trombina generada por 5 o 10 µM del compuesto 5 es mayor que la cantidad generada por 0,1 U/ml de FVIII. El compuesto 5 a 10 µM genera cantidades similares de trombina que aproximadamente 0,2 UI/ml de rFVIII.

35 La figura 4 es un gráfico que ilustra el intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX) para los aminoácidos 177-185 de hFIXa en ausencia y presencia del compuesto 4.

La figura 5 es un gráfico que ilustra la actividad de diversos compuestos de la presente divulgación en un ensayo de generación de trombina usando componentes hemostáticos purificados como se describe en el ejemplo 3.

La figura 6 es un gráfico que ilustra que el compuesto 5 mejora la generación de trombina de una manera dependiente de la dosis cuando se mide en un ensayo de generación de trombina usando componentes hemostáticos purificados como se describe en el ejemplo 3.

La figura 7 contiene tres gráficos que ilustran que la actividad de generación de trombina del compuesto 5 es dependiente de FIXa cuando se mide en un ensayo de generación de trombina usando componentes hemostáticos purificados como se describe en el ejemplo 3.

45 La figura 8 contiene tres gráficos que ilustran que la actividad de generación de trombina del compuesto 5 es dependiente de FXIa cuando se mide en un ensayo de generación de trombina usando componentes hemostáticos purificados como se describe en el ejemplo 3.

La figura 9 es un esquema de un conjugado que incluye FVIIa (AA), un resto heterólogo (representado por Fc) y un compuesto de la presente divulgación. Un conjugado ejemplar de acuerdo con la figura 9 se describe en el ejemplo

50 14. En un ejemplo, el conjugado de FVIIa se forma a partir de un precursor (BB) mediante un procesamiento adicional. El procesamiento implica, por ejemplo, la escisión de un enlazador escindible, por ejemplo, a través de la activación/procesamiento intracelular (por ejemplo, por cotransfección de enzimas de procesamiento tales como PC5 y PACE). En un ejemplo, en la figura 9, el compuesto es el compuesto 21.

La figura 10 es un esquema de un conjugado que incluye FIX (CC), un resto heterólogo (representado por Fc) y un compuesto de la presente divulgación. Un conjugado ejemplar de acuerdo con la figura 10 se describe en el ejemplo

55 15. En un ejemplo, el conjugado de FIX se forma a partir de un precursor (DD) mediante un procesamiento adicional. El procesamiento implica, por ejemplo, la escisión de un enlazador escindible, por ejemplo, a través de la activación/procesamiento intracelular (por ejemplo, por cotransfección de enzimas de procesamiento tales como PC5 y PACE). En un ejemplo, en la figura 10, el compuesto es el compuesto 21.

60 La figura 11 es un esquema de un conjugado de resto de direccionamiento a plaquetas (EE) que incluye un resto de

direccionamiento a plaquetas (representado por PDG-13), un resto heterólogo (representado por Fc) y un compuesto de la presente divulgación. Un conjugado ejemplar de acuerdo con la figura 11 se describe en el ejemplo 16. En un ejemplo, el conjugado (EE) se forma a partir de un precursor (EE) mediante un procesamiento adicional. El procesamiento implica, por ejemplo, la escisión de un enlazador escindible, por ejemplo, a través de la

5 activación/procesamiento intracelular (por ejemplo, por cotransfección de enzimas de procesamiento tales como PC5 y PACE). En un ejemplo, en la figura 11, el compuesto es el compuesto 21.

La figura 12 es un esquema de un conjugado (GG) que incluye un resto heterólogo (representado por Fc) y un compuesto de la presente divulgación. Un conjugado ejemplar de acuerdo con la figura 12 se describe en el ejemplo 17. En un ejemplo, el conjugado (GG) se forma a partir de un precursor (HH) mediante un procesamiento adicional. El

10 procesamiento implica, por ejemplo, la escisión de un enlazador escindible, por ejemplo, a través de la activación/procesamiento intracelular (por ejemplo, por cotransfección de enzimas de procesamiento tales como PC5 y PACE). En un ejemplo, en la figura 12, el compuesto es el compuesto 21.

En las figuras 9 a 12, el procesamiento puede implicar activación/procesamiento intracelular, que se puede realizar, por ejemplo, mediante cotransfección de enzimas de procesamiento tales como PC5 y PACE.

15 La figura 13 es un gel que muestra la presencia de diversos conjugados de la presente divulgación (según se prepararon de acuerdo con los procedimientos de los ejemplos 14-17) después de la extracción de perlas conjugadas con shFcRn a partir de medios acondicionados.

La figura 14 es un gráfico que ilustra la actividad de TGA de un conjugado de Fc-compuesto 21 como se describe en la figura 12 y el ejemplo 17 a diversas concentraciones en la mezcla de ensayo. El conjugado de Fc-compuesto 21

20 mejora la formación de trombina de una manera dependiente de la dosis y mantiene su actividad de TGA con respecto al compuesto 21 no conjugado con Fc.

La figura 15 es un gráfico que ilustra la actividad de TGA de un conjugado de FVIIa-Fc-compuesto 21 (FVII-171) como se describe en la figura 33 y el ejemplo 14 a diversas concentraciones. La actividad de TGA es aumentada por el conjugado de una manera dependiente de la dosis en comparación con la actividad para FVIIa-Fc (FVII-002) no

25 conjugado con el compuesto 21.

La figura 16 es una ilustración esquemática de conjugados que contienen un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante) unido covalentemente a una construcción de FIX-resto heterólogo, opcionalmente a través de un enlazador. Fc se usa como ejemplo de un resto heterólogo y puede

30 reemplazarse por otros restos heterólogos. La figura 17 es una ilustración esquemática de conjugados que contienen un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante) unido covalentemente a una proteína FIX, opcionalmente a través de un enlazador.

La figura 18 es una ilustración esquemática de conjugados que contienen un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante) unido covalentemente a una construcción de FVIIa-resto

35 heterólogo, opcionalmente a través de un enlazador. Fc se usa como ejemplo de un resto heterólogo y puede reemplazarse por otros restos heterólogos.

La figura 19 es una ilustración esquemática de los conjugados que contienen un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante) unido covalentemente a una proteína FVIIa, opcionalmente a través de un enlazador.

40 La figura 20 es una ilustración esquemática de conjugados que contienen un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante) unido covalentemente a una construcción de FVIII-resto heterólogo, opcionalmente a través de un enlazador. Fc se usa como ejemplo de un resto heterólogo y puede reemplazarse por otros restos heterólogos.

La figura 21 es una ilustración esquemática de los conjugados que contienen un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante) unido covalentemente a una proteína FVIII,

45 opcionalmente a través de un enlazador.

La figura 22 es una ilustración esquemática de conjugados que contienen un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o un derivado peptídico procoagulante) unido de manera covalente a un resto de direccionamiento a plaquetas (construcción H3) o una construcción de restos heterólogos de direccionamiento a

50 plaquetas (H1, H2, Ha, Hb) opcionalmente a través de un enlazador. Fc se usa como ejemplo de un resto heterólogo y puede reemplazarse por otros restos heterólogos.

La figura 23 es una ilustración esquemática de un procedimiento general para unir covalentemente un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o un derivado peptídico procoagulante) a una construcción FVIII-Fc, una FIX-Fc o una FVIIa-Fc usando una estrategia de ligamiento nativo. El residuo de cisteína usando para el ligamiento

55 se puede reemplazar con otros aminoácidos reactivos y se puede hacer reaccionar con un grupo reactivo complementario ubicado en un compuesto.

La figura 24 es una ilustración esquemática de un procedimiento general para unir covalentemente un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o un derivado peptídico procoagulante) a una construcción FVIII-Fc, una construcción FIX-Fc o una construcción FVIIa-Fc usando una estrategia de ligamiento dirigido a un sitio. El residuo

60 de cisteína usando para el ligamiento se puede reemplazar con otros aminoácidos reactivos y se puede hacer

reaccionar con un grupo reactivo complementario ubicado en un compuesto.

La figura 25 es una ilustración esquemática de un procedimiento general para unir covalentemente un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o un derivado peptídico procoagulante) a una construcción de resto de direccionamiento a plaquetas-Fc usando una estrategia de ligamiento nativo.

- 5 La figura 26 es una ilustración esquemática de un procedimiento general para unir covalentemente un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o un derivado peptídico procoagulante) a una construcción de resto de direccionamiento a plaquetas-Fc usando una estrategia de ligamiento dirigido a un sitio.

Los enlazadores de las figuras 1 a 26 pueden ser cualquier enlazador, por ejemplo, los descritos en el presente documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Compuestos

- 15 En diversos aspectos, la presente divulgación proporciona compuestos con actividades procoagulantes. En un ejemplo, un compuesto incluye una secuencia de aminoácidos que comprende C¹ y C², donde C¹ y C² se seleccionan independientemente de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral, donde las cadenas laterales de C¹ y C² se unen para formar una estructura de bucle. En un ejemplo, las cadenas laterales de aminoácidos de C¹ y C² están unidas reversiblemente a través de un enlace disulfuro. En otro ejemplo, las cadenas laterales de C¹ y C² se unen covalentemente a través de un enlace amida para formar un anillo de lactama (por ejemplo, formado entre el grupo amino de un residuo de lisina y el grupo ácido carboxílico de un residuo de ácido glutámico o uno de ácido aspártico). En un ejemplo, C¹ y C² están separados por 3, 4, 5 o 6 aminoácidos. En otro ejemplo, C¹ y C² están separados por 3, 4 o 5 aminoácidos. En otro ejemplo más, C¹ y C² están separados por 4 o 5 aminoácidos. En otro ejemplo más, C¹ y C² están separados por 3 o 4 aminoácidos. En un ejemplo adicional, C¹ y C² están separados por 4 aminoácidos.

- En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, un compuesto que incluye la secuencia de aminoácidos que incorpora C¹ y C² contiene al menos 9 y no más de 500 aminoácidos. En otro ejemplo, un compuesto comprende al menos 12 y no más de 100 aminoácidos. En un ejemplo adicional, un compuesto comprende al menos 20 y no más de 100 o 50 aminoácidos. Intervalos adecuados adicionales para el número de aminoácidos en un compuesto de la presente divulgación se describen en el presente documento.

La presente divulgación también proporciona un compuesto que incluye:

(a) una secuencia de aminoácidos que incluye la Fórmula (I):



- o (b) una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa de la secuencia de aminoácidos de (a). La presente divulgación proporciona además sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del compuesto anterior.

- 40 En la Fórmula (I), C¹ y C² son aminoácidos que tienen una cadena lateral, donde las cadenas laterales de C¹ y C² están unidas para formar un bucle. En un ejemplo, las cadenas laterales de C¹ y C² están unidas covalentemente (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro o un enlace amida).

- 45 En un ejemplo, en la Fórmula (I), se pueden insertar uno, dos o tres aminoácidos adicionales en cualquier lugar entre C¹ y C². En un ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, uno o dos aminoácidos adicionales se insertan opcionalmente en la Fórmula (I) en cualquier lugar entre C¹ y C². En otro ejemplo, un aminoácido se inserta opcionalmente en la Fórmula (I) en cualquier lugar entre C¹ y C². En otro ejemplo, C¹ y C² están separados por exactamente 4 aminoácidos.

- 50 En la Fórmula (I), L es L-leucina, A es L-alanina, S es L-serina e Y es L-tirosina. En la Fórmula (I), uno, dos o tres de L, A, S e Y se reemplazan opcionalmente con un aminoácido de reemplazo seleccionado independientemente. En un ejemplo, uno o dos de L, A, S e Y se reemplazan opcionalmente con un aminoácido de reemplazo seleccionado independientemente. En otro ejemplo, exactamente uno de L, A, S e Y se reemplaza opcionalmente con un aminoácido de reemplazo seleccionado independientemente. En un ejemplo, la secuencia de aminoácidos de un compuesto incluye la secuencia CLASYC.

- En un ejemplo, cada aminoácido de reemplazo se selecciona independientemente de L- y D-aminoácidos. En otro ejemplo, el aminoácido de reemplazo es un aminoácido proteinógeno. En otro ejemplo, el aminoácido de reemplazo es un aminoácido no proteinógeno. Los ejemplos de aminoácidos no proteinógenos se describen en el presente

documento e incluyen, por ejemplo, homo-análogos, tales como homo-fenilalanina y homo-cisteína. En otro ejemplo más, el aminoácido de reemplazo es un aminoácido modificado (que incluye aminoácidos proteinógenos modificados y aminoácidos no proteinógenos modificados). Los ejemplos de aminoácidos modificados incluyen, por ejemplo, aminoácidos alfa-N-alkilados, derivados de tirosina (por ejemplo, aquellos en los que el grupo hidroxilo se convierte en un grupo éter o éster), derivados de lisina (por ejemplo, aquellos en los que el grupo NH_2 se convierte en un grupo amida o un grupo sulfonamida), y aminoácidos, en los que un grupo ácido carboxílico se derivatiza, por ejemplo, se esterifica, se convierte en un grupo amida, y similares. Otros ejemplos de aminoácidos de reemplazo adecuados se divulgan en el presente documento. En un ejemplo, L, A, S e Y se seleccionan de entre aminoácidos distintos de los que tienen una cadena lateral que comprende un grupo -S-H o un grupo -Se-H (por ejemplo, distinto de cisteína).

En un ejemplo en la Fórmula (I), C^1 y C^2 se seleccionan independientemente de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral que comprende un grupo -S-H o un grupo -Se-H y las cadenas laterales de C^1 y C^2 están unidas (por ejemplo, unidas reversiblemente) a través de un enlace disulfuro (-S-S-), un enlace diselenuro (-Se-Se-), un enlace -Se-S- o un enlace -S-Se-. En otro ejemplo en la Fórmula (I), C^1 y C^2 se seleccionan independientemente de entre cisteína, homo-cisteína (HCy), seleno-cisteína (U), homo-seleno cisteína y D-aminoácidos de los mismos. En otro ejemplo en la Fórmula (I), C^1 se selecciona de entre cisteína, homo-cisteína (HCy), seleno-cisteína (U), homo-seleno cisteína y D-aminoácidos de los mismos. En otro ejemplo en la Fórmula (I), C^2 se selecciona de entre L-cisteína, L-homo-cisteína (HCy), L-seleno-cisteína (U) y L-homo-seleno cisteína. En otro ejemplo más, C^1 en la Fórmula (I) se selecciona de entre cisteína, homo-cisteína (HCy), seleno-cisteína (U), homo-seleno cisteína y D-aminoácidos de los mismos, y C^2 se selecciona de entre L-cisteína, L-homo-cisteína (HCy), L-seleno-cisteína (U) y L-homo-seleno cisteína.

En un ejemplo en la Fórmula (I), C^1 y C^2 se seleccionan independientemente de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral que comprende un grupo -S-H, donde las cadenas laterales de C^1 y C^2 están unidas (por ejemplo, unidas reversiblemente) a través de un enlace disulfuro. En otro ejemplo, C^1 y C^2 se seleccionan independientemente de entre cisteína y homo-cisteína. En otro ejemplo más, C^1 y C^2 son ambos cisteína. En otro ejemplo más en la Fórmula (I), C^1 se selecciona de entre L-cisteína y D-cisteína. En otro ejemplo más en la Fórmula (I), C^2 es L-cisteína. En otro ejemplo en la Fórmula (I), C^1 se selecciona de entre L-cisteína y D-cisteína, y C^2 es L-cisteína.

El enlace covalente entre las cadenas laterales de C^1 y C^2 puede ser reversible. En un ejemplo de acuerdo con los aspectos anteriores en los que C^1 y C^2 se seleccionan de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral que incorpora un grupo -SH o Se-H, un cierto porcentaje (por ejemplo, menos del 50 %, menos de aproximadamente el 40 %, menos de aproximadamente el 30 %, menos de aproximadamente el 20 %, menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 8 %, menos de aproximadamente el 6 %, menos de aproximadamente el 4 % o menos de aproximadamente el 2 %) de un compuesto puede existir en forma abierta (es decir, en la que las cadenas laterales de C^1 y C^2 no están unidas para formar un bucle). Por tanto, esos enlaces se conocen como reversibles. Por ejemplo, cuando las cadenas laterales de C^1 y C^2 comprenden un grupo -SH (por ejemplo, cisteína), entonces C^1 y C^2 pueden unirse de manera reversible mediante un enlace disulfuro, donde algunas moléculas existen en forma abierta, pero donde la mayoría estarán unidas covalentemente mediante un enlace disulfuro. Si las cadenas laterales de C^1 y C^2 están o no unidas covalentemente puede depender del entorno químico en el que existe un compuesto. Por ejemplo, en un entorno reductor, un enlace disulfuro puede romperse o no formarse.

En un ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, las cadenas laterales de C^1 y C^2 están unidas covalentemente a través de un enlace amida para formar un anillo de lactama. En un aspecto de acuerdo con este ejemplo, uno de C^1 y C^2 se selecciona de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral con un grupo amino primario o secundario (por ejemplo, grupo -NH_2), y el otro de C^1 y C^2 se selecciona de entre un aminoácido con una cadena lateral que tiene un grupo ácido carboxílico (por ejemplo, grupo -COOH), donde el grupo amino y el grupo ácido carboxílico forman un enlace amida. Los procedimientos para la formación de enlaces amida entre las cadenas laterales de C^1 y C^2 se describen en el presente documento (véase, por ejemplo, el ejemplo 1). Por ejemplo, el grupo ácido carboxílico puede activarse primero antes de la reacción con el grupo amino.

En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, uno de C^1 y C^2 se selecciona de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral aminoalquilo lineal o ramificada, por ejemplo, aminoalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_{10}$), y el otro de C^1 y C^2 se selecciona de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral carboxialquilo lineal o ramificada, por ejemplo, carboxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_{10}$), donde un grupo amino de la cadena lateral aminoalquilo y un grupo ácido carboxílico de la cadena lateral carboxialquilo están unidos para formar un enlace amida. En otro ejemplo, uno de C^1 y C^2 se selecciona de entre lisina (ácido 2,6-diamino-hexanoico), ácido 2,5-diamino-pentanoico (ornitina; Orn), ácido 2,4-diamino-butírico (Dab), ácido 2,3-diamino-propiónico (Dpr), ácido 2,7-diamino-heptanoico y ácido 2,8-diamino-octanoico, y el otro de C^1 y C^2 se selecciona de entre ácido aspártico, ácido glutámico (ácido 2-amino-pentanodioico), ácido 2-amino-hexanodioico, ácido 2-amino-heptanodioico y ácido 2-amino-octanodioico.

En otro ejemplo más de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, uno de C¹ y C² se selecciona de entre lisina (K), ácido 2,4-diaminobutírico (Dab), ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr) y ornitina (Orn), y el otro de C¹ y C² se selecciona de entre ácido aspártico y ácido glutámico. En otro ejemplo, uno de C¹ y C² es lisina y el otro de C¹ y C² se selecciona de entre ácido aspártico y ácido glutámico.

En un ejemplo adicional, las cadenas laterales de C¹ y C² están unidas covalentemente a través de un resto triazol. El resto triazol puede estar opcionalmente sustituido, por ejemplo, con alquilo, por ejemplo, alquilo (C₁-C₄), u OR⁹, donde R⁹ se selecciona de entre H y alquilo (C₁-C₄). Los expertos en la materia conocen procedimientos para formar un resto triazol (véase, por ejemplo, Holland-Nell, K y Meldal, M; Angew. Chem Int. Ed. 2011, 50: 5204-5206 y las referencias citadas en este documento). En un ejemplo, el resto triazol se forma entre un grupo azida de una de las cadenas laterales de C¹ y C², y un resto alquino de la cadena lateral de la otra de C¹ y C² (por ejemplo, la cicloadición de Huisgen). En un ejemplo, uno de C¹ y C² se selecciona de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral de azidoalquilo lineal o ramificada, por ejemplo, azidoalquilo (C₁-C₁₀), y el otro de C¹ y C² se selecciona de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral alquinilo lineal o ramificada, por ejemplo, alquinilo (C₁-C₁₀), donde un resto azida del grupo azidoalquilo y un resto alquino del grupo alquinilo están unidos para formar un resto triazol (por ejemplo, un resto 1,4-triazol o un resto 1,5-triazol). En un ejemplo, el aminoácido alquino funcionalizado es propargilglicina (Pra). En otro ejemplo, el aminoácido alquino funcionalizado se selecciona de entre ácido 2-amino-4-azido-butírico (2Abu(γN₃)) y 5-azido-norvalina (NVA(δN₃)). La formación del anillo de triazol se puede lograr usando un catalizador adecuado, tal como un catalizador de cobre, por ejemplo, Cu(I) (por ejemplo, CuSO₄/tris(carboxietil)fosfina), o un catalizador adecuado a base de rutenio.

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, S en la Fórmula (I) se selecciona de entre serina y aminoácidos de reemplazo que tienen una cadena lateral que comprende un grupo hidroxilo. En otro ejemplo, S en la Fórmula (I) es serina. En otro ejemplo, S en la Fórmula (I) es L-serina.

En un ejemplo en la Fórmula (I), cada aminoácido de reemplazo para L, A, S e Y, cuando está presente, se selecciona de entre L-aminoácidos. En un ejemplo adicional en la Fórmula (I), S es L-serina o un aminoácido de reemplazo, L es L-leucina o un aminoácido de reemplazo, A es L-alanina o un aminoácido de reemplazo e Y es L-tirosina o un aminoácido de reemplazo, donde cada aminoácido de reemplazo para L, A, S e Y se selecciona independientemente de entre L-aminoácidos.

En otro ejemplo en la Fórmula (I), S es serina, L es L-leucina o un aminoácido de reemplazo, A es L-alanina o un aminoácido de reemplazo e Y es L-tirosina o un aminoácido de reemplazo, donde cada aminoácido de reemplazo para L, A e Y se selecciona independientemente de entre L-aminoácidos.

En otro ejemplo en la Fórmula (I), S es L-serina, L es L-leucina o un aminoácido de reemplazo, A es L-alanina o un aminoácido de reemplazo e Y es L-tirosina o un aminoácido de reemplazo, donde cada aminoácido de reemplazo para L, A e Y se selecciona independientemente de entre L-aminoácidos.

En un ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, el reemplazo de uno o dos de L, A, S e Y en la Fórmula (I) con un aminoácido de reemplazo, o la inserción de un aminoácido adicional, da como resultado una carga neta neutra entre C¹ y C². En otro ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, S es serina y el reemplazo de uno o dos de L, A e Y en la Fórmula (I) con un aminoácido de reemplazo, o la inserción de un aminoácido adicional, da como resultado una carga neta neutra entre C¹ y C². Una carga neta no neutra entre C¹ y C² resulta, por ejemplo, cuando uno de L, A, S e Y en la Fórmula (I) se elige de entre un aminoácido que tiene una cadena lateral que incorpora un grupo ácido, por ejemplo, ácido carboxílico (es decir, -COO⁻) o un grupo básico, por ejemplo, amino (es decir, -NH₃⁺), mientras que el resto de L, A, S e Y se eligen de entre aminoácidos con una cadena lateral hidrófoba o una no cargada polar. Por lo tanto, en un ejemplo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, cada aminoácido de reemplazo para L, A, S e Y en la Fórmula (I), cuando está presente, se selecciona independientemente de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba o una no cargada polar; por ejemplo, se seleccionan independientemente de entre G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y P (por ejemplo, G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q).

En un ejemplo adicional, S es L-serina o un aminoácido de reemplazo, L es L-leucina o un aminoácido de reemplazo, A es L-alanina o un aminoácido de reemplazo e Y es L-tirosina o un aminoácido de reemplazo, donde cada aminoácido de reemplazo para L, A, S e Y se selecciona independientemente de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba o una no cargada polar.

En un ejemplo adicional, S es L-serina o un aminoácido de reemplazo, L es L-leucina o un aminoácido de reemplazo,

A es L-alanina o un aminoácido de reemplazo e Y es L-tirosina o un aminoácido de reemplazo, donde cada aminoácido de reemplazo para L, A, S e Y se selecciona independientemente de entre G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y P (por ejemplo, G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q). En un ejemplo adicional, S es serina, L es L-leucina o un aminoácido de reemplazo, A es L-alanina o un aminoácido de reemplazo e Y es L-tirosina o un aminoácido de reemplazo, donde cada aminoácido de reemplazo para L, A e Y, cuando está presente, se selecciona independientemente de entre G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y P (por ejemplo, G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q). En un ejemplo adicional, S es L-serina, L es L-leucina o un aminoácido de reemplazo, A es L-alanina o un aminoácido de reemplazo e Y es L-tirosina o un aminoácido de reemplazo, donde cada aminoácido de reemplazo para L, A, e Y se selecciona independientemente de entre G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y P (por ejemplo, G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q).

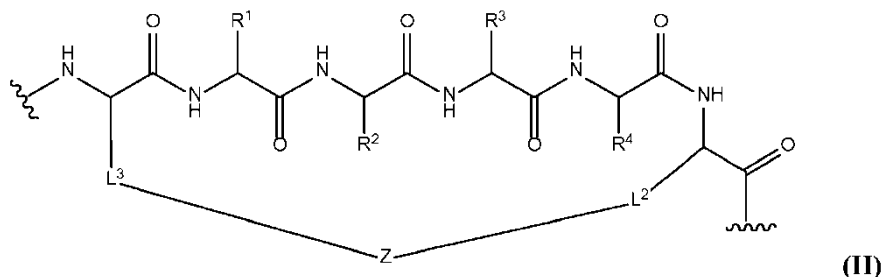
En otro ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, al menos uno de L, A, S e Y en la Fórmula (I) se reemplaza con un aminoácido de reemplazo. En otro ejemplo, exactamente uno de L, A, S e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo. En otro ejemplo, exactamente uno de L, A, S e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo, donde el aminoácido de reemplazo se selecciona de entre L-aminoácidos. En otro ejemplo, al menos uno de L, A, S e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo, donde el aminoácido de reemplazo se selecciona de entre G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y P (por ejemplo, G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q). En otro ejemplo, exactamente uno de L, A, S e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo, donde el aminoácido de reemplazo se selecciona de entre G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y P (por ejemplo, G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q).

En otro ejemplo, S es serina y al menos uno de L, A e Y en la Fórmula (I) se reemplaza con un aminoácido de reemplazo. En otro ejemplo, S es serina y exactamente uno de L, A e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo. En otro ejemplo, S es serina y al menos uno de L, A e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo, donde el aminoácido de reemplazo se selecciona de entre L-aminoácidos. En otro ejemplo, S es serina y exactamente uno de L, A e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo, donde el aminoácido de reemplazo se selecciona de entre L-aminoácidos. En otro ejemplo, S es serina y al menos uno de L, A e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo, donde el aminoácido de reemplazo se selecciona de entre G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y P (por ejemplo, G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q). En otro ejemplo, S es serina y exactamente uno de L, A e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo, donde el aminoácido de reemplazo se selecciona de entre G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y P (por ejemplo, G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q).

En un ejemplo, S es L-serina y al menos uno de L, A e Y en la Fórmula (I) se reemplaza con un aminoácido de reemplazo. En otro ejemplo, S es L-serina y exactamente uno de L, A e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo. En otro ejemplo, S es L-serina y al menos uno de L, A e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo, donde el aminoácido de reemplazo se selecciona de entre L-aminoácidos. En otro ejemplo, S es L-serina y exactamente uno de L, A e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo, donde el aminoácido de reemplazo se selecciona de entre L-aminoácidos. En otro ejemplo, S es L-serina y al menos uno de L, A e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo, donde el aminoácido de reemplazo se selecciona de entre G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y P (por ejemplo, G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q). En otro ejemplo, S es L-serina y exactamente uno de L, A e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo, donde el aminoácido de reemplazo se selecciona de entre G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y P (por ejemplo, G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q). En un ejemplo adicional en la Fórmula (I), S es L-serina, L es L-leucina, A es L-alanina e Y es L-tirosina, y ninguno de L, A, S e Y se reemplaza con un aminoácido de reemplazo.

En otro ejemplo, exactamente dos de L, A, S e Y se reemplazan con un aminoácido de reemplazo. En otro ejemplo, exactamente dos de L, A, S e Y se reemplazan con un aminoácido de reemplazo, donde cada aminoácido de reemplazo se selecciona independientemente de entre L-aminoácidos. En otro ejemplo, S es serina y exactamente dos de L, A e Y se reemplazan con un aminoácido de reemplazo. En otro ejemplo, S es serina y exactamente dos de L, A e Y se reemplazan con un aminoácido de reemplazo, donde cada aminoácido de reemplazo se selecciona independientemente de entre L-aminoácidos. En otro ejemplo, S es serina y exactamente dos de L, A e Y se reemplazan con un aminoácido de reemplazo, donde cada aminoácido de reemplazo para L, A e Y se selecciona independientemente de entre G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y P (por ejemplo, G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q). En otro ejemplo, S es L-serina y exactamente dos de L, A e Y se reemplazan con un aminoácido de reemplazo, donde cada aminoácido de reemplazo para L, A e Y se selecciona independientemente de entre G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y P (por ejemplo, G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q).

La presente divulgación proporciona además un compuesto que contiene un péptido de Fórmula (II):



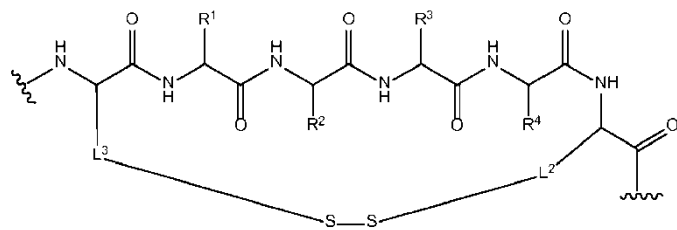
o una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa del mismo.

- 5 En la Fórmula (II), R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son miembros seleccionados independientemente de entre cadenas laterales de aminoácidos. En la Fórmula (II), L^2 y L^3 son grupos enlazadores seleccionados independientemente de entre alquileo lineal o ramificado, y heteroalquileo lineal o ramificado. En un ejemplo, L^2 y L^3 se seleccionan independientemente de entre alquileo (C_1 - C_{20}) lineal o ramificado. En otro ejemplo, L^2 y L^3 se seleccionan independientemente de entre alquileo (C_1 - C_{10}) lineal o ramificado. En otro ejemplo más, L^2 y L^3 se seleccionan independientemente de entre alquileo (C_1 - C_6) lineal o ramificado. En otro ejemplo más, L^2 y L^3 se seleccionan independientemente de entre alquileo (C_1 - C_4) lineal o ramificado. En un ejemplo adicional, L^2 y L^3 se seleccionan independientemente de heteroalquileo, por ejemplo, heteroalquileo (C_1 - C_{10}). En un ejemplo, el heteroalquileo incluye de 1 a 10 heteroátomos (por ejemplo, de 1 a 7, de 1 a 5 heteroátomos, o de 1 a 3 heteroátomos) seleccionados de entre O, S y N. En otro ejemplo, al menos uno de L^2 y L^3 incorpora un resto polimérico soluble en agua, tal como un resto de polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG) (por ejemplo, con un peso molecular de aproximadamente 1000 Da a aproximadamente 60.000 Da. Otros restos de PEG o PPG se describen en el presente documento.

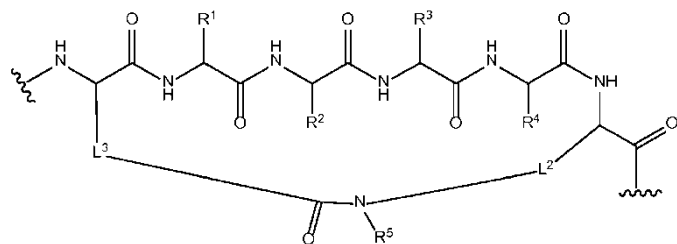
- En la Fórmula (II), Z es un resto de enlace. En un ejemplo, Z se selecciona de entre un grupo amino, un grupo amida, un grupo disulfuro, un grupo diselenuro, un grupo -S-Se-, alquileo, por ejemplo, alquileo (C_2 - C_4), alqueno, por ejemplo, alqueno (C_2 - C_4), alquino, por ejemplo, alquino (C_2 - C_4), cicloalquilo (por ejemplo, cicloalquilo (C_3 - C_8) que contiene de 1 a 4 enlaces dobles), heterocicloalquilo (por ejemplo, anillo heterocíclico de 3 a 8 miembros que comprende de 1 a 6 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N), arilo (por ejemplo, arilo (C_3 - C_7)) y heteroarilo (por ejemplo, heteroarilo de 3 a 8 miembros que comprende de 1 a 6 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N). En otro ejemplo, Z en la Fórmula (II) se selecciona de entre - NR^5 -, - $NR^5C(O)$ -, -S-S-, -S-Se-, -Se-Se-, - $CR^6=CR^7$ -, - $CR^{6a}R^{6b}$ -, - $CR^{7a}R^{7b}$ - y triazolenilo (por ejemplo, 1,4-triazolenilo o 1,5-triazolenilo), donde R^5 , R^6 , R^{6a} , R^7 y R^{7a} se seleccionan independientemente de entre H, alquilo (C_1 - C_4), heteroalquilo (C_1 - C_4) que comprende de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N. En un ejemplo, R^6 y R^7 se combinan para formar un anillo carbocíclico de 4 a 7 miembros, que comprende opcionalmente de 1 a 3 enlaces dobles, un anillo heterocíclico de 3 a 7 miembros que comprende de 1 a 5 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N, un anillo aromático (C_5 - C_7), o un anillo heteroaromático de 5 a 7 miembros que comprende de 1 a 5 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N. En otro ejemplo, R^6 y R^7 se combinan para formar un anillo carbocíclico de 4 a 6 miembros. En otro ejemplo, R^6 y R^7 se combinan para formar un anillo heterocíclico de 4 a 7 miembros que comprende de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N, donde el anillo heterocíclico comprende opcionalmente 1 o 2 enlaces dobles. El anillo carbocíclico o heterocíclico está opcionalmente sustituido con de 1 a 6 (por ejemplo, 1 a 3) sustituyentes seleccionados de entre alquilo (C_1 - C_4) lineal o ramificado, heteroalquilo (C_1 - C_4) lineal o ramificado que comprende de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N, halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br) y OR^{10} , donde R^{10} se selecciona de entre H, alquilo (C_1 - C_4) lineal o ramificado, heteroalquilo (C_1 - C_4) lineal o ramificado que comprende de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N. En otro ejemplo más, Z en la Fórmula (II) se selecciona de entre - NR^5 -, - $NR^5C(O)$ -, -S-S-, y un resto triazol, donde R^5 se define como anteriormente. En un ejemplo, el resto triazol es un 1,4-triazol. En otro ejemplo, el resto triazol es un 1,5-triazol.

En otro ejemplo, un compuesto de la presente divulgación contiene un péptido de Fórmula (IIa), Fórmula (IIb), Fórmula (IIc), Fórmula (IId), Fórmula (Ile), Fórmula (If) o Fórmula (Ilg):

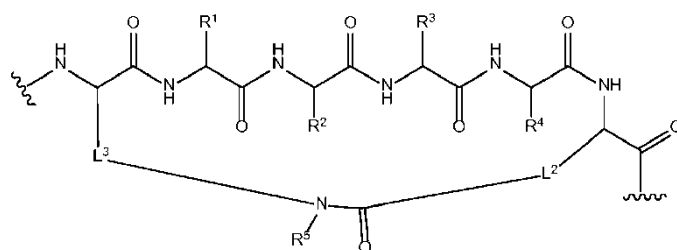
45



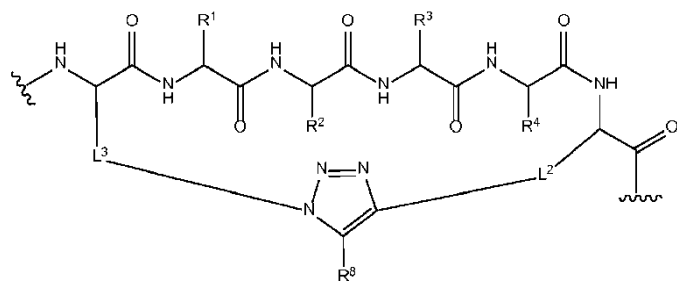
(IIa)



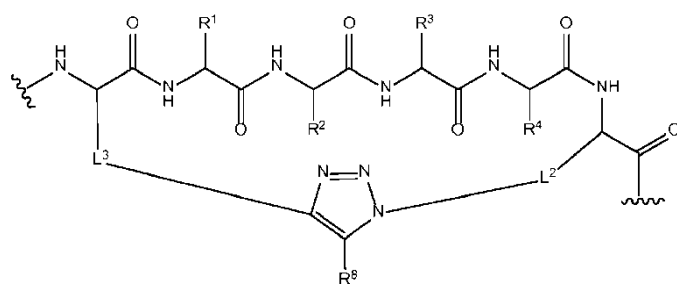
(IIb)



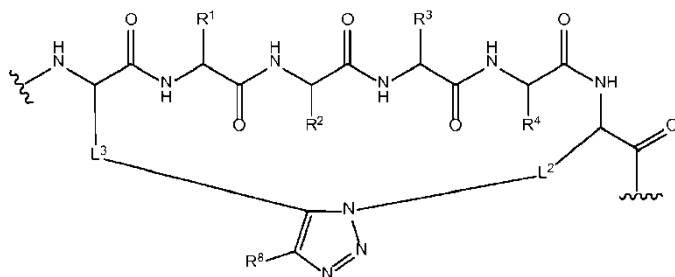
(IIc)



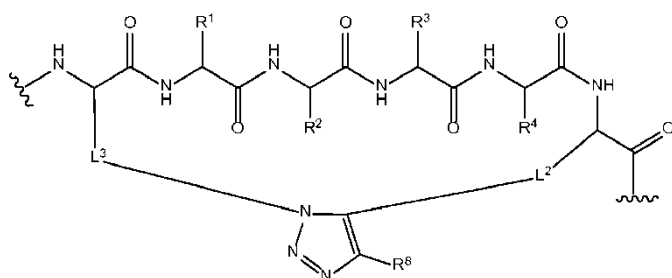
(IIId)



(IIe)



(II f)



(II g)

5 o una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa del mismo, donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^8 , L^2 y L^3 se definen como para la Fórmula (II) anterior. En un ejemplo en las fórmulas anteriores, R^5 y R^8 se seleccionan, cada uno, de entre H y alquilo, por ejemplo, alquilo (C_1 - C_4).

En otro ejemplo, en la Fórmula (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (II f) y (IIg), R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son miembros seleccionados
 10 independientemente de entre H, alquilo lineal o ramificado, por ejemplo, alquilo (C_1 - C_6), heteroalquilo lineal o ramificado, por ejemplo, heteroalquilo (C_1 - C_6) que comprende de 1 a 5 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N, y aralquilo lineal o ramificado, por ejemplo, aralquilo (C_1 - C_6). En un ejemplo, el grupo arilo en el resto aralquilo se selecciona de entre anillos aromáticos y heteroaromáticos divulgados en el presente documento. En un ejemplo, el resto arilo del grupo aralquilo se selecciona de entre fenilo, hidroxifenilo, indolilo y naftilo. En otro ejemplo, el grupo
 15 arilo en el resto aralquilo se selecciona de entre fenilo, 4-hidroxifenilo e indolilo. En otro ejemplo, R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente de entre cadenas laterales hidrófobas y no cargadas polares. En otro ejemplo, R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente de entre las cadenas laterales de G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q. En otro ejemplo, R^1 es 2-metil-propilo, R^2 es metilo, R^3 es hidroximetilo y R^4 es (4-hidroxi-fenil)metilo.

20 En otro ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, L^2 y L^3 en la Fórmula (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (II f) y (IIg) se seleccionan independientemente de entre alquilenos (C_1 - C_6) lineal o ramificado.

En diversos aspectos, un compuesto de la presente divulgación comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

25 KGASYE (SEQ ID NO: 560), KLGSYE (SEQ ID NO: 561), KLASGE (SEQ ID NO: 562), kGASYE (SEQ ID NO: 563), kLGSYE (SEQ ID NO: 564), kLASGE (SEQ ID NO: 565), KAASYE (SEQ ID NO: 566), KLASAE (SEQ ID NO: 567), kAASYE (SEQ ID NO: 568), kLASAE (SEQ ID NO: 569), KVASYE (SEQ ID NO: 570), KLVSYE (SEQ ID NO: 571), KLASVE (SEQ ID NO: 572), kVASYE (SEQ ID NO: 573), kLVSYE (SEQ ID NO: 574), KLASVE (SEQ ID NO: 575),
 30 KIASYE (SEQ ID NO: 576), KLISYE (SEQ ID NO: 577), KLASIE (SEQ ID NO: 578), kIASYE (SEQ ID NO: 579), kLISYE (SEQ ID NO: 580), kLASIE (SEQ ID NO: 581), KLASYE (SEQ ID NO: 582), KLLSYE (SEQ ID NO: 583), KLASLE (SEQ ID NO: 584), KLASYE (SEQ ID NO: 585), KLLSYE (SEQ ID NO: 586), KLASLE (SEQ ID NO: 587), KFASYE (SEQ ID NO: 588), KLFSYE (SEQ ID NO: 589), KLASFE (SEQ ID NO: 590), kFASYE (SEQ ID NO: 591), kLFSYE (SEQ ID NO: 592), KLASFE (SEQ ID NO: 593), KWASYE (SEQ ID NO: 594), KLVSYE (SEQ ID NO: 595), KLASWE (SEQ ID NO: 596), kWASYE (SEQ ID NO: 597), kLVSYE (SEQ ID NO: 598), KLASWE (SEQ ID NO: 599), KYASYE (SEQ ID NO: 600), KLYSYE (SEQ ID NO: 601), KYASYE (SEQ ID NO: 602), KLYSYE (SEQ ID NO: 603), KQASYE (SEQ ID NO: 604), KLQSYE (SEQ ID NO: 605), KLASQE (SEQ ID NO: 606), KQASYE (SEQ ID NO: 607), KLQSYE (SEQ ID NO: 608), KLASQE (SEQ ID NO: 609), EGASYK (SEQ ID NO: 610), ELGSYK (SEQ ID NO: 611), ELASGK (SEQ ID NO: 612), eGASYK (SEQ ID NO: 613), eLGSYK (SEQ ID NO: 614), eLASGK (SEQ ID NO: 615), EAASYK (SEQ ID NO: 616), ELASAK (SEQ ID NO: 617), eAASYK (SEQ ID NO: 618), eLASAK (SEQ ID NO: 619), EVASYK (SEQ ID NO: 620), ELVSYK (SEQ ID NO: 621), ELASVK (SEQ ID NO: 622), eVASYK (SEQ ID NO: 623), eLVSYK (SEQ ID NO: 624).

624), eLASVK (SEQ ID NO: 625), EIASYK (SEQ ID NO: 626), ELISYK (SEQ ID NO: 627), ELASIK (SEQ ID NO: 628), eIASYK (SEQ ID NO: 629), eLISYK (SEQ ID NO: 630), eLASIK (SEQ ID NO: 631), ELASYK (SEQ ID NO: 632), ELLSYK (SEQ ID NO: 633), ELASLK (SEQ ID NO: 634), eLASYK (SEQ ID NO: 635), eLLSYK (SEQ ID NO: 636), eLASLK (SEQ ID NO: 637), EFASYK (SEQ ID NO: 638), ELFSYK (SEQ ID NO: 639), ELASFK (SEQ ID NO: 640), eFASYK (SEQ ID NO: 641), eLFSYK (SEQ ID NO: 642), eLASFK (SEQ ID NO: 643), EWASYK (SEQ ID NO: 644), ELWSYK (SEQ ID NO: 645), ELASWK (SEQ ID NO: 646), eWASYK (SEQ ID NO: 647), eLWSYK (SEQ ID NO: 648), eLASWK (SEQ ID NO: 649), EYASYK (SEQ ID NO: 650), ELYSYK (SEQ ID NO: 651), eYASYK (SEQ ID NO: 652), eLYSYK (SEQ ID NO: 653), EQASYK (SEQ ID NO: 654), ELQSYK (SEQ ID NO: 655), ELASQK (SEQ ID NO: 656), eQASYK (SEQ ID NO: 657), eLQSYK (SEQ ID NO: 658) o eLASQK (SEQ ID NO: 659), o una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa del mismo.

En un ejemplo de las secuencias anteriores, cada K (L-lisina) se reemplaza opcionalmente con un L-aminoácido de reemplazo que tiene una cadena lateral que comprende un grupo amino (por ejemplo, - grupo NH₂), cada k (D-lisina) es opcionalmente reemplazado con un D-aminoácido de reemplazo que tiene una cadena lateral que comprende un grupo amino. Los aminoácidos de reemplazo ejemplares para lisina (K) en las secuencias anteriores incluyen ornitina (Orn), ácido 2,4-diaminobutírico (Dab) y ácido 2,3-diaminopropiónico (Dap, también denominado Dpr). En un ejemplo, un compuesto de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre Orn-LASYE (SEQ ID NO: 660), ELASY-Orn (SEQ ID NO: 661), Dab-LASYE (SEQ ID NO: 662), Dap-LASYE (SEQ ID NO: 663) y ELASY-Dap (SEQ ID NO: 664).

En otro ejemplo en las secuencias anteriores, cada E (ácido L-glutámico) se reemplaza opcional e independientemente con ácido L-aspartico (D) u otro L-aminoácido de reemplazo que tiene una cadena lateral que comprende un grupo ácido carboxílico (es decir, -COOH), y cada e (ácido D-glutámico) se reemplaza opcional e independientemente con ácido D-aspartico (d) u otro D-aminoácido de reemplazo que tiene una cadena lateral que comprende un grupo ácido carboxílico. En ciertos aspectos, un compuesto de la presente divulgación comprende una secuencia seleccionada de entre: DLASYK (SEQ ID NO: 665), DLASY-Orn (SEQ ID NO: 666), DLASY-Dpr (SEQ ID NO: 667) y Dab-LASYD (SEQ ID NO: 668).

En ciertos aspectos, un compuesto de la presente divulgación comprende una secuencia seleccionada de entre: DLASYK (SEQ ID NO: 665) y DLASY-Orn (SEQ ID NO: 666).

En los péptidos anteriores, las cadenas laterales de aminoácidos de K o k (o un aminoácido de reemplazo de K o k) y E o e (o un aminoácido de reemplazo de E o e) se unen covalentemente a través de un enlace peptídico formado entre el grupo amino y el grupo ácido carboxílico para formar un anillo de lactama.

En otros aspectos, un compuesto de la presente divulgación comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

CGASYC (SEQ ID NO: 760), CLGSYC (SEQ ID NO: 761), CLASGC (SEQ ID NO: 762), cGASYC (SEQ ID NO: 763), cLGSYC (SEQ ID NO: 764), cLASGC (SEQ ID NO: 765), CAASYC (SEQ ID NO: 766), CLASAC (SEQ ID NO: 767), cAASYC (SEQ ID NO: 768), cLASAC (SEQ ID NO: 769), CVASYC (SEQ ID NO: 770), CLVSYC (SEQ ID NO: 771), CLASVC (SEQ ID NO: 772), cVASYC (SEQ ID NO: 773), cLVSYC (SEQ ID NO: 774), cLASVC (SEQ ID NO: 775), CIASYC (SEQ ID NO: 776), CLISYC (SEQ ID NO: 777), CLASIC (SEQ ID NO: 778), cIASYC (SEQ ID NO: 779), cLISYC (SEQ ID NO: 780), cLASIC (SEQ ID NO: 781), CLASYC (SEQ ID NO: 782), CLLSYC (SEQ ID NO: 783), CLASLC (SEQ ID NO: 784), cLASYC (SEQ ID NO: 785), cLLSYC (SEQ ID NO: 786), cLASLC (SEQ ID NO: 787), FASYC (SEQ ID NO: 788), CLFSYC (SEQ ID NO: 789), CLASFC (SEQ ID NO: 790), cFASYC (SEQ ID NO: 791), cLFSYC (SEQ ID NO: 792), cLASFC (SEQ ID NO: 793), CWASYC (SEQ ID NO: 794), CLWSYC (SEQ ID NO: 795), CLASWC (SEQ ID NO: 796), cWASYC (SEQ ID NO: 797), cLWSYC (SEQ ID NO: 798), cLASWC (SEQ ID NO: 799), CYASYC (SEQ ID NO: 800), CLYSYC (SEQ ID NO: 801), cYASYC (SEQ ID NO: 802), cLYSYC (SEQ ID NO: 803), CQASYC (SEQ ID NO: 804), CLQSYC (SEQ ID NO: 805), CLASQC (SEQ ID NO: 806), cQASYC (SEQ ID NO: 807), cLQSYC (SEQ ID NO: 808) y cLASQC (SEQ ID NO: 809), CLASSC (SEQ ID NO: 810), CLAsYC (SEQ ID NO: 811), CLAsYc (SEQ ID NO: 812), o una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa del mismo.

En un ejemplo, un compuesto de la presente divulgación comprende la secuencia CLASYC.

En un ejemplo en las secuencias anteriores, cada C (L-cisteína) se reemplaza opcional e independientemente con L-homo-cisteína (HCy), L-seleno-cisteína (U) o L-homo-seleno cisteína, y cada c (D-cisteína) se reemplaza opcional e independientemente con D-homo-cisteína, D-seleno-cisteína (u) o D-homo-seleno cisteína.

En un ejemplo, la divulgación proporciona un compuesto que comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula (I):



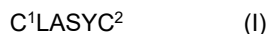
5

o (b) una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa de la secuencia de aminoácidos de (a), donde

S es L-serina, L es L-leucina, A es L-alanina, Y es L-tirosina, donde uno o dos de L, A e Y se reemplazan opcional e individualmente con un L-aminoácido de reemplazo. C¹ y C² se seleccionan independientemente de entre aminoácidos
10 que tienen una cadena lateral que comprende un grupo -S-H, donde las cadenas laterales de C¹ y C² están unidas reversiblemente para formar un enlace disulfuro. En un ejemplo, C² es L-cisteína y C¹ se selecciona de entre L-cisteína, D-cisteína, penicilamina, L-homocisteína y D-homocisteína. En otro ejemplo, C¹ y C² son ambos C. Un L-aminoácido adicional se inserta opcionalmente entre Y (o un aminoácido de reemplazo del mismo) y C².

15 En otro ejemplo, la divulgación proporciona un compuesto que comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula (I):



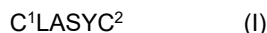
20

o (b) una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa de la secuencia de aminoácidos de (a), donde S es L-serina, L es L-leucina, A es L-alanina, Y es L-tirosina, donde uno de L, A e Y se reemplaza opcional e individualmente con un L-aminoácido de reemplazo. C¹ y C² se seleccionan independientemente de entre cisteína y homo-cisteína. En un ejemplo, C¹ se selecciona de entre L-cisteína, D-cisteína, L-homocisteína, y D-homocisteína, y C² se selecciona de
25 entre L-cisteína y L-homocisteína. En otro ejemplo, C¹ y C² son ambos C.

En otro ejemplo más, la divulgación proporciona un compuesto que comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula (I):

30



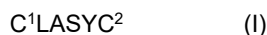
o (b) una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa de la secuencia de aminoácidos de (a), donde S es L-serina; L es L-leucina; A es L-alanina; e Y es L-tirosina. C¹ y C² se seleccionan independientemente de entre
35 aminoácidos que tienen una cadena lateral que comprende un grupo -S-H.

En un ejemplo, C² se selecciona de entre L-aminoácidos que tienen una cadena lateral que comprende un grupo -S-H. En otro ejemplo, C¹ y C² se seleccionan independientemente de entre cisteína y homocisteína. En otro ejemplo más, C¹ se selecciona de entre L-cisteína, D-cisteína, L-homocisteína, y D-homocisteína, y C² se selecciona de entre
40 L-cisteína y L-homocisteína. En otro ejemplo, C¹ y C² son ambos C.

En otro ejemplo más, la divulgación proporciona un compuesto que comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula (I):

45



o (b) una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa de la secuencia de aminoácidos de (a), donde S es L-serina; L es L-leucina; A es L-alanina; e Y es L-tirosina. C¹ y C² se seleccionan de entre uno de C¹ y C² se selecciona
50 de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral con un grupo amino primario o secundario (por ejemplo, grupo -NH₂), y el otro de C¹ y C² se selecciona de entre un aminoácido con una cadena lateral que tiene un grupo ácido carboxílico (por ejemplo, grupo -COOH), donde el grupo amino y el grupo ácido carboxílico forman un enlace amida. En un ejemplo, C¹ se selecciona de entre K, ornitina (Orn), ácido 2,4-diaminobutírico (Dab) y ácido 2,3-diaminopropiónico (Dap, también denominado Dpr), y C² se selecciona de entre ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D). En otro ejemplo, C² se selecciona de entre K, ornitina (Orn), ácido 2,4-diaminobutírico (Dab) y ácido 2,3-diaminopropiónico (Dap, también denominado Dpr), y C¹ se selecciona de entre ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D).
55

En otro ejemplo más, la divulgación proporciona un compuesto que comprende:

60

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula (III):



5 o (b) una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa de la secuencia de aminoácidos de (a).

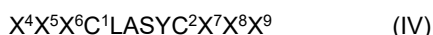
En la Fórmula (III), S, C¹ y C² se definen como para la Fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores. En un ejemplo, S en la Fórmula (III) es L-serina. En otro ejemplo en la Fórmula (III), C¹ y C² se seleccionan independientemente de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral que comprende un grupo -S-H. En otro ejemplo en la Fórmula (III), C¹ se selecciona de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral que comprende un grupo -S-H o un grupo -Se-H, y C² se selecciona de entre L-aminoácidos que tienen una cadena lateral que comprende un grupo -S-H o un grupo -Se-H. En otro ejemplo, C¹ y C² se seleccionan independientemente de entre cisteína y homo-cisteína. En otro ejemplo, C¹ y C² se seleccionan independientemente de entre cisteína y homo-cisteína.

15 En la Fórmula (III), X¹, X² y X³ se seleccionan independientemente de entre aminoácidos (por ejemplo, L-aminoácidos) que tienen una cadena lateral hidrófoba o una no cargada polar. En un ejemplo, en la Fórmula (III), X¹, X² y X³ se seleccionan independientemente de entre G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y sus derivados.

En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, X¹ se selecciona de entre A, L, M, V y Q. En otro ejemplo, X¹ es L. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, X² se selecciona de entre G, A, ácido alfa-aminobutírico (Abu), V, L, I y S. En otro ejemplo, X² se selecciona de entre G, A, ácido alfa-aminobutírico (Abu), V, L y I. En otro ejemplo, X² es A. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, X³ se selecciona de entre A, V, Y, Q, F. En otro ejemplo, X³ es Y.

25 En otro ejemplo, un compuesto de la presente divulgación incluye:

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula (IV):



30

o (b) una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa de la secuencia de aminoácidos de (a).

En la Fórmula (IV), L, A, S, Y, C¹ y C² se definen como para la Fórmula (I) o cualquiera de sus aspectos.

35 En la Fórmula (IV), X⁴, X⁵, X⁷, X⁸ y X⁹ están ausentes o presentes y, cuando están presentes, se seleccionan independientemente de entre aminoácidos. En un ejemplo, todos de X⁴, X⁵, X⁷, X⁸ y X⁹ en la Fórmula (IV) están presentes.

En un ejemplo en la Fórmula (IV), X⁴ está ausente o presente y, cuando está presente, es N, Q, un aminoácido que tiene una cadena lateral que comprende un resto básico, o un amino modificado (por ejemplo, alfa-N alquilado) del mismo. En un ejemplo, X⁴ en la Fórmula (IV) es un aminoácido que tiene una cadena lateral que comprende un resto básico. En un ejemplo, X⁴ en la Fórmula (IV) se selecciona de entre lisina (K), arginina (R), histidina (H), ácido 2,4-diaminobutírico (Dab), ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr), ornitina (Orn), ácido 2,7-diamino-heptanoico, ácido 2,8-diamino-octanoico y aminoácidos modificados (por ejemplo, alfa-N-alquilados) de los mismos. En otro ejemplo, X⁴ en la fórmula (IV) es lisina o N-metil lisina. En otro ejemplo, X⁴ en la Fórmula (IV) es L-lisina (K).

En un ejemplo en la Fórmula (IV), X⁵ está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido que tiene una cadena lateral hidrófoba o una no cargada polar, o un aminoácido alfa-N-alquilado del mismo. En un ejemplo, X⁵ se selecciona de entre L, V, M, P y aminoácidos modificados (por ejemplo, alfa-N-alquilados) de los mismos. En un ejemplo, X⁵ en la fórmula (IV) es leucina o leucina alfa-N-alquilada. En otro ejemplo, X⁵ es L-leucina (L). En otro ejemplo, X⁵ es distinto de E y R.

En la fórmula (IV), X⁶ es un aminoácido. En un ejemplo, X⁶ es un aminoácido modificado (por ejemplo, alfa-N-alquilado). En otro ejemplo, X⁶ en la Fórmula (IV) se selecciona de entre L-treonina, D-treonina, A, S, Q, R y K. En un ejemplo, X⁶ se selecciona de entre L-treonina y D-treonina, A, y K. En otro ejemplo, X⁶ se selecciona de entre L-treonina y D-treonina. En otro ejemplo, X⁶ es T. En otro ejemplo más, X⁶ es distinto de un aminoácido con una cadena lateral ácida (por ejemplo, distinto de E).

En otro ejemplo en la Fórmula (IV), X⁷, X⁸ y X⁹ están independientemente ausentes o presentes y, cuando están presentes, se seleccionan independientemente de entre aminoácidos (por ejemplo, L-aminoácidos). En otro ejemplo

en la Fórmula (IV), X^7 , X^8 y X^9 , cuando están presentes, se seleccionan independientemente de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba y aminoácidos que tienen una cadena lateral no cargada polar. En otro ejemplo en la Fórmula (IV), X^7 , X^8 y X^9 , cuando están presentes, se seleccionan independientemente de entre L-aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba y aminoácidos que tienen una cadena lateral no cargada polar. En otro ejemplo más en la Fórmula (IV), X^7 , X^8 y X^9 están independientemente ausentes o presentes y, cuando están presentes, se seleccionan independientemente de entre L, norleucina (Nle), I, V, M, F, W, Y, S, T, N y Q.

En un ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, X^7 se selecciona de entre G, L, Q y aminoácidos que tienen una cadena lateral que contiene un resto aromático. En otro ejemplo, X^7 se selecciona de entre G, L, Q, W, F, Y y 1-aril-alanina (por ejemplo, 1-naftil-alanina). En otro ejemplo, X^7 es F. En otro ejemplo, X^7 es L-triptófano, D-triptófano, F, L o 1-naftil-alanina (por ejemplo, L-1-naftil-alanina). En otro ejemplo, X^7 no es un aminoácido NMe. En otro ejemplo, X^7 es 1-naftil-alanina. En otro ejemplo, X^7 es L-triptófano o D-triptófano. En otro ejemplo, X^7 es W. En otro ejemplo, X^7 es Y. En un ejemplo adicional, X^7 es una tirosina modificada como se define en el presente documento.

En un ejemplo, X^8 en la Fórmula (IV) se selecciona de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba y aminoácidos que tienen una cadena lateral no cargada polar. En un ejemplo, X^8 se selecciona de entre L, I, nor-leucina (Nle), V, Y, Q y M. En otro ejemplo, X^8 se selecciona de entre L-aminoácidos hidrófobos. En un ejemplo, X^8 se selecciona de entre L, Y, I y L-norleucina. En otro ejemplo, X^8 es L.

En un ejemplo, X^9 en la Fórmula (IV) se selecciona de entre F, V y L. En otro ejemplo, X^9 en la Fórmula (IV) es V. En otro ejemplo, X^9 en la Fórmula (IV) se selecciona de entre F y L. En otro ejemplo, X^9 en la Fórmula (IV) es F. I

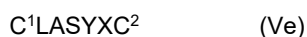
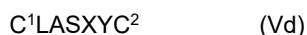
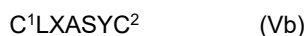
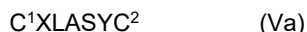
En un ejemplo, un compuesto de la presente divulgación comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula (V):



o (b) una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa de la secuencia de aminoácidos de (a). En la Fórmula (V), L es L-leucina; A es L-alanina; S es L-serina; Y es L-tirosina, donde uno o dos de L, A, S e Y se reemplazan opcionalmente con un aminoácido de reemplazo seleccionado independientemente. En la Fórmula (V), cada X se selecciona independientemente de entre aminoácidos. En un ejemplo, cada X se selecciona independientemente de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba o una no cargada polar. En la fórmula (V), m, n, o, p y q son números enteros seleccionados independientemente de entre 1 y 0. En un ejemplo, m, n, o, p y q son todos cero. En otro ejemplo, uno de m, n, o, p y q es 1 y el resto de m, n, o, p y q son cero. En la Fórmula (V), C^1 y C^2 se seleccionan independientemente de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral que comprende un grupo -S-H. En un ejemplo en la Fórmula (V), tanto C^1 como C^2 son C.

En otro ejemplo de acuerdo con el aspecto anterior, un compuesto de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula (Va), Fórmula (Vb), Fórmula (Vc), Fórmula (Vd) o Fórmula (Ve):

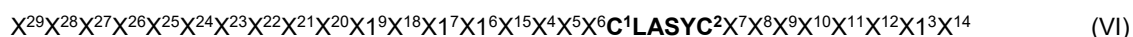


donde X representa un aminoácido. En un ejemplo en las fórmulas anteriores, X se selecciona de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba o una no cargada polar.

En un ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, la secuencia de aminoácidos es (b) la variante retro-inversa de la secuencia de aminoácidos de (a).

En un ejemplo, un compuesto de la presente divulgación comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula (VI):



o (b) una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa de la secuencia de aminoácidos de (a). En la Fórmula (VI), L, A, S e Y se definen como para la Fórmula (I). En un ejemplo, en la Fórmula (VI), L es L-leucina; A es L-alanina; S es L-serina; Y se selecciona de entre A, F, L-tirosina, D-tirosina, L-tirosina(OMe) y D-tirosina(OMe). En un ejemplo, en la Fórmula (VI), L es L-leucina; A es L-alanina; S es L-serina e Y es L-tirosina.

5 X^{29} (posición 1) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido. En un ejemplo X^{29} es S o P.

10 X^{28} (posición 2) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido. En un ejemplo X^{28} se selecciona de entre un aminoácido básico (por ejemplo, R) y S.

15 X^{27} (una posición 3) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido. En un ejemplo X^{27} es S o I.

X^{26} (en la posición 4) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido.

En un ejemplo X^{26} se selecciona de entre aminoácidos básicos (por ejemplo, L- o D-arginina).

20 X^{25} (posición 5) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido. En un ejemplo X^{25} es T o S.

X^{24} (posición 6) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido. En un ejemplo X^{24} es V o S.

25 X^{23} (posición 7) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido. En un ejemplo X^{23} es G o S.

X^{22} (posición 8) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido. En un ejemplo X^{22} es S o P.

X^{21} (posición 9) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido. En un ejemplo X^{21} es G o S.

30 X^{20} (posición 10) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido. En un ejemplo X^{20} es S.

X^{19} (posición 11) es un aminoácido. En un ejemplo X^{19} es un aminoácido básico (por ejemplo, L-arginina, D-arginina o K).

35 X^{18} (posición 12) es un aminoácido. En un ejemplo X^{18} es L-arginina, D-arginina o S.

X^{17} (posición 13) es un aminoácido. En un ejemplo X^{17} es un aminoácido hidrófobo. En otro ejemplo, X^{17} es A o NMe-alanina.

40 X^{16} (posición 14) es un aminoácido. En un ejemplo X^{16} es S, P o A. En otro ejemplo X^{16} no es K o un D-aminoácido (por ejemplo, no es D-prolina).

X^{15} (posición 15) es un aminoácido. En un ejemplo X^{15} es G, sarcosina o A. En otro ejemplo X^{15} no es K. En otro ejemplo, X^{15} se selecciona de entre G y sarcosina.

45 X^4 (posición 16) es L-lisina o D-lisina, L-ornitina, D-ornitina, ácido L-2,4-diaminobutírico, ácido D-2,4-diaminobutírico, ácido L-2,3-diaminopropiónico o ácido D-2,3-diaminopropiónico. En un ejemplo, X^4 se selecciona de entre L-lisina y D-lisina.

50 X^5 (posición 17) se selecciona de entre aminoácidos hidrófobos. En un ejemplo, X^5 se selecciona de entre A, L-leucina, D-leucina y S. En un ejemplo, X^5 es L.

X^6 (posición 18) se selecciona de entre L-treonina, D-treonina, A, Q y K. En un ejemplo, X^6 se selecciona de entre T, A, Q y K. En otro ejemplo, X^6 se selecciona de entre L- treonina y D-treonina. En otro ejemplo, X^6 es T.

55 C^1 (posición 19) se selecciona de entre L-cisteína, D-cisteína, penicilamina, L-homocisteína y D-homocisteína. En un ejemplo, C^1 es C.

60 C^2 (posición 24) se selecciona de entre L-cisteína, D-cisteína, penicilamina, L-homocisteína y D-homocisteína. En un ejemplo, C^2 es C.

En un ejemplo, en la Fórmula (VI), tanto C¹ como C² son C.

X⁷ (posición 25) se selecciona de entre L-triptófano, D-triptófano, F, L o 1-naftil-alanina (por ejemplo, L-1-naftil-alanina).

5 En otro ejemplo, X⁷ no es un aminoácido NMe. En otro ejemplo, X⁷ es W.

X⁸ (posición 26) se selecciona de entre L-aminoácidos hidrófobos. En un ejemplo, X⁸ se selecciona de entre L, Y, I y L-norleucina. En otro ejemplo, X⁸ es L.

10 X⁹ (posición 27) se selecciona de entre F y L. En un ejemplo, X⁹ es F.

X¹⁰ (posición 28) está ausente o presente y, cuando está presente, se selecciona de entre W, A, S, F y L. En un ejemplo, X¹⁰ es W.

15 X¹¹ (posición 29) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido. En un ejemplo, X¹¹ se selecciona de entre L-treonina, D-treonina y S.

X¹² (posición 30) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido. En un ejemplo, X¹² se selecciona de entre G, A, sarcosina, L, F y S. En un ejemplo, X¹² se selecciona de entre G, A y sarcosina. En un ejemplo, X¹² se

20 selecciona de entre G y sarcosina. En otro ejemplo, X¹² es G.

X¹³ (posición 31) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido. En un ejemplo, X¹³ se selecciona de entre I, L, F, L-norleucina, L-1-naftil-alanina, 3-ciclohexil-L-alanina y L-terc-leucina. En otro ejemplo, X¹³ se selecciona de entre I, L, F, L-norleucina y L-1-naftil-alanina. En un ejemplo, X¹³ es I.

25

X¹⁴ (posición 32) está ausente o presente y, cuando está presente, es un aminoácido. En un ejemplo, X¹⁴ es A.

En un ejemplo, todos de X¹⁰ a X¹⁴ están presentes. En otro ejemplo, todos de X²⁰ a X²⁹ están presentes.

30 En un ejemplo, la secuencia de aminoácidos de un compuesto de la presente divulgación incluye al menos una de las siguientes secuencias:

KLTCLASYCWLF
k-McLcu-TCLASYCWLF
RRAPGKLQCLASYCWLFWTGIA
RRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA
rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA
rRAPGKSTCLASYCWLFWTGIA
PRIrTVGPGSRASGKLTCLASYCWLFWTGIA
PRIrTVGPGSrSASGKLTCLASYCWLFWTGIA
PRIrTVGPGSRASGKSTCLASYCWLFWTGIA
SRIRTVGPGSRASGKSTCLASYCWLFWTGIA
PRIrTVSPGSRASGKSTCLASYCWLFWTGIA
SRIRTVSPGSRASGKSTCLASYCWLFWTGIA
PRSRrTVGPGSRASGKSTCLASYCWLFWTGIA
SRSRrTVSPGSRASGKSTCLASYCWLFWTGIA
PRIrTVGPGSrSASGKSTCLASYCWLFWTGIA
SKQGRPISPDRRAAGKLTCLASYCWLFWTGIA
SKQGRPISPDrRAAGKLTCLASYCWLFWTGIA
RRAPGKLTCLASYCWLFSGISLSRAPESAAP
RRFVGGSLSQRRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA
PQTRDPSSRDRRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA.

- 5 Se pueden añadir residuos de aminoácidos adicionales al extremo N o C de las secuencias anteriores para formar un compuesto de la presente divulgación.

En diversas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación incluye una secuencia de aminoácidos que incorpora un número particular de residuos de aminoácidos. El número de aminoácidos está definido por un límite inferior y uno superior. La longitud de la secuencia de aminoácidos se puede definir mediante cualquier combinación de los límites inferior y superior que se indican a continuación:

Límite inferior

- 15 En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la secuencia de aminoácidos de un compuesto comprende al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 aminoácidos. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la secuencia de aminoácidos de un compuesto comprende al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la secuencia de aminoácidos de un compuesto comprende al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, al menos 30 aminoácidos, al menos 31 aminoácidos o al menos 32 aminoácidos.

Límite superior

- 25 En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la secuencia de aminoácidos de un compuesto comprende no más de 500, no más de 400, no más de 300, no más de 200 o no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la secuencia de aminoácidos de un compuesto comprende no más de 90, no más de 80, no más de 70, no más de 60, no más de 50 o no más de 40

aminoácidos.

Intervalos ejemplares

- [illegible]

comprende no más de 500, no más de 400, no más de 300, no más de 200 o no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, un compuesto comprende no más de 90, no más de 80, no más de 70, no más de 60 o no más de 50 aminoácidos. En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, un compuesto comprende no más de 500, no más de 400, no más de 300, no más de 200 o no más de 100 aminoácidos consecutivos.

En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 9 y no más de 500 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 10 y no más de 500 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 11 y no más de 500 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 12 y no más de 500 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 13 y no más de 500 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 14 y no más de 500 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 15 y no más de 500 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 16 y no más de 500 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 17 y no más de 500 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 18 y no más de 500 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 19 y no más de 500 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 20 y no más de 500 aminoácidos.

En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 9 y no más de 300 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 10 y no más de 300 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 11 y no más de 300 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 12 y no más de 300 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 13 y no más de 300 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 14 y no más de 300 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 15 y no más de 300 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 16 y no más de 300 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 17 y no más de 300 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 18 y no más de 300 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 19 y no más de 300 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 20 y no más de 300 aminoácidos.

En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 9 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 10 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 11 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 12 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 13 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 14 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 15 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 16 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 17 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 18 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 19 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 20 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 21 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 22 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 23 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 24 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 25 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 26 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 27 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 28 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 29 y no más de 100 aminoácidos. En otro ejemplo más, un compuesto comprende al menos 30 y no más de 100 aminoácidos.

En un ejemplo, un compuesto de la presente divulgación es un péptido o derivado peptídico que contiene al menos 21 aminoácidos, donde el aminoácido 21 (contado desde el extremo N hasta el extremo C) es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba (por ejemplo, G, A, L, I). En otro ejemplo, un compuesto es un péptido o derivado peptídico que contiene al menos 21 aminoácidos, donde el péptido tiene un aminoácido N-terminal cargado positivamente (es decir, un aminoácido básico, tal como K o R). En otro ejemplo, un compuesto de la presente divulgación es un péptido o derivado peptídico que tiene un extremo C neutro. Por ejemplo, los 6 aminoácidos C-terminales finales, 5 finales, 4 finales, 3 finales, 2 o el final se seleccionan de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba o una no cargada polar. En un ejemplo, el aminoácido C-terminal es A. En otro ejemplo, los 3 aminoácidos C-terminales son -GIA. En otro ejemplo, los 4 aminoácidos C-terminales son -TGIA. En otro ejemplo, los 5 aminoácidos C-terminales son -WTGIA. En otro ejemplo, los 6 aminoácidos C-terminales son -FWTGIA. En otro ejemplo, al menos uno de los 3 aminoácidos N-terminales es un D-aminoácido. En un ejemplo, un compuesto de la presente divulgación es un péptido o derivado peptídico, donde el aminoácido N-terminal es D-arginina (r). En otro ejemplo, los dos aminoácidos N-terminales del péptido son Rr- o rR-.

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la secuencia de aminoácidos de un compuesto está acilada, por ejemplo, acetilada en el extremo N (es decir, -NHCOCH_3 o -NHAc). En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la secuencia de aminoácidos de un compuesto está amidada (es decir, -CONHCH_3 o -CONH_2) en el extremo C. En otro ejemplo más de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la secuencia de aminoácidos de un compuesto está acilada, por ejemplo, acetilada en el extremo N y amidada (es decir, -CONHCH_3 o -CONH_2) en el extremo C. En un ejemplo adicional de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la secuencia de aminoácidos de un compuesto tiene un extremo amino libre (-NH_2 o una forma de sal del mismo) y está amidada (es decir, -CONH_2) en el extremo C.

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, un compuesto de la presente divulgación es un péptido o un derivado peptídico. En otro ejemplo, un compuesto es un derivado peptídico, en el que el aminoácido N-terminal está acilado, por ejemplo, acetilado (es decir, -NHCOCH_3). En otro ejemplo, un compuesto es un derivado peptídico, en el que el aminoácido C-terminal está amidado (es decir, -CONHCH_3 o -CONH_2). En un ejemplo, un compuesto es un derivado peptídico, que está acilado, por ejemplo, acetilado en el extremo N y amidado (es decir, -CONHCH_3 o -CONH_2) en el extremo C. En un ejemplo, un compuesto es un derivado peptídico, que tiene un extremo N libre (-NH_2 o una forma de sal del mismo) y está amidado (es decir, -CONH_2) en el extremo C.

En un ejemplo, un compuesto de la presente divulgación contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre o es un péptido seleccionado de entre los enumerados en la tabla 1, a continuación, o una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa del mismo. En un ejemplo en esos péptidos, el extremo N está acetilado. En otro ejemplo en esos péptidos, el extremo N es libre (-NH_2). En otro ejemplo en esos péptidos, el extremo C está amidado. En otro ejemplo en esos péptidos, el extremo N está libre y el extremo C está amidado.

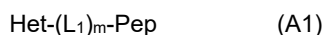
25 **Conjugados**

Compuestos unidos a un resto heterólogo

En ciertas realizaciones, el compuesto de la presente divulgación está unido a un resto heterólogo. Por ejemplo, el péptido procoagulante de la presente divulgación está unido covalentemente a un resto heterólogo, opcionalmente a través de un enlazador (L_1) formando de este modo un conjugado. El enlazador (L_1) es diferente del resto de enlace Z definido anteriormente en el presente documento.

El resto heterólogo es útil para aumentar la biodisponibilidad o la estabilidad/semivida in vivo del compuesto. Los restos heterólogos ejemplares incluyen, por ejemplo, restos de prolongación de la semivida conocidos, por ejemplo, polímeros solubles en agua, tales como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), Fc, PAS, HES, XTEN y albúmina. En un ejemplo, el resto heterólogo es un polímero, por ejemplo, un polímero soluble en agua, tal como polietilenglicol (PEG). En otro ejemplo, el resto heterólogo es una proteína que prolonga la semivida, tal como albúmina. En otro ejemplo, el resto heterólogo es un resto Fc. En otro ejemplo, el resto heterólogo es un resto XTEN. En otro ejemplo, el resto heterólogo es un resto HES. En otro ejemplo, el resto heterólogo es un resto PAS. Otros restos heterólogos útiles se conocen en la técnica y otros se describen adicionalmente en el presente documento.

En una realización, el conjugado formado entre el compuesto y el resto heterólogo tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula (A1) o la Fórmula (A2):



donde

Het es un resto heterólogo como se describe en el presente documento;

m es un número entero seleccionado de entre 0 y 1;

L_1 está ausente ($m=0$) o presente ($m=1$) y, cuando está presente, es un enlazador como se describe en el presente documento; y

Pep es un compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico procoagulante) de la presente divulgación.

Conjugados polipeptídicos

En otras realizaciones, el compuesto de la presente divulgación está unido covalentemente a un polipéptido. En un

ejemplo, el polipéptido se selecciona de entre un factor de coagulación sanguínea y restos de direccionamiento a plaquetas. En otras realizaciones, el factor de coagulación sanguínea se selecciona de entre FVIIa, FVIII y FIX. En un ejemplo, el compuesto está unido a un residuo de ácido amino interno del polipéptido (por ejemplo, FVIIa o FIX).

- 5 La presente divulgación proporciona además conjugados polipeptídicos que comprenden un polipéptido seleccionado de entre FVIII, FIX, FVIIa y restos de direccionamiento a plaquetas, y un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante), donde el compuesto está unido, por ejemplo, unido covalentemente, al polipéptido, opcionalmente a través de un enlazador.
- 10 En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados que comprenden un polipéptido seleccionado de entre FVIII, FIX, FVIIa y restos de direccionamiento a plaquetas, un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante), y al menos un enlazador, que une el compuesto al polipéptido.
- 15 En otro ejemplo, la presente divulgación proporciona conjugados polipeptídicos que comprenden un polipéptido, un resto heterólogo, un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante), y al menos un enlazador, que une covalentemente el compuesto al polipéptido y el resto heterólogo. En un ejemplo de acuerdo con esta realización, el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) se interpone entre el polipéptido y el resto heterólogo. En otro ejemplo de acuerdo con esta realización, el resto heterólogo está
- 20 unido al polipéptido, y el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido al polipéptido o al resto heterólogo.

En un ejemplo, el polipéptido es activable, por ejemplo, por una enzima que, por ejemplo, escinde varios aminoácidos de la secuencia polipeptídica. En un ejemplo, el polipéptido es activable por una enzima de la cascada de coagulación sanguínea, por ejemplo, la trombina. En un ejemplo, el polipéptido es un polipéptido FVII o FVIIa activable por trombina. Ejemplos de polipéptidos FVII activables por trombina se divulgan en el documento WO2012/006635.

Conjugados con FVIII

- 30 En diversas realizaciones, el compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a FVIII o a una construcción de FVIII-resto heterólogo.

- En un ejemplo, el conjugado de la presente divulgación incluye una construcción de FVIII-resto heterólogo (por ejemplo, FVIII-Fc, FVIII-albúmina, FVIII-PEG) y el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte de FVIII de la construcción. En otro ejemplo, el conjugado de la presente divulgación incluye una construcción de FVIII-resto heterólogo (por ejemplo, FVIII-Fc, FVIII-albúmina, FVIII-PEG) y el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte del resto heterólogo de la construcción.
- 35

- En un ejemplo de acuerdo con las realizaciones anteriores, el resto heterólogo es Fc. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un conjugado que comprende una construcción de FVIII-Fc (FVIII-Fc) y un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante), y un enlazador, que une covalentemente el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) al FVIII-Fc. En un ejemplo de acuerdo con esta realización, el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte de FVIII del FVIII-Fc (por ejemplo, a través de un enlazador). En otro ejemplo, el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte Fc del FVIII-Fc (por ejemplo, a través de un enlazador).
- 40
- 45

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el FVIII es un FVIII con el dominio B eliminado.

- 50 En un ejemplo, el compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico procoagulante) está unido covalentemente al extremo N de la cadena pesada (HC) de FVIII. En otro ejemplo, el compuesto está unido covalentemente al extremo C de la HC de FVIII. En otro ejemplo más, el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico procoagulante) está unido covalentemente al extremo N de la cadena ligera (LC) de FVIII. En otro ejemplo más, el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico procoagulante) está unido covalentemente al extremo
- 55 C de la LC de FVIII.

- En un ejemplo adicional de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico procoagulante) está unido covalentemente a un resto de aminoácido interno de la molécula de FVIII (conjugación interna), por ejemplo, a través de un residuo de cisteína. En un ejemplo, el residuo de
- 60 cisteína se modifica genéticamente en la secuencia de aminoácidos de FVIII. En un ejemplo, el sitio de conjugación

interna se selecciona de entre los descritos en Mei, B. et. al. Rational design of a fully active, long-acting PEGylated FVIII for hemophilia A treatment. Blood (2010) 116:270-279; y la solicitud de patente de EE.UU. US2006/0115876 de Pan C. et al. (Modificación dirigida al sitio de FVIII).

5 Conjugados de FVIII ejemplares se ilustran en las figuras 20 y 21.

La figura 20 ilustra diversos conjugados de la presente divulgación, en los que un compuesto (indicado como un péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a una construcción de FVIII-resto heterólogo, donde el resto heterólogo se representa en esta figura como un Fc, opcionalmente a través de enlazador, donde el péptido puede estar unido a la parte FVIII de la fusión con FVIII (por ejemplo, construcciones E3, E5-E7), a la parte de resto heterólogo de la fusión con FVIII (construcciones E1 y E2), o puede interponerse entre el FVIII y el resto heterólogo de la fusión con FVIII (E4). En las construcciones E1 y E2, en las que el resto heterólogo se muestra como un Fc, el FVIII está unido a una cadena del Fc y el péptido o derivado peptídico está unido a la otra cadena de Fc (libre). En otras construcciones similares a E2, el compuesto se puede colocar en una o en ambas cadenas de Fc. En las construcciones E3-E6, el compuesto está unido al aminoácido N o C-terminal de la cadena pesada (HC) o la cadena ligera (LC) del FVIII, respectivamente. En la construcción E7, el péptido o derivado peptídico está unido covalentemente a un residuo de aminoácido interno de la molécula de FVIII (por ejemplo, cisteína). Se entiende que, en otros conjugados, el resto heterólogo (representado en esta figura como Fc) puede ser, por ejemplo, PEG, PPG, albúmina, XTEN, etc. En un ejemplo, las construcciones E1-E6 de la figura 20 se pueden preparar de forma recombinante. En otro ejemplo, las construcciones E1 y E7 de la figura 20 se pueden preparar de forma semi-recombinante, por ejemplo, como se ilustra en las figuras 23 y 24.

La figura 21 ilustra diversos conjugados de la presente divulgación, en los que un compuesto (indicado como un péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a una proteína FVIII. En las construcciones F1-F4, el péptido procoagulante está unido al aminoácido N- o C-terminal de la cadena pesada (HC) o la cadena ligera (LC) del FVIII, respectivamente. En la construcción F5, el péptido o derivado peptídico está unido covalentemente a un residuo de aminoácido interno del FVIII. En un ejemplo, las construcciones F1-F4 de la figura 21 se pueden preparar de forma recombinante. En otro ejemplo, la construcción F5 se puede preparar de forma semi-recombinante como se ilustra en las figuras 23 y 24.

30

Conjugados con FVIIa

En diversas realizaciones, el compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a FVIIa o a una construcción de FVIIa-resto heterólogo.

35

En un ejemplo, el conjugado de la presente divulgación incluye una construcción de FVIIa-resto heterólogo (por ejemplo, FVIIa-Fc, FVIIa-albúmina, FVIIa-PEG, FVIIa-XTEN) y el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte de FVIIa de la construcción. En otro ejemplo, el conjugado de la presente divulgación incluye una construcción de FVIIa-resto heterólogo (por ejemplo, FVIIa-Fc, FVIIa-albúmina, FVIIa-PEG, FVIIa-XTEN) y el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte del resto heterólogo de la construcción.

40

En un ejemplo de acuerdo con las realizaciones anteriores, el resto heterólogo es Fc. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un conjugado que comprende una construcción de FVIIa-Fc (FVIIa-Fc) y un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante), y un enlazador, que une covalentemente el compuesto al FVIIa-Fc. En un ejemplo de acuerdo con esta realización, el compuesto está unido covalentemente a la parte de FVIIa del FVIIa-Fc (por ejemplo, a través de un enlazador). En otro ejemplo de acuerdo con esta realización, el compuesto está unido covalentemente a la parte de Fc del FVIIa-Fc (por ejemplo, a través de un enlazador). Estos enlazadores opcionales pueden ser enlazadores escindibles como se describe en otra parte en el presente documento.

50

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto está unido covalentemente al extremo C de la HC de FVIIa (por ejemplo, el compuesto está interpuesto entre el resto heterólogo y la HC de FVIIa). En otro ejemplo más de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto está unido covalentemente al extremo C de la LC de FVIIa. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto está unido covalentemente al extremo N de la cadena pesada (HC) de FVIIa con un enlazador escindible para permitir la conversión en una proteasa activa. En un ejemplo adicional de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico procoagulante) está unido covalentemente a un resto de aminoácido interno de la molécula de FVIIa (conjugación interna), por ejemplo, a través de un residuo de cisteína. En un ejemplo, el residuo de cisteína se modifica genéticamente en la secuencia de

55

60

aminoácidos de FVIIa, por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos descritos en Mei, B. et. al. Rational design of a fully active, long-acting PEGylated FVIIa for hemophilia A treatment. Blood (2010) 116:270-279; y la solicitud de patente de EE.UU. US2006/0115876 de Pan C. et al. (Modificación dirigida al sitio de FVIIa).

5 Conjugados de FVIIa ejemplares se ilustran en las figuras 18 y 19.

La figura 18 ilustra diversos conjugados de la presente divulgación, en los que un compuesto (mostrado como un péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a una construcción de FVIIa-resto heterólogo, donde el resto heterólogo se representa en esta figura como un Fc, opcionalmente a través de enlazador, donde el péptido puede estar unido a la parte FVIIa de la fusión con FVIIa (por ejemplo, construcciones C4-C7), a la parte de resto heterólogo de la fusión con FVIIa (construcciones C1 y C2), o puede interponerse entre el FVIIa y el resto heterólogo de la fusión con FVIIa (C3). En las construcciones C1 y C2, en las que el resto heterólogo se muestra como un Fc, el FVIIa está unido a una cadena del Fc y el péptido o derivado peptídico está unido a la otra cadena de Fc (libre). En otras construcciones similares a E2, el compuesto se puede colocar en una o en ambas cadenas de Fc. En las construcciones C3 y C4, el péptido o derivado peptídico está unido al aminoácido C-terminal de la cadena pesada (HC) o cadena ligera (LC) del FVIIa, respectivamente; para C3, el péptido o derivado peptídico también está unido al extremo N del resto heterólogo. En la construcción C5, el péptido o derivado peptídico está unido al extremo N de la HC; en este caso en particular, el enlazador podría ser escindible por proteasas activadas durante la cascada de coagulación (como se describe en la solicitud de patente internacional No. PCT/US2011/043599 presentada el 11 de julio de 2011), con el fin de generar el extremo N libre de la HC requerido para la actividad proteasa. En las construcciones C6 y C7, el péptido o derivado peptídico está unido covalentemente a un residuo de aminoácido interno (por ejemplo, cisteína) de la HC o LC de la molécula FVIIa, respectivamente. Se entiende que, en otros conjugados, el resto heterólogo (representado en esta figura como Fc) puede ser, por ejemplo, PEG, PPG, albúmina, XTEN, etc. En un ejemplo, las construcciones C1-C5 se pueden preparar de forma recombinante. En otro ejemplo, las construcciones C1, C6 y C7 se pueden preparar de forma semi-recombinante, por ejemplo, como se ilustra en las figuras 23 y 24.

La figura 19 ilustra diversos conjugados de la presente divulgación, en los que un péptido o derivado peptídico (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante, tales como los divulgados en el presente documento) está unido covalentemente a una proteína FVIIa. En las construcciones D1-D2, el péptido o derivado peptídico está unido al aminoácido C-terminal de la cadena pesada (HC) o cadena ligera (LC) del FVIIa, respectivamente. En la construcción D3, el péptido o derivado peptídico está unido al extremo N de la HC; en este caso en particular, el enlazador podría ser escindible por proteasas activadas durante la cascada de coagulación (como se describe en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2011/043599 presentada el 11 de julio de 2011), con el fin de generar el extremo N libre de la HC requerido para la actividad proteasa. En las construcciones D4 y D5, el péptido o derivado peptídico está unido covalentemente a un residuo de aminoácido interno de la HC o LC de FVIIa, respectivamente. En un ejemplo, las construcciones D1-D3 se pueden preparar de forma recombinante. En otro ejemplo, las construcciones D4 y D5 se pueden preparar de forma semi-recombinante como se ilustra en las figuras 23 y 24.

40 **Conjugados con FIX**

En diversas realizaciones, el compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a FIX o a una construcción de FIXa-resto heterólogo.

45 En un ejemplo, el conjugado de la presente divulgación incluye una construcción de FIX-resto heterólogo (por ejemplo, FIX-Fc, FIX-albúmina, FIX-PEG) y el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte de FIX de la construcción. En otro ejemplo, el conjugado de la presente divulgación incluye una construcción de FIX-resto heterólogo (por ejemplo, FIX-Fc, FIX-albúmina, FIX-PEG) y el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte del resto heterólogo de la construcción, opcionalmente a través de un enlazador.

En un ejemplo, el enlazador del conjugado con FIX es suficientemente largo para que el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico procoagulante) se una al FIX (por ejemplo, una vez que se convierte en FIXa) en una secuencia de aminoácidos aproximadamente Tyr177 (Numeración FIXa) como se describe en el presente documento. Dicha unión del compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) al FIX puede aumentar la actividad catalítica del FIXa o su forma inactivada FIX. En otro ejemplo, el enlazador es suficientemente largo para que el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) sea capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos: MFCAG (SEQ ID NO: 1) de FIX o FIXa. En otro ejemplo, el enlazador es lo suficientemente largo para ser capaz de interactuar con la secuencia de aminoácidos: YNNMFCAGFHE (SEQ ID NO: 2) de FIX o FIXa. En otro ejemplo, el enlazador es lo suficientemente largo para ser capaz de interactuar con la secuencia de aminoácidos: RSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQG (SEQ

ID NO: 3) de FIX o FIXa.

En un ejemplo de acuerdo con las realizaciones anteriores, el resto heterólogo es Fc. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un conjugado que comprende una construcción de FIX-Fc (FIX-Fc) y un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante), y un enlazador, que une covalentemente el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) al FIX-Fc. En un ejemplo de acuerdo con esta realización, el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte de FIX del FIX-Fc (por ejemplo, a través de un enlazador). En otro ejemplo de acuerdo con esta realización, el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte de Fc del FIX-Fc (por ejemplo, a través de un enlazador).

En otro ejemplo, el péptido o derivado peptídico se interpone entre el FIX y el Fc. En otro ejemplo, el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) se inserta entre la cadena pesada (HC) de FIX y la cadena ligera (LC) de FIX, reemplazando todo, parte o nada del péptido de activación FIX, mientras se mantiene un sitio de escisión de proteasa en el extremo N de la HC para permitir la generación de una proteasa activa.

En un ejemplo, el compuesto está unido covalentemente al extremo C de la cadena pesada (HC) de FIX. En otro ejemplo, el compuesto está unido covalentemente al extremo C de la HC de FIX y se interpone entre la HC de FIX y un resto heterólogo (por ejemplo, Fc). En otro ejemplo más de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico procoagulante) se inserta entre la LC de procoagulante y la HC de procoagulante, reemplazando todo, parte o nada del péptido de activación del FIX, mientras se mantiene un sitio de escisión de FXIa/FVIIa-TF en el extremo N de la HC para permitir la generación de una proteasa activa. Como alternativa, el compuesto unido al extremo N de la HC de FIX puede insertarse con un enlazador que es escindible por proteasas activadas durante la cascada de coagulación para generar el extremo N libre de la HC requerido para la actividad de proteasa (tal como se describe en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2011/043599 presentada el 11 de julio de 2011). En un ejemplo adicional, la LC de FIX y la HC de FIX podrían separarse con una o ambas cadenas unidas covalentemente en el extremo C al extremo N de un resto heterólogo (por ejemplo, Fc), con el compuesto unido a la HC como se describió anteriormente para permitir la generación de una proteasa activa después de la escisión. En un ejemplo adicional de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico procoagulante) está unido covalentemente a un resto de aminoácido interno de la molécula de FIX (conjugación interna), por ejemplo, a través de un residuo de cisteína. En un ejemplo, el residuo de cisteína se modifica genéticamente en la secuencia de aminoácidos de FIX, por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos descritos en Mei, B. *et. al.* US2006/0115876 de Pan C. *et al.*

Conjugados de FIX ejemplares se ilustran en las figuras 16 y 17.

La figura 16 ilustra diversos conjugados de la presente divulgación, en los que un compuesto (mostrado como un péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a una construcción de FIX-resto heterólogo, donde el resto heterólogo se representa en esta figura como un Fc, y donde el péptido puede estar unido a la parte FIX de la FIX-Fc (por ejemplo, construcciones A4 y A5), a la parte Fc de la FIX-Fc (construcciones A1 y A2), o puede interponerse entre el FIX y el Fc de la fusión con FIX-Fc (A3). En las construcciones A1 y A2, FIX está unido a una cadena del Fc y el péptido o derivado peptídico está unido a la otra cadena de Fc (libre). En otras construcciones similares a E2, el compuesto se puede colocar en una o en ambas cadenas de Fc. En la construcción A3, el péptido o derivado peptídico se interpone entre la Hc del FIX y el Fc. En la construcción A4, el péptido o derivado peptídico se inserta entre la LC de FIX y la HC de FIX, reemplazando todo, parte o nada del péptido de activación FIX, mientras se mantiene un sitio de escisión de FXIa/FVIIa-TF en el extremo N de la HC para permitir la generación de una proteasa activa. Como alternativa, el compuesto unido al extremo N de la HC de FIX puede insertarse con un enlazador que es escindible por proteasas activadas durante la cascada de coagulación para generar el extremo N libre de la HC requerido para la actividad de proteasa (tal como se describe en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2011/043599 presentada el 11 de julio de 2011). En la construcción A5, el péptido o derivado peptídico está unido covalentemente a un residuo de aminoácido interno de la molécula de FIX (por ejemplo, cisteína). En un ejemplo, las construcciones A1-A4 se pueden preparar de forma recombinante. En otro ejemplo, las construcciones A1 y A5 se pueden preparar de forma semi-recombinante, por ejemplo, como se ilustra en las figuras 23 y 24. Se entiende que, en otros conjugados, el resto heterólogo (representado en esta figura como Fc) puede ser, por ejemplo, PEG, PPG, albúmina, XTEN, etc.

La figura 17 ilustra diversos conjugados de la presente divulgación, en los que un compuesto (mostrado como un péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a una proteína FIX. En la construcción B1, el péptido o derivado peptídico está unido al aminoácido C-terminal de la cadena pesada (HC) del FIX. En la construcción B2, el péptido o derivado peptídico se inserta entre la LC de FIX y la HC de FIX, reemplazando todo, parte o nada del péptido de activación FIX, mientras se mantiene un sitio de escisión de FIXa/FVIIa-TF en el extremo N de la HC para permitir

la generación de una proteasa activa. Como alternativa, el compuesto unido al extremo N de la HC de FIX puede insertarse con un enlazador que es escindible por proteasas activadas durante la cascada de coagulación para generar el extremo N libre de la HC requerido para la actividad de proteasa (tal como se describe en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2011/043599 presentada el 11 de julio de 2011). En la construcción B3, el péptido o derivado peptídico está unido covalentemente a un residuo de aminoácido interno del FIX. En un ejemplo, las construcciones B1 y B2 de la figura 17 se pueden preparar de forma recombinante. En otro ejemplo, la construcción B3 se puede preparar de forma semi-recombinante, por ejemplo, como se ilustra en las figuras 23 y 24.

Conjugados con un resto de direccionamiento a plaquetas (PTM)

- En diversas realizaciones, el compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a un PTM (por ejemplo, PDG-13) o una construcción de PTM-resto heterólogo. En diversas realizaciones, el compuesto de la presente divulgación está unido covalentemente a un resto de direccionamiento a plaquetas
- La unión del compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante) a un resto de direccionamiento a plaquetas puede ser útil para dirigir el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico procoagulante) a la superficie de plaquetas (por ejemplo, *in vivo*). En un ejemplo, el compuesto es dirigido a las plaquetas para mejorar su eficacia mediante la localización del compuesto en el sitio de coagulación usando un "resto de direccionamiento" que se une a una molécula expresada en las plaquetas. Además de aumentar la concentración local a través del PTM, la interacción concomitante del péptido o derivado peptídico con FIXa puede estabilizar la asociación de FIX con el complejo Xasa en las superficies plaquetarias, similar al mecanismo de acción de FVIIIa. Preferentemente, las moléculas dirigidas no se expresan en células o tejidos distintos de las plaquetas, es decir, los restos de direccionamiento se unen específicamente a las plaquetas. La unión del péptido o derivado peptídico al resto de direccionamiento puede mejorar su actividad biológica. Esta estrategia puede reducir la dosis de compuesto necesaria para obtener un efecto farmacéutico deseado y, por lo tanto, puede reducir los posibles efectos secundarios que puede tener el compuesto. Por consiguiente, en un ejemplo, los conjugados de la presente divulgación se unen (por ejemplo, específicamente) a las plaquetas.
- En un ejemplo, el resto de direccionamiento se une a receptores/conformaciones que se encuentran en las plaquetas en reposo. Al hacerlo, los sitios para la coagulación podrían cebarse para mejorar la eficacia. El direccionamiento de dicha molécula también puede prolongar la semivida del compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) y/o prevenir el aclaramiento. Los ejemplos de restos de direccionamiento a plaquetas de acuerdo con esta realización incluyen Gplb (por ejemplo, Gplbalfa) del complejo Gplb/V/IX, GpVI, y formas no activas de GPIIb/IIIa.
- En otro ejemplo, el resto de direccionamiento a plaquetas se une a receptores/conformaciones que solo se encuentran en las plaquetas activadas con el fin de localizar el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) en un sitio de coagulación activa. Ejemplos de dichas moléculas incluyen la forma activa de GPIIb/IIIa así como CD62P.
- En otra realización, el resto de direccionamiento a plaquetas se une selectivamente a una diana seleccionada de entre el grupo que consiste en: GMP-33, LAMP-1, LAMP-2, CD40L y LOX-1.
- El resto de direccionamiento a plaquetas puede ser, por ejemplo, MB9, SCE5, scFv, AP3 o péptidos (por ejemplo, péptidos "RGD") que se dirigen a GPIIb/IIIa, un ácido graso o molécula pequeña capaz de insertarse en membranas plasmáticas, OS1, OS2 y PS4 que se dirigen a GP1b. En una realización, el resto de direccionamiento a plaquetas es OS1, OS2 y PS4 que se dirigen a GP1b.
- En otra realización, el resto de direccionamiento a plaquetas es un resto que se une a GPIIb/IIIa (por ejemplo, PDG-13).
- En un ejemplo, el conjugado de la presente divulgación incluye una construcción de resto de direccionamiento a plaquetas-resto heterólogo (por ejemplo, PTM-Fc, PTM-albúmina, PTM-PEG) y el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte de resto de direccionamiento a plaquetas de la construcción. En otro ejemplo, el conjugado de la presente divulgación incluye una construcción de resto de direccionamiento a plaquetas-resto heterólogo (por ejemplo, PTM-Fc, PTM-albúmina, PTM-PEG) y el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte de resto heterólogo de la construcción.
- En un ejemplo de acuerdo con las realizaciones anteriores, el resto heterólogo es Fc. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un conjugado que comprende una construcción de PTM-Fc (PTM-Fc) y un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante), y un enlazador, que une

covalentemente el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) al PTM-Fc. En un ejemplo de acuerdo con esta realización, el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte de PTM del PTM-Fc (por ejemplo, a través de un enlazador). En otro ejemplo de acuerdo con esta realización, el compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) está unido covalentemente a la parte de Fc del PTM-Fc (por ejemplo, a través de un enlazador).

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico procoagulante) está unido covalentemente al extremo N del resto de direccionamiento a plaquetas. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico procoagulante) está unido covalentemente al extremo C del resto de direccionamiento a plaquetas. En un ejemplo adicional de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico procoagulante) está unido covalentemente a un resto de aminoácido interno de la molécula de resto de direccionamiento a plaquetas (conjugación interna), por ejemplo, a través de un residuo de cisteína. En un ejemplo, el residuo de cisteína se modifica genéticamente en la secuencia de aminoácidos de resto de direccionamiento a plaquetas, por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos descritos en Mei, B. *et. al.* y US2006/0115876 de Pan C. *et al.*

Los conjugados de la presente divulgación pueden comprender uno o más restos de direccionamiento. Adicionalmente, dos o más restos de direccionamiento pueden estar unidos entre sí (por ejemplo, a través de un enlazador polipeptídico) en serie. Cuando dos o más restos de direccionamiento están presentes en un conjugado de la presente divulgación, los restos pueden ser iguales o diferentes.

Conjugados de restos de direccionamiento a plaquetas se ilustran en la figura 22.

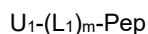
La figura 22 ilustra diversos conjugados de la presente divulgación, en los que un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante) está unido covalentemente a un resto de direccionamiento a plaquetas (construcción H3) o una construcción de resto de direccionamiento a plaquetas-resto heterólogo (H1, H2, Ha, Hb) opcionalmente a través de un enlazador. El péptido o derivado peptídico puede estar unido a la parte del resto de direccionamiento a plaquetas de la construcción (Ha), a la parte del resto heterólogo (por ejemplo, Fc) de la construcción (H1, H2), o se puede interponer entre el resto de direccionamiento a plaquetas y el resto heterólogo (por ejemplo, Fc) de la construcción de resto de direccionamiento a plaquetas-fusión (Hb). En la figura 22, el resto heterólogo se representa como un Fc, que puede reemplazarse con otros grupos heterólogos descritos en el presente documento. En las construcciones H1 y H2, en las que el resto heterólogo se muestra como un Fc, el resto de direccionamiento a plaquetas está unido a una cadena del Fc y el péptido o derivado peptídico está unido a la otra cadena Fc (libre). En las construcciones H3, el péptido o derivado peptídico está unido al aminoácido N o C-terminal del resto de direccionamiento a plaquetas. En otras construcciones, el péptido o derivado peptídico está unido covalentemente a un residuo de aminoácido interno del resto de direccionamiento a plaquetas (por ejemplo, cisteína). Se entiende que, en otros conjugados, el resto heterólogo (representado en la figura 22 como Fc) puede ser cualquier otro resto heterólogo, por ejemplo, PEG, PPG, albúmina, XTEN, etc.

En un ejemplo, los conjugados de la figura 22 se pueden preparar de forma recombinante. En otro ejemplo, los conjugados de la figura 22 (por ejemplo, H1, H3) se pueden preparar de forma semi-recombinante, por ejemplo, como se ilustra en las figuras 25 y 26.

Los restos heterólogos útiles en cualquiera de las realizaciones anteriores se describen en el presente documento. Los restos heterólogos ejemplares de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores incluyen, por ejemplo, cualquier molécula que prolonga la semivida conocida en la técnica, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG), PAS, HES, XTEN, albúmina, así como anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fc).

Conjugados ejemplares

En un ejemplo, el conjugado polipeptídico de la presente divulgación tiene una estructura que comprende un polipéptido (por ejemplo, FVIII, FIX, FVIIa, o un resto de direccionamiento a plaquetas), un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un péptido o derivado peptídico procoagulante), opcionalmente al menos un enlazador, y opcionalmente al menos un resto heterólogo. Los ejemplos de dichas estructuras incluyen, por ejemplo, aquellos de acuerdo con una de la Fórmula (B1) a la Fórmula (G2) a continuación:



(B1)

	$\text{Pep}-(\text{L}_1)_m-\text{U}_1$	(B2)
	$\text{Het}-(\text{L}_1)_m-\text{U}_1-(\text{L}_1)_m-\text{Pep}$	(C1)
5	$\text{Pep}-(\text{L}_1)_m-\text{U}_1-(\text{L}_1)_m-\text{Het}$	(C2)
	$\text{U}_1-(\text{L}_1)_m-\text{Het}-(\text{L}_1)_m-\text{Pep}$	(D1)
10	$\text{Pep}-(\text{L}_1)_m-\text{Het}-(\text{L}_1)_m-\text{U}_1$	(D2)
	$\text{U}_1-(\text{L}_1)_m-\text{Pep}-(\text{L}_1)_m-\text{Het}$	(E1)
	$\text{Het}-(\text{L}_1)_m-\text{Pep}-(\text{L}_1)_m-\text{U}_1$	(E2)

15 En la Fórmula (B1), (B2), (C1), (C2), (D1), (D2), (E1) y (E2), U_1 es un polipéptido seleccionado de entre un factor de coagulación sanguínea y un resto de direccionamiento a plaquetas, donde el factor de coagulación sanguínea se selecciona de entre FVIIa, FVIII y FIX. En un ejemplo, FVIII es FVIII con el dominio B eliminado. En las Fórmulas (F1) y (F2), FIX(HC) es la cadena pesada de FIX, y FIX(LC) es la cadena ligera de FIX. En las fórmulas (FG) y (G2), FVIIa(HC) es la cadena pesada de FVIIa, y FVIIa(LC) es la cadena ligera de FVIIa.

20 En las fórmulas (B1) a (E2), m es un número entero seleccionado de entre 0 y 1.

Het es un resto heterólogo como se define en el presente documento. En un ejemplo, Het es un resto de prolongación de la semivida, seleccionado de entre, por ejemplo, PEG, PPG, HES, PAS, XTEN, albúmina y Fc.

25 En las fórmulas (B1) a (E2), Pep es un compuesto de la presente divulgación. En un ejemplo, el compuesto es un péptido o derivado peptídico procoagulante de la presente divulgación.

30 En las fórmulas (B1) a (G2), cada L_1 está ausente ($m=0$) o presente ($m=1$) y, cuando está presente, es un enlazador como se describe en este documento. El enlazador une covalentemente el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico), directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un resto heterólogo Het), al polipéptido (por ejemplo, FVIII, FIX, FVIIa, o un resto de direccionamiento a plaquetas). En el presente documento se describen enlazadores ejemplares.

35 En una realización, la presente invención se refiere a un conjugado que comprende el compuesto divulgado en el presente documento y un resto heterólogo que están unidos entre sí a través de un enlazador opcional. El conjugado puede representarse mediante una estructura que comprende la fórmula $\text{Het1}-(\text{L}_1)_m-\text{Pep}$ o $\text{Pep}-(\text{L}_1)_m-\text{Het1}$, donde Het1 es un resto heterólogo; m es un número entero seleccionado de entre 0 y 1; L_1 está ausente ($m=0$) o presente ($m=1$) y, cuando está presente, es un enlazador; Pep es un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1; y (-) es un enlace covalente. En otra realización, el resto heterólogo comprende una molécula que prolonga la semivida, por ejemplo, una región constante de inmunoglobulina o una parte de la misma, albúmina, una secuencia XTEN, transferrina, un resto de unión a albúmina, una secuencia PAS, una secuencia HES, la subunidad β del péptido C-terminal (CTP) de gonadotropina coriónica humana, polietilenglicol (PEG), almidón hidroxietílico (HES), moléculas pequeñas de unión a albúmina, o cualquier combinación de los mismos. En una realización específica, la región constante de

45 inmunoglobulina o una parte de la misma es un resto Fc o un socio de unión a FcRn.

En ciertas realizaciones, el conjugado de la invención comprende además un segundo resto heterólogo (Het2), donde el segundo resto heterólogo está unido o asociado con el resto heterólogo (Het o Het1). El conjugado se puede representar como $\text{Het2:Het1}-(\text{L}_1)_m-\text{Pep}$ o $\text{Pep}-(\text{L}_1)_m-\text{Het1:Het2}$, donde L_1 es un enlazador opcional, Pep es el compuesto de la invención, Het1 es un primer resto heterólogo y Het2 es un segundo resto heterólogo. En aún otra realización, el conjugado comprende dos cadenas polipeptídicas, una primera cadena que comprende el compuesto de la invención unido a un primer resto heterólogo por un primer enlazador y una segunda cadena que comprende un segundo resto heterólogo. En otras realizaciones más, el segundo resto heterólogo es una molécula que prolonga la semivida. El segundo resto heterólogo puede comprender una región constante de inmunoglobulina o una parte de la misma, albúmina, transferrina, un resto de unión a albúmina, una secuencia PAS, una secuencia HES, la subunidad β del péptido C-terminal (CTP) de gonadotropina coriónica humana, polietilenglicol (PEG), almidón hidroxietílico (HES), moléculas pequeñas de unión a albúmina, o cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, la región constante de inmunoglobulina o una parte de la misma es un resto Fc o un socio de unión a FcRn. En otras realizaciones más, el resto heterólogo y el segundo resto heterólogo están asociados por un enlace covalente, por

60 ejemplo, un enlace peptídico, un enlace disulfuro, un enlace metálico, un enlace hidrógeno, un enlace disulfuro, un

enlace sigma, un enlace pi, un enlace delta, un enlace glucosídico, un enlace agnóstico, un enlace doblado, un enlace dipolar, un retroenlace Pi, un enlace doble, un enlace triple, un enlace cuádruple, un enlace quintuple, un enlace séxtuple, conjugación, hiperconjugación, aromaticidad, hapticidad, o antienlace. En otra realización, el resto heterólogo y el segundo resto heterólogo están asociados mediante una interacción no covalente, por ejemplo, una interacción iónica, una interacción hidrofóbica, una interacción hidrofílica, una interacción de Van der Waals o un enlace de hidrógeno. En algunas realizaciones, la asociación entre el resto heterólogo y el segundo resto heterólogo es un enlace covalente o un enlace no covalente. En una realización particular, la asociación es un enlace disulfuro.

En aún otras realizaciones, el conjugado comprende además un enlazador scFc (X), que está unido al segundo resto heterólogo y al compuesto. Por lo tanto, el conjugado se puede representar como Het2-X-Pep-L1-Het1 o Het1-L1-Pep-X-Het2, donde el enlazador scFv comprende al menos un sitio de procesamiento intracelular y un enlazador (Lx). En una realización, un primer sitio de procesamiento intracelular (P1) interpuesto entre el segundo resto heterólogo y el enlazador (Lx). En otra realización, un segundo sitio de procesamiento intracelular (P2) interpuesto entre el enlazador (Lx) y el compuesto. El sitio de procesamiento intracelular insertado en su interior puede procesarse (escindirse) por una enzima de procesamiento intracelular tras la expresión en una célula huésped, lo que permite la formación de un heterodímero de tipo zimógeno. Los ejemplos de las enzimas de procesamiento intracelular incluyen furina, una Kex2 de levadura, PCSK1 (también conocida como PC1/Pc3), PCSK2 (también conocida como PC2), PCSK3 (también conocida como furina o PACE), PCSK4 (también conocida como PC4), PCSK5 (también conocido como PC5 o PC6), PCSK6 (también conocido como PACE4) o PCSK7 (también conocido como PC7/LPC, PC8 o SPC7). Otros sitios de procesamiento son conocidos en la técnica.

El conjugado que comprende dos cadenas polipeptídicas como se ha mostrado anteriormente puede comprender además FVIII, FIX, FVIIa o un resto de direccionamiento a plaquetas, donde el polipéptido está unido al compuesto o al segundo resto heterólogo a través de un segundo enlazador opcional. En una realización, el polipéptido (sea una cadena pesada o una cadena ligera) está unido al segundo resto heterólogo a través del segundo enlazador opcional. Por lo tanto, el conjugado puede comprender dos cadenas polipeptídicas, una primera cadena que comprende el compuesto, el resto heterólogo y el enlazador, y una segunda cadena que comprende el polipéptido, el segundo resto heterólogo y el segundo enlazador opcional, donde la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están asociadas entre sí.

En otras realizaciones, el conjugado comprende dos cadenas polipeptídicas seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

(a) la primera cadena polipeptídica que comprende el compuesto unido al extremo N del primer resto heterólogo mediante el primer enlazador y la segunda cadena polipeptídica que comprende el polipéptido unido al extremo N del segundo resto heterólogo mediante el segundo enlazador,

(i) donde el polipéptido es FIX o un resto de direccionamiento a plaquetas, y

(ii) donde la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están asociadas química o físicamente entre sí; (figura 16 A1 y figura 22 H1) y

(b) la primera cadena polipeptídica que comprende el compuesto unido al extremo C del primer resto heterólogo mediante el primer enlazador y la segunda cadena polipeptídica que comprende el polipéptido unido al extremo N del segundo resto heterólogo mediante el segundo enlazador,

(i) donde el polipéptido es FIX o un resto de direccionamiento a plaquetas, y

(ii) donde la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están asociadas química o físicamente entre sí; (figura 16 A2 y figura 22 H2).

En otras realizaciones más, el conjugado comprende tres cadenas polipeptídicas seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

(a) la primera cadena polipeptídica que comprende el compuesto unido al extremo N del primer resto heterólogo mediante el primer enlazador, la segunda cadena polipeptídica que comprende la cadena pesada del polipéptido unida al extremo N del segundo resto heterólogo mediante el segundo enlazador y la tercera cadena polipeptídica que comprende la cadena ligera del polipéptido,

(i) donde el polipéptido es FVIII o FVIIa, y

(ii) donde la segunda cadena polipeptídica está asociada química o físicamente con la primera cadena polipeptídica

y la tercera cadena polipeptídica; y (figura 18 C1 y figura 20 E1), y

- (b) la primera cadena polipeptídica que comprende el compuesto unido al extremo C del primer resto heterólogo mediante el primer enlazador, la segunda cadena polipeptídica que comprende la cadena pesada del polipéptido unida al extremo N del segundo resto heterólogo por el segundo enlazador, y la tercera cadena polipeptídica que comprende la cadena ligera del polipéptido
- (i) donde el polipéptido es FVIII o FVIIa, y
- (ii) donde la segunda cadena polipeptídica está asociada química o físicamente con la primera cadena polipeptídica y la tercera cadena polipeptídica. (Figura 18 C2 y figura 20 E2).

En aún otras realizaciones más, el conjugado puede estar representado mediante la fórmula:

$$\text{Pep}-(L_1)_m\text{-Het1}$$

$$U_1-(L_2)_m\text{-Het2};$$

- donde Het1 es el primer resto heterólogo;
 L1 está ausente ($m=0$) o presente ($m=1$) y, cuando está presente, es un enlazador;
 m es un número entero seleccionado de entre 0 y 1;
 Pep es el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 82,
 Het2 es el segundo resto heterólogo;
 L2 está ausente ($m=0$) o presente ($m=1$) y, cuando está presente, es un enlazador;
 U1 es el polipéptido que comprende FIX, FVIII, FVIIa o el resto de direccionamiento a plaquetas;
 (-) es un enlace peptídico; y

donde Het1 y Het2 están asociadas química o físicamente entre sí. La asociación química o física puede ser un enlace covalente, por ejemplo, un enlace disulfuro, o un enlace no covalente. La izquierda representa el extremo N, y la derecha representa el extremo C.

En otro ejemplo, el conjugado comprende:

$$\text{Het1}-(L_1)_m\text{-Pep y Het2}-(L_2)_m\text{-U}_1; \text{ o}$$

$$\text{Het1}-(L_1)_m\text{-Pep y U}_1-(L_2)_m\text{-Het2}; \text{ o}$$

$$\text{Pep}-(L_1)_m\text{-Het1 y Het2}-(L_2)_m\text{-U}_1; \text{ o}$$

$$\text{Pep}-(L_1)_m\text{-Het1 y U}_1-(L_2)_m\text{-Het2},$$

$$U_1-(L_2)_m\text{-Het2 y Het1}-(L_1)_m\text{-Pep, o}$$

$$U_1-(L_2)_m\text{-Het2 y Pep}-(L_1)_m\text{-Het1, o}$$

donde

- Het1 es el primer resto heterólogo;
 L1 está ausente ($m=0$) o presente ($m=1$), y cuando está presente es un enlazador;
 m es un número entero seleccionado de entre 0 y 1;
 Pep es el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 82,
 Het2 es el segundo resto heterólogo;
 L2 está ausente ($m=0$) o presente ($m=1$), y cuando está presente es un enlazador;
 U1 es el polipéptido que comprende FIX, FVIII, FVIIa o el resto de direccionamiento a plaquetas;
 (-) es un enlace covalente,
 donde Het1 y Het2 están asociadas química o físicamente entre sí.

En algunas realizaciones, el conjugado que comprende dos cadenas polipeptídicas o tres cadenas polipeptídicas como se ha mostrado anteriormente puede comprender además un enlazador scFc. En una realización, el enlazador scFc está unido al segundo resto heterólogo y al compuesto. En otra realización, el enlazador scFc comprende un enlazador (Lx) y un primer sitio de procesamiento intracelular (PI) interpuesto entre el segundo resto heterólogo y el enlazador

(Lx). El enlazador scFc puede comprender además un segundo sitio de procesamiento intracelular (P2) interpuesto entre el enlazador (Lx) y el compuesto. En una realización adicional, el enlazador scFc comprende dos sitios de procesamiento intracelular que son reconocidos por la misma o por diferentes enzimas de procesamiento intracelular.

- El sitio de procesamiento intracelular puede ser reconocido por una enzima de procesamiento intracelular seleccionada de entre el grupo que consiste en una Kex2 de levadura, PCSK1, PCSK2, PCSK3, PCSK4, PCSK5, PCSK6 y PCSK7.
- En una realización específica, el al menos un sitio de procesamiento intracelular es procesado por PCSK5. En otras realizaciones, cada uno de los dos sitios de procesamiento intracelular es procesado por PCSK5. En una realización, los dos sitios de procesamiento intracelular son iguales. En otras realizaciones, los dos sitios de procesamiento intracelular son diferentes. Los ejemplos del sitio de procesamiento intracelular procesado por la enzima de procesamiento intracelular comprenden la secuencia de aminoácidos RX-[R/K]-R, donde X puede ser cualquier aminoácido, y [R/K] indicó que el aminoácido puede ser R o K. Cada uno de los sitios de escisión enzimática de PCSK5 comprende independientemente la secuencia RRRR (SEQ ID NO: 900) o (RKR)_n (SEQ ID NO: 901), donde n es 2. El sitio de escisión enzimática de PCSK5 en el extremo C-terminal del enlazador scFc comprende la secuencia RRRR (SEQ ID NO: 900) y el sitio de escisión enzimática de PCSK5 en el extremo N-terminal del enlazador scFc comprende la secuencia (RKR)₂ (SEQ ID NO: 901). En una realización, el enlazador scFc tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos y aproximadamente 20 a aproximadamente 30 aminoácidos. En otra realización, el enlazador scFc comprende un péptido gly/ser. En alguna realización, el péptido gly/ser comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula (Gly₄Ser)_n o Ser(Gly₄Ser)_n, donde n es un número entero positivo seleccionado de entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Los ejemplos del enlazador incluyen el péptido (Gly₄Ser)_n, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en (Gly₄Ser)₆, Ser(Gly₄Ser)₆, (Gly₄Ser)₄ y Ser(Gly₄Ser)₄.

En ciertas realizaciones, FVIII y FVIIa pueden ser heterodímeros que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada y la cadena ligera están asociadas entre sí mediante un enlace metálico.

- En un aspecto, un conjugado comprende (a) un polipéptido seleccionado de entre una cadena pesada de FVIII (HC de FVIII), una cadena ligera de FVIII (LC de FVIII), una cadena pesada de FIX (HC de FIX), una cadena ligera de FIX (LC de FIX), una cadena pesada de FVII activable o activada (HC de FVIIa), una cadena ligera de FVII activable o activada (LC de FVIIa), y un resto de direccionamiento a plaquetas, y (b) un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 82, donde el compuesto está unido al polipéptido, opcionalmente a través de un enlazador. El extremo N, el extremo C, o un residuo de aminoácido interno del compuesto de la invención está unido al extremo N, el extremo C, o un residuo de aminoácido interno del polipéptido a través del enlazador. Véase la figura 17 B3, la figura 19 D4 y D5 y la figura 21 F5. Una realización de la invención incluye un conjugado que comprende el compuesto de la invención unido a (1) el extremo C de HC de FIX a través de un enlazador, (2) el extremo C de LC de FIX a través de un enlazador, (3) el extremo C de LC de FIX a través de un primer enlazador y el extremo N de HC de FIX a través de un segundo enlazador, o (4) un residuo de aminoácido interno de HC de FIX o LC de FIX a través de un enlazador. iii) figura 17, B1, B2 y B3; otra realización de la invención incluye el compuesto de la invención unido al extremo N o al extremo C de HC de FVIIa (figura 19 D1 y D3), el extremo C de LC de FVIIa (figura 19 D2) o un residuo de aminoácido interno de HC de FVIIa o LC de FVIIa (figura 19 D4 y D5). En algunas realizaciones, HC de FVIIa o LC de FVIIa forma un heterodímero con LC de FVIIa o HC de FVIIa, respectivamente. En otras realizaciones, el compuesto está unido al extremo N de HC de FVII activable a través de un enlazador, donde dicho enlazador comprende un sustrato escindible por proteasa.

- En una realización, el conjugado comprende el compuesto de la invención unido al extremo N o al extremo C de HC de FVIII (figura 21 F1 y F3), el extremo N o el extremo C de LC de FVIII (figura 21 F2 y F4), o un residuo de aminoácido interno de HC de FVIII o LC de FVIII. (Figura 21 F5). En esta construcción, HC de FVIII o LC de FVIII pueden formar un heterodímero con LC de FVIII o HC de FVIII, respectivamente.

- En otra realización, el compuesto de la invención puede estar unido al extremo N o al extremo C del resto de direccionamiento a plaquetas. (véase la figura 22, Ha, Hb, H3). En una realización, el compuesto o la HC del Factor IX está unido además a un resto heterólogo (Het o Het1) mediante un enlazador opcional. (Véase la figura 16, A3, A4 y A5). En otra realización, el compuesto o la HC de FVIIa está unido además a un resto heterólogo (Het o Het1) mediante un enlazador opcional. (Véase la figura 18, C3, C4, C5 y C6). En algunas realizaciones, el compuesto o la LC de FVIII está unido además a un resto heterólogo (Het o Het1) mediante un enlazador opcional. (Figura 20, E3, E4, E5, E6 y E7). En otras realizaciones, el compuesto o el resto de direccionamiento está unido además a un resto heterólogo (Het o Het1) mediante un enlazador opcional. (Véase la figura 22, Ha, Hb).

- El resto heterólogo (Het o Het1), como se usa en el presente documento, puede comprender una región constante de inmunoglobulina o una parte de la misma, albúmina, transferrina, un resto de unión a albúmina, una secuencia PAS, una secuencia HES, una secuencia XTEN, la subunidad β del péptido C-terminal (CTP) de gonadotropina coriónica

humana, polietilenglicol (PEG), almidón hidroxietílico (HES), moléculas pequeñas de unión a albúmina, o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el resto heterólogo es un resto Fc o un socio de unión a FcRn. En otra realización, el conjugado comprende además un segundo resto heterólogo (Het2). Los ejemplos del segundo resto heterólogo (Het2) comprenden una región constante de inmunoglobulina o una parte de la misma, albúmina, transferrina, un resto de unión a albúmina, una secuencia XTEN, una secuencia PAS, una secuencia HES, la subunidad β del péptido C-terminal (CTP) de gonadotropina coriónica humana, polietilenglicol (PEG), almidón hidroxietílico (HES), moléculas pequeñas de unión a albúmina, o cualquier combinación de los mismos. En una realización específica, la región constante de inmunoglobulina o una parte de la misma del segundo resto heterólogo es un resto Fc o un socio de unión a FcRn.

En realizaciones adicionales, el conjugado está polisialilado, pegilado, glucosilado, hesilado, gamma-carboxilado, o cualquiera de sus combinaciones.

Enlazador (L₁)

El enlazador se usa para unir covalentemente el compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, el péptido procoagulante) al resto heterólogo o un polipéptido (por ejemplo, un resto de direccionamiento a plaquetas, o un factor de coagulación sanguínea seleccionado de entre FVIIa, FVIII y FIX), o construcción polipeptídica (por ejemplo, FVIIa-Fc). En otras realizaciones, un enlazador está interpuesto entre el polipéptido y un resto heterólogo. Cada conjugado puede contener múltiples enlazadores.

Cuando el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico) está interpuesto entre el polipéptido (por ejemplo, FVIII, FIX, FVIIa, o el resto de direccionamiento a plaquetas) y un resto heterólogo (por ejemplo, Fc), entonces el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico) es divalente y el conjugado de la presente divulgación puede incluir más de uno (por ejemplo, 2 enlazadores), que se seleccionan independientemente.

En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador hidrófilo, por ejemplo, un enlazador peptídico, como los que comprenden Gly y Ser (por ejemplo, (GGSGG)_n donde n = 1-50) o Gly y Val. En otras realizaciones, el enlazador es un polímero soluble en agua, tal como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG). En un ejemplo, el enlazador es un resto PEG. En otras realizaciones, el enlazador es un resto de almidón hidroxietílico (HES).

El compuesto se puede acoplar con el resto heterólogo o el polipéptido químicamente o usando técnicas recombinantes, por ejemplo, mediante expresión recombinante de una proteína de fusión.

El enlace químico se puede lograr mediante la unión entre sí de restos químicos presentes en el compuesto y en el resto heterólogo o el polipéptido, por ejemplo, usando restos tales como grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo y grupos carbohidrato. Se puede usar una variedad de moléculas enlazadoras homo- y heterobifuncionales que tienen grupos que están activados, o pueden activarse para unir estos restos. Algunos grupos reactivos útiles en moléculas enlazadoras incluyen maleimidas, ésteres de N-hidroxi-succinimida e hidrazidas. Se pueden usar muchos espaciadores diferentes de diferente composición química y longitud para separar estos grupos reactivos que incluyen, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), grupos alifáticos, grupos alqueno, grupos cicloalqueno, grupos arilo fusionados o unidos, péptidos y/o miméticos de peptidilo, por ejemplo, péptidos que tienen de uno a 20 aminoácidos o análogos de aminoácidos.

En una realización, el enlazador es un enlazador no escindible. En un ejemplo de acuerdo con esta realización, el enlazador es un "enlazador polipeptídico de gly-ser", por ejemplo, incluye la secuencia de aminoácidos (GGS)_n, (GGGS)_n, o (GGGGGS)_n donde n es 1-50 (por ejemplo, n es 6).

En otro ejemplo, el enlazador es escindible (por ejemplo, escindible *in vivo*). En un ejemplo, el compuesto está unido al resto heterólogo o al polipéptido de tal manera que el compuesto se libera del resto heterólogo o el polipéptido *in vivo* (por ejemplo, cerca del sitio de actividad biológica del compuesto en el cuerpo). En un ejemplo, la escisión de dicho enlazador libera el compuesto de un potencial impedimento estérico que compromete la actividad que puede ser causado por el resto heterólogo (por ejemplo, el resto PEG).

En otras realizaciones, el compuesto está unido al polipéptido de tal manera que *in vivo* se libera una forma funcional del polipéptido (por ejemplo, el factor de coagulación) (por ejemplo, cerca del sitio de actividad biológica del factor de coagulación en el cuerpo). La escisión de dichos enlazadores libera el polipéptido de un potencial impedimento estérico que compromete la actividad que puede ser causado por el compuesto unido (por ejemplo, péptido o derivado peptídico), y por ello permite la generación de conjugados polipeptídicos que conservan una actividad específica molar alta del polipéptido.

En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador peptídico que es escindible proteolíticamente. En otras realizaciones, el enlazador es escindible por una enzima de la cascada de coagulación.

- 5 En algunas realizaciones, la liberación del polipéptido (por ejemplo, un factor de coagulación) de la forma conjugada se puede lograr uniendo el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico) a un sitio en el polipéptido que se elimina in vivo. Por ejemplo, la liberación de un factor de coagulación de la forma conjugada se puede lograr uniendo el compuesto (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico) a un sitio en el factor de coagulación que se elimina durante el proceso de activación.

10

"Escisión proteolítica de un modo relacionado con la coagulación", como se usa en el presente documento, significa cualquier escisión proteolítica que se produce como consecuencia de la activación de al menos un factor de coagulación o cofactor de coagulación. La frase "factor de coagulación activado después de que el enlazador se escinde proteolíticamente de un modo relacionado con la coagulación", como se usa en el presente documento
 15 significa que el factor de coagulación se activa casi en paralelo a la escisión proteolítica del enlazador, o que el factor de coagulación ya estaba activado antes de la escisión proteolítica del enlazador. La activación puede producirse, por ejemplo, por escisión proteolítica del factor de coagulación o por unión a un cofactor.

20

La liberación del compuesto de la forma conjugada se puede lograr usando un enlazador que se degrada de manera controlada, por ejemplo, mediante una o más enzimas proteolíticas (por ejemplo, en la sangre). Por ejemplo, se pueden usar polímeros de azúcar o péptidos que son susceptibles a las proteasas o hidrolasas sanguíneas en general. Una variedad de dichas tecnologías es conocida en la técnica y se han usado para generar profármacos.

25

El enlazador podría ser modificado genéticamente para ser escindido específicamente en sitios donde los compuestos procoagulantes son más necesarios, tales como sitios de inflamación o sitios de coagulación sanguínea desencadenados por traumatismo. Por ejemplo, el enlazador puede ser susceptible a proteasas específicas producidas solo en el sitio de acción deseado, tales como proteasas liberadas por el proceso de inflamación o generadas por la cascada de coagulación sanguínea. Esta liberación selectiva del compuesto y/o el polipéptido (por ejemplo, el factor de coagulación) puede reducir el potencial para efectos secundarios y aumentar la eficiencia del
 30 compuesto y/o el polipéptido en su sitio de acción.

35

En una realización, el enlazador es escindible por una enzima de la cascada de coagulación. En un ejemplo, el enlazador incluye un sitio escindible por trombina (resto de sustrato escindible de trombina) o un sitio escindible por FXIa (resto de sustrato escindible por FXIa). Los sitios de escisión por FXIa ejemplares incluyen: TQSFNDFTR y
 SVSQTSLKTR. Los sitios de escisión por trombina ejemplares incluyen: DFLAEGGGVR, DFLAEEGGGVR, TTKIKPR, ALVPR, ALRPR y ALRPRVVGGA. En una realización, el sitio escindible por trombina incluye (D-Phe)-Pro-Arg. En una realización, el sitio escindible por trombina incluye (D-Phe)-Pip-Arg, donde Pip es ácido pipercolico.

40

El enlazador peptídico escindible puede comprender una secuencia derivada de

45

- a) el propio factor de coagulación si contiene sitios de escisión proteolítica que se escinden proteolíticamente durante la activación del factor de coagulación,
- b) un polipéptido sustrato de este factor de coagulación, o
- c) un polipéptido sustrato escindido por una proteasa que se activa o se forma por la implicación directa o indirecta del factor de coagulación.

50

Algunas realizaciones de la invención son factores de coagulación donde el enlazador peptídico es escindible por la proteasa que normalmente activa el factor de coagulación in vivo, garantizando de este modo que la escisión del enlazador está vinculada a la activación del factor de coagulación en un sitio en el que se produce la coagulación.

55

Otros conjugados ejemplares de acuerdo con la invención son aquellos donde el enlazador es escindible mediante el factor de coagulación que forma parte del conjugado una vez que se activa, garantizando de este modo que la escisión del conjugado está conectada con un evento coagulador.

60

Otros ejemplos de conjugados terapéuticos de acuerdo con la invención son aquellos en los que el enlazador es escindible por una proteasa, que a su vez se activa directa o indirectamente por la actividad del factor de coagulación que forma parte del conjugado, garantizando de este modo también que la escisión de la proteína de fusión está vinculada con un evento coagulador.

En otro ejemplo, el enlazador incluye una proteína quimérica escindible por trombina, tal como las descritas en la patente de EE. UU. 7.589.178 de Le Bonniec.

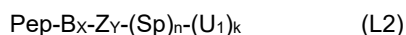
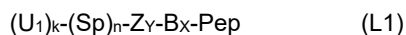
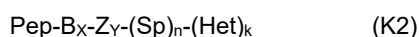
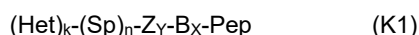
En otra realización, el compuesto de la presente divulgación está unido covalentemente al enlazador sin un enlace adicional del enlazador a un resto heterólogo o proteína. Dicho conjugado entre un compuesto y un enlazador puede ser útil como un "profármaco". Por ejemplo, el enlazador es escindible por una proteasa, que se activa directa o indirectamente por la actividad del compuesto, garantizando de este modo que la escisión del enlazador está vinculada con un evento coagulador.

10 **Enlazadores que contienen un resto autodestructivo**

En una realización, el enlazador incluye un resto autodestructivo, por ejemplo, interpuesto entre el compuesto y un resto de sustrato escindible. Por ejemplo, dicho resto autodestructivo tiene la ventaja de que la escisión del resto de sustrato no se ve afectada negativamente por el residuo de aminoácido terminal del compuesto (por ejemplo, el péptido procoagulante).

En una realización, el resto autodestructivo se deriva de alcohol paraaminobencílico (PAB), por ejemplo, conectado al compuesto a través de un carbamato, un carbonato o un enlace éter. En un ejemplo, el resto autodestructivo es carbamato de p-aminobencilo (PABC). En otro ejemplo, el resto autodestructivo es un análogo heteroaromático de PABC. Se describen restos autodestructivos ejemplares, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. 7.375.078 y 7.754.681.

En diversas realizaciones, el conjugado incluye un enlazador que contiene un resto autodestructivo (B_x). En un ejemplo de acuerdo con estas realizaciones, el conjugado formado entre el compuesto y el resto heterólogo, o entre el compuesto y el polipéptido tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (K1), (K2), (L1) o (L2):



35 donde

k es un número entero seleccionado de entre 0 y 1;

Het está ausente (k=0) o presente (k=1) y, cuando está presente, es un resto heterólogo (por ejemplo, una molécula que prolonga la semivida);

40 U₁ está ausente (k=0) o presente (k=1) y, cuando está presente, es un polipéptido seleccionado de entre factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, FVIIa, FVIII y FIXa) y un resto de direccionamiento a plaquetas, donde U₁ está opcionalmente unido además a un resto heterólogo;

n es un número entero seleccionado de entre 0 y 1;

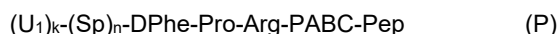
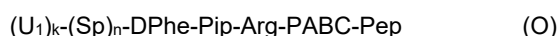
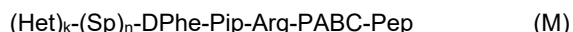
Sp es un resto espaciador, que está ausente (n=0) o presente (n=1);

45 Z_Y es un resto de sustrato escindible (por ejemplo, un resto de sustrato escindible por proteasas, por ejemplo, un resto de sustrato escindible por trombina, o un resto de sustrato escindible por FXIa);

B_x es un resto autodestructivo (por ejemplo, un resto PABC); y

Pep es un compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico procoagulante) de la presente divulgación.

50 En un ejemplo, el conjugado tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula (M), (N), (O) o (P):



60 donde k, Het, U₁, Sp y Pep se definen como para las Fórmulas K1-L2.

Compuestos unidos a un resto de sustrato escindible

En ciertas realizaciones, el compuesto de la presente divulgación está unido a un resto de sustrato escindible. El resto de sustrato escindible puede ser escindido por una enzima proteolítica como se describe en el presente documento (por ejemplo, mediante una enzima de la cascada de coagulación).

En un ejemplo, el resto de sustrato escindible está unido al compuesto a través de un resto autodestructivo (B_x). Por ejemplo, el compuesto procoagulante de la presente divulgación está unido covalentemente a un resto heterólogo, opcionalmente a través de un enlazador (L₁) formando de este modo un conjugado. El enlazador (L₁) es diferente del resto de enlace Z definido previamente.

En otro ejemplo, dos o más compuestos están unidos entre sí a través de un enlazador escindible (por ejemplo, un enlazador escindible que tiene un resto autodestructivo).

En un ejemplo de acuerdo con las diversas realizaciones anteriores, el conjugado puede tener una estructura seleccionada de entre las siguientes fórmulas:



donde Pep, Z_Y y B_X se definen como anteriormente, y el número entero p se selecciona de entre 1-50.

Resto heterólogo

En algunas realizaciones, el conjugado de la invención incluye un resto heterólogo. Por ejemplo, el compuesto de la presente divulgación está unido a un resto heterólogo. En otras realizaciones, el conjugado incluye dos restos heterólogos, que pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, un compuesto de la presente divulgación está unido a dos restos heterólogos (es decir, un primer resto heterólogo, "Het 1", y un segundo resto heterólogo "Het2"). En otras realizaciones más, el conjugado de la presente divulgación incluye más de dos restos heterólogos, por ejemplo, tres, cuatro, cinco, o más de cinco restos heterólogos. En algunas realizaciones, todos los restos heterólogos son idénticos. En algunas realizaciones, al menos un resto heterólogo es diferente de los otros restos heterólogos. En algunas realizaciones, los dos, tres o más de tres restos heterólogos están unidos en tándem. En otras realizaciones, el conjugado de la invención puede comprender dos, tres o más de tres restos heterólogos donde al menos un resto adicional (*por ejemplo*, un resto espaciador, un sustrato escindible por proteasa, un resto autodestructivo, o combinaciones de los mismos) está interpuesto entre dos restos heterólogos.

Un resto heterólogo puede comprender un resto polipeptídico heterólogo, o un resto no polipeptídico heterólogo, o ambos. En algunos aspectos, el resto heterólogo comprende una combinación de un polipéptido heterólogo y un resto no polipeptídico heterólogo.

En ciertas realizaciones, el primer resto heterólogo (*por ejemplo*, una primera región Fc) y el segundo resto heterólogo (*por ejemplo*, una segunda región Fc) están asociados entre sí para formar un dímero. En una realización, el segundo resto heterólogo es una segunda región Fc, donde la segunda región Fc está unida o asociada con el primer resto heterólogo, por ejemplo, la primera región Fc. Por ejemplo, el segundo resto heterólogo (*por ejemplo*, la segunda región Fc) puede estar unido al primer resto heterólogo (*por ejemplo*, la primera región Fc) mediante un enlazador o asociado con el primer resto heterólogo mediante un enlace covalente o no covalente

En algunas realizaciones, el resto heterólogo es un péptido o polipéptido con características no estructuradas o estructuradas que están asociadas con la prolongación de la semivida *in vivo* cuando se incorporan en un compuesto procoagulante de la invención. Los ejemplos no limitantes incluyen albúmina, fragmentos de albúmina, fragmentos Fc de inmunoglobulinas, la subunidad β del péptido C-terminal (CTP) de gonadotropina coriónica humana, una secuencia HAP, XTEN, una transferrina o un fragmento de la misma, un polipéptido PAS, enlazadores de poliglicina, enlazadores

de poliserina, restos de unión a albúmina, o cualquier fragmento, derivado, variante o combinación de estos polipéptidos. En otros aspectos relacionados, un resto heterólogo puede incluir un sitio de unión (*por ejemplo*, un aminoácido de cisteína) para un resto no polipeptídico tal como polietilenglicol (PEG), almidón hidroxietílico (HES), ácido polisialico o cualquier derivado, variante, o combinaciones de estos elementos. En algunos aspectos, un resto

5 heterólogo que consiste en un aminoácido cisteína que funciona como un sitio de unión para un resto no polipeptídico tal como polietilenglicol (PEG), almidón hidroxietílico (HES), ácido polisialico o cualquier derivado, variante o combinación de estos elementos.

En algunas realizaciones, el resto heterólogo es un polipéptido que comprende, que consiste esencialmente en, o

10 consiste en al menos aproximadamente 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000 o 4000 aminoácidos. En otras realizaciones, el resto heterólogo es un polipéptido que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 aminoácidos, de aproximadamente 200 a aproximadamente 300 aminoácidos, de aproximadamente 300 a aproximadamente 400 aminoácidos, de aproximadamente 400 a aproximadamente 500

15 aminoácidos, de aproximadamente 500 a aproximadamente 600 aminoácidos, de aproximadamente 600 a aproximadamente 700 aminoácidos, de aproximadamente 700 a aproximadamente 800 aminoácidos, de aproximadamente 800 a aproximadamente 900 aminoácidos, o aproximadamente 900 a aproximadamente 1000 aminoácidos.

20 En ciertas realizaciones, un resto heterólogo mejora una o más propiedades farmacocinéticas del compuesto o conjugado sin afectar significativamente a su actividad biológica.

En ciertas realizaciones, un resto heterólogo aumenta la semivida *in vivo* y/o *in vitro* del compuesto o conjugado procoagulante de la invención. En otras realizaciones, un resto heterólogo facilita la visualización o localización del

25 compuesto o conjugado de la invención. La visualización y/o ubicación del compuesto procoagulante de la invención o un fragmento del mismo puede ser *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* o combinaciones de las mismas.

En otras realizaciones, un resto heterólogo aumenta la estabilidad del compuesto o conjugado procoagulante de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "estabilidad" se refiere a una medida reconocida en la

30 técnica del mantenimiento de una o más propiedades físicas del compuesto procoagulante en respuesta a una condición ambiental (*por ejemplo*, una temperatura elevada o reducida). En ciertos aspectos, la propiedad física puede ser el mantenimiento de la estructura covalente del compuesto procoagulante (*por ejemplo*, la ausencia de escisión proteolítica, oxidación o desamidación no deseada). En otros aspectos, la propiedad física también puede ser la presencia del compuesto procoagulante en un estado adecuadamente plegado (*por ejemplo*, la ausencia de agregados

35 o precipitados solubles o insolubles). En un aspecto, la estabilidad del compuesto procoagulante se mide ensayando una propiedad biofísica del compuesto procoagulante, *por ejemplo*, estabilidad térmica, perfil de despliegue por pH, eliminación estable de glucosilación, solubilidad, función bioquímica (*por ejemplo*, capacidad para unirse a una proteína, receptor o ligando), etc., y/o combinaciones de las mismas. En otro aspecto, la función bioquímica se demuestra por la afinidad de unión de la interacción. En un aspecto, una medida de la estabilidad de la proteína es la

40 estabilidad térmica, es decir, la resistencia a la exposición térmica. La estabilidad se puede medir usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), SEC (cromatografía de exclusión por tamaño), DLS (dispersión dinámica de la luz), etc. Los procedimientos para medir la estabilidad térmica incluyen, pero sin limitarse a, calorimetría diferencial de barrido (DSC), fluorimetría diferencial de barrido (DSF), dicroísmo circular (CD) y ensayo de exposición térmica.

45

Restos heterólogos prolongadores de la semivida

En ciertos aspectos, el resto heterólogo es un prolongador de la semivida, es decir, un resto heterólogo que aumenta la semivida *in vivo* del compuesto o conjugado con respecto a la semivida *in vivo* del compuesto o conjugado

50 procoagulante correspondiente que carece de dicho resto heterólogo. La semivida *in vivo* se puede determinar mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia, *por ejemplo*, ensayos de actividad (ensayo cromógeno o ensayo de aPTT de coagulación en una etapa), ELISA, etc.

En algunas realizaciones, la presencia de uno o más prolongadores de la semivida da como resultado que la semivida

55 del compuesto o conjugado procoagulante se incrementa en comparación con la semivida del compuesto o conjugado correspondiente que carece de uno o más prolongadores de la semivida. La semivida del conjugado procoagulante que comprende un prolongador de la semivida es al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces,

60 al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al

menos aproximadamente 11 veces, o al menos aproximadamente 12 veces más larga que la semivida del compuesto procoagulante correspondiente que carece de dicho prolongador de la semivida.

En una realización, la semivida del compuesto o conjugado unido a un prolongador de la semivida es de aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 20 veces, de aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 15 veces, o de aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 10 veces más larga que la semivida *in vivo* del compuesto o conjugado correspondiente no unido a dicho prolongador de la semivida. En otra realización, la semivida del compuesto o conjugado unido a un prolongador de la semivida se extiende de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 9 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 8 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 7 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 6 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 3 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 9 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 8 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 7 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 6 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 4 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 3 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 9 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 8 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 7 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 6 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 4 veces, de aproximadamente 4 veces a aproximadamente 6 veces, de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 7 veces, o aproximadamente 6 veces a aproximadamente 8 veces en comparación con la semivida *in vivo* del compuesto o conjugado correspondiente no unido a dicho prolongador de la semivida.

En otras realizaciones, la semivida del compuesto o conjugado unido a un prolongador de la semivida es de al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 17 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 19 horas, al menos aproximadamente 20 horas, al menos aproximadamente 21 horas, al menos aproximadamente 22 horas, al menos aproximadamente 23 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 25 horas, al menos aproximadamente 26 horas, al menos aproximadamente 27 horas, al menos aproximadamente 28 horas, al menos aproximadamente 29 horas, al menos aproximadamente 30 horas, al menos aproximadamente 31 horas, al menos aproximadamente 32 horas, al menos aproximadamente 33 horas, al menos aproximadamente 34 horas, al menos aproximadamente 35 horas, al menos aproximadamente 36 horas, al menos aproximadamente 48 horas, al menos aproximadamente 60 horas, al menos aproximadamente 72 horas, al menos aproximadamente 84 horas, al menos aproximadamente 96 horas o al menos aproximadamente 108 horas.

En aún otras realizaciones, la semivida del compuesto o conjugado unido a un prolongador de la semivida es de aproximadamente 15 horas a aproximadamente dos semanas, de aproximadamente 16 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 17 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 18 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 19 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 20 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 21 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 22 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 23 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 26 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 28 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 30 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 32 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 34 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 36 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 48 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 60 horas a aproximadamente una semana, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente seis días, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente cinco días, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente cuatro días, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente tres días o de aproximadamente 24 horas a aproximadamente dos días.

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

aproximadamente 14 días.

(a) Polipéptidos de baja complejidad

- 5 En ciertos aspectos, el compuesto o el conjugado de la divulgación está unido a un resto heterólogo que comprende un polipéptido con baja complejidad de composición y/o estructural (por ejemplo, un polipéptido desordenado sin estructura secundaria o terciaria en solución en condiciones fisiológicas).

(b) CTP

- 10 En ciertos aspectos, el compuesto o conjugado de la divulgación está unido a un resto heterólogo que comprende una subunidad β del péptido C-terminal (CTP) de gonadotropina coriónica humana o un fragmento, variante o derivado del mismo. Se sabe que uno o más péptidos CTP insertados en una proteína recombinante aumentan la semivida *in vivo* de esa proteína. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 5.712.122. Los péptidos CTP ejemplares incluyen
- 15 DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRPLGPSDTPIIL o SSSSKAPPPSLPSPSRPLGPSDTPIILPQ. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º US 2009/0087411 A1.

(C) Región constante de inmunoglobulina (Fc) o parte de la misma

- 20 En ciertos aspectos, el compuesto o el conjugado de la invención está unido a al menos una región Fc. El término "Fc" o "región Fc", como se usa en el presente documento, significa un socio de unión al receptor Fc (FcRn) neonatal funcional que comprende un dominio Fc, variante o fragmento del mismo que mantiene las propiedades deseables de una región Fc en una proteína quimérica, por ejemplo, un aumento de la semivida *in vivo*. Se describen innumerables mutantes, fragmentos, variantes y derivados, por ejemplo, en las publicaciones PCT N.º WO 2011/069164 A2, WO
- 25 2012/006623 A2, WO 2012/006635 A2 o WO 2012/006633 A2. Una región Fc está compuesta por dominios denominados dominios CH (pesados constantes) (CH1, CH2, etc.). Dependiendo del isotipo, (es decir, IgG, IgM, IgA IgD o IgE), la región Fc puede estar compuesta por tres o cuatro dominios CH. Algunos isotipos (*por ejemplo*, IgG), las regiones Fc también contienen una región bisagra. Véase Janeway et al. 2001, Immunobiology, Garland Publishing, N.Y., N.Y.
- 30 Una región Fc o una parte de la misma para producir el conjugado procoagulante de la presente invención se puede obtener a partir de varias fuentes diferentes. En algunas realizaciones, una región Fc o una parte de la misma se deriva de una inmunoglobulina humana. Se entiende, sin embargo, que la región Fc o una parte de la misma puede derivarse de una inmunoglobulina de otra especie de mamífero, incluyendo, por ejemplo, una especie de roedor (por
- 35 ejemplo, un ratón, rata, conejo, cobaya) o de primate no humano (por ejemplo, chimpancé, macaco). Además, la región Fc o una parte de la misma puede derivarse de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo de inmunoglobulina, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización, se usa el isotipo humano IgG1.
- 40 Los conjugados que comprenden una región Fc de una inmunoglobulina otorgan varias propiedades deseables a una proteína quimérica incluyendo una mayor estabilidad, una mayor semivida en el suero (véase Capon et al., 1989, Nature 337:525) así como la unión a receptores de Fc tales como el receptor de Fc neonatal (FcRn) (patentes de EE. UU. N.º 6.086.875, 6.485.726, 6.030.613; WO 03/077834; US2003-0235536A1).
- 45 En ciertas realizaciones, el compuesto o conjugado está unido a una o más regiones Fc truncadas que, sin embargo, son suficientes para conferir propiedades de unión al receptor de Fc (FcR) a la región Fc. Por ejemplo, la parte de una región Fc que se une a FcRn (es decir, la parte de unión a FcRn) comprende de aproximadamente los aminoácidos 282-438 de IgG1, numeración de la UE (siendo los sitios de contacto primarios los aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 y 314 del dominio CH2 y los residuos de aminoácidos 385-387, 428 y 433-436 del dominio
- 50 CH3. Por tanto, una región Fc en un compuesto procoagulante de la invención puede comprender o consistir en una parte de unión a FcRn. Las partes de unión a FcRn pueden derivarse de cadenas pesadas de cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización, se utiliza una parte de unión a FcRn de un anticuerpo del isotipo humano IgG1. En otra realización, se usa una parte de unión a FcRn de un anticuerpo del isotipo IgG4 humano.
- 55 En ciertas realizaciones, una región Fc comprende al menos uno de: un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior) (aproximadamente aminoácidos 216-230 de una región Fc de anticuerpo de acuerdo con la numeración de la UE), un dominio CH2 (aproximadamente aminoácidos 231-340 de una región Fc de anticuerpo de acuerdo con la numeración de la UE), un dominio CH3 (aproximadamente aminoácidos 341-438 de una región Fc de anticuerpo de acuerdo con la numeración de la UE), un dominio CH4 o una variante, parte o fragmento de los mismos.
- 60 En otras realizaciones, una región Fc comprende un dominio Fc completo (es decir, un dominio bisagra, un dominio

- CH2 y un dominio CH3). En algunas realizaciones, una región Fc comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio bisagra (o una parte del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o una parte del mismo), un dominio bisagra (o una parte del mismo) fusionado a un dominio CH2 (o una parte del mismo), un dominio CH2 (o una parte del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o una parte del mismo), un dominio CH2 (o una parte del mismo) fusionado a un dominio bisagra (o una parte del mismo) y un dominio CH3 (o una parte del mismo). En aún otras realizaciones, una región Fc carece de al menos una parte de un dominio CH2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). En una realización particular, una región Fc comprende o consiste en aminoácidos correspondientes a los números de la UE 221 a 447.
- 10 Un Fc en un compuesto procoagulante de la invención puede incluir, por ejemplo, un cambio (por ejemplo, una sustitución) en una o más de las posiciones de aminoácidos descritas en las publicaciones internacionales 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 y WO06/085967A2; publicaciones de patente de EE. UU. N.º US 2007/0231329, US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US2007/0248603, US2007/0286859, US2008/0057056; o patentes de EE.UU. N.º 5.648.260; 5.739.277; 5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; 7.083.784; 7.404.956 y 7.317.091. En una realización, el cambio específico (por ejemplo, la sustitución específica de uno o más aminoácidos divulgados en la técnica) puede realizarse en una o más de las posiciones de aminoácidos divulgadas. En otra realización, se puede realizar un cambio diferente en una o más de las posiciones de aminoácidos divulgadas (por ejemplo, la sustitución diferente de una o más posiciones de aminoácidos divulgadas en la técnica).
- 25 Una región Fc usada en la invención también puede comprender una sustitución de aminoácidos reconocida en la técnica que altera su glucosilación. Por ejemplo, el Fc tiene una mutación que conduce a una glucosilación reducida (por ejemplo, glucosilación ligada a N u O) o puede comprender una glucoforma alterada de la fracción Fc de tipo silvestre (por ejemplo, un glucano con bajo contenido de fucosa o libre de fucosa).

30 **(d) Albúmina o fragmento, o variante de la misma**

- En ciertas realizaciones, el compuesto o conjugado de la invención está unido a un resto heterólogo que comprende albúmina o un fragmento funcional de la misma. La albúmina sérica humana (HSA o HA), una proteína de 609 aminoácidos en su forma completa, es responsable de una proporción significativa de la presión osmótica del suero y también funciona como portadora de ligandos endógenos y exógenos. El término "albúmina" como se usa en el presente documento incluye albúmina de longitud completa o un fragmento, variante, derivado o análogo funcional de la misma. Ejemplos de albúmina o los fragmentos o variantes de la misma se describen en las publicaciones de patente de EE. UU. N.º 2008/0194481A1, 2008/0004206 A1, 2008/0161243 A1, 2008/0261877 A1 o 2008/0153751 A1 o publicación de solicitud PCT N.º 2008/033413 A2, 2009/058322 A1 o 2007/021494 A2.
- 40 En una realización, el resto heterólogo es albúmina, un fragmento, o una variante de la misma que está unido además a un resto heterólogo seleccionado de entre el grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o una parte de la misma (por ejemplo, una región Fc), una secuencia PAS, HES y PEG.

45 **(e) Resto de unión a albúmina**

- En ciertas realizaciones, el resto heterólogo es un resto de unión a albúmina, que comprende un péptido de unión a albúmina, un dominio de unión a albúmina bacteriano, un fragmento de anticuerpo de unión a la albúmina, o cualquiera de sus combinaciones.
- 50 Por ejemplo, la proteína de unión a la albúmina puede ser una proteína de unión a albúmina bacteriana, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que incluye anticuerpos de dominio (véase la patente de EE.UU. N.º 6.696.245). Una proteína de unión a albúmina, por ejemplo, puede ser un dominio de unión a albúmina bacteriana, como el de la proteína G estreptocócica (Konig, T. and Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83). Otros ejemplos de péptidos de unión a albúmina que pueden usarse como socios de conjugación son, por ejemplo, los que tienen una secuencia de consenso Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys, donde Xaa₁ es Asp, Asn, Ser, Thr, o Trp; Xaa₂ es Asn, Gln, His, Ile, Leu o Lys; Xaa₃ es Ala, Asp, Phe, Trp o Tyr; y Xaa₄ es Asp, Gly, Leu, Phe, Ser o Thr como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 2003/0069395 o Dennis et al. (Dennis et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 35035-35043).

60

El dominio 3 de la proteína G estreptocócica, como se divulga por Kraulis et al., FEBS Lett. 378:190-194 (1996) y Linhult et al., Protein Sci. 11:206-213 (2002) es un ejemplo de un dominio de unión a albúmina bacteriano. Los ejemplos de péptidos de unión a albúmina incluyen una serie de péptidos que tienen la secuencia central DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 45). Véase, *por ejemplo*, Dennis et al., J. Biol. Chem. 2002, 277: 35035-35043 (2002).

5 Ejemplos de fragmentos de anticuerpos de unión a albúmina se divulgan en Muller y Kontermann, Curr. Opin. Mol. Ther. 9:319-326 (2007); Roovers et al., Cancer Immunol. Immunother. 56:303-317 (2007) y Holt et al., Prot. Eng. Design Sci., 21:283-288 (2008). Un ejemplo de dicho resto de unión a la albúmina es el hexanoato de 2-(3-maleimidopropanamido)-6-(4-(4-yodofenil)butanamido) (etiqueta "Albu") como se divulga por Trusset al., Bioconjugate Chem. 20:2286-2292 (2009).

10 (f) Secuencia PAS

En otras realizaciones, el resto heterólogo es una secuencia PAS. Una secuencia PAS, como se usa en el presente documento, significa una secuencia de aminoácidos que comprende principalmente residuos de alanina y serina o que

15 comprende principalmente residuos de alanina, serina y prolina, formando la secuencia de aminoácidos la conformación de hélice aleatoria en condiciones fisiológicas. Por consiguiente, la secuencia PAS es un elemento fundamental, un polímero de aminoácidos o un casete de secuencia que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en alanina, serina y prolina, que se pueden usar como parte del resto heterólogo en el compuesto procoagulante. Sin embargo, el experto en la materia es consciente de que un polímero de aminoácidos también puede

20 formar una conformación de hélice aleatoria cuando se añaden residuos distintos de alanina, serina y prolina como un constituyente secundario en la secuencia PAS. El término "constituyente secundario" como se usa en el presente documento significa que se pueden añadir aminoácidos distintos de alanina, serina y prolina en la secuencia PAS hasta cierto punto, por ejemplo, hasta aproximadamente el 12 %, es decir, aproximadamente 12 de los 100 aminoácidos de la secuencia PAS, hasta aproximadamente el 10 %, es decir, aproximadamente 10 de los 100

25 aminoácidos de la secuencia PAS, hasta aproximadamente el 9 %, es decir, aproximadamente 9 de 100 aminoácidos, hasta aproximadamente el 8 %, es decir, aproximadamente 8 de 100 aminoácidos, aproximadamente el 6 %, es decir, aproximadamente 6 de 100 aminoácidos, aproximadamente el 5 %, es decir, aproximadamente 5 de 100 aminoácidos, aproximadamente el 4 %, es decir, aproximadamente 4 de 100 aminoácidos, aproximadamente el 3 %, es decir, aproximadamente 3 de 100 aminoácidos, aproximadamente el 2 %, es decir, aproximadamente 2 de 100 aminoácidos,

30 aproximadamente el 1 %, es decir, aproximadamente 1 de 100 de los aminoácidos. Los aminoácidos diferentes de alanina, serina y prolina pueden seleccionarse de entre el grupo que consiste en Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr y Val.

En condiciones fisiológicas, el tramo de la secuencia PAS forma una conformación de hélice aleatoria y, por lo tanto,

35 puede mediar un aumento de estabilidad *in vivo* y/o *in vitro* en el compuesto procoagulante. Dado que el dominio de hélice aleatoria no adopta una estructura o función estable por sí mismo, la actividad biológica mediada por los polipéptidos Pep1 y/o Pep2 en el compuesto procoagulante se conserva esencialmente. En otras realizaciones, las secuencias PAS que forman un dominio de hélice aleatoria son biológicamente inertes, especialmente con respecto a la proteólisis en plasma sanguíneo, inmunogenicidad, punto isoeléctrico/comportamiento electrostático, unión a

40 receptores de la superficie celular o internalización, pero aún son biodegradables, lo que proporciona claras ventajas respecto a polímeros sintéticos tales como PEG.

Los ejemplos no limitantes de las secuencias PAS que forman la conformación de hélice aleatoria comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en ASPAAPAPASPAAPAPSAPA,

45 AAPASPAPAAPSAPAPAAPS, APSSPSPSAPSSPSPASPSS, APSSPSPSAPSSPSPASPS, SSPSAPSPSSPASPSPPSPA, AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA y ASAAAPAAAASAAASAPSAAA. Se conocen ejemplos adicionales de secuencias PAS, por ejemplo, de la publicación de patente de EE.UU. N.º 2010/0292130 A1 y publicación de solicitud PCT N.º WO 2008/155134 A1.

50 (g) Secuencia HAP

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo es un polímero homo-aminoácido rico en glicina (HAP). La secuencia HAP puede comprender una secuencia repetitiva de glicina, que tiene al menos 50 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos,

55 aminoácidos, 120 aminoácidos, 140 aminoácidos, 160 aminoácidos, 180 aminoácidos, 200 aminoácidos, 250 aminoácidos, 300 aminoácidos, 350 aminoácidos, 400 aminoácidos, 450 aminoácidos o 500 aminoácidos de longitud. En una realización, la secuencia HAP es capaz de prolongar la semivida de un resto fusionado o unido a la secuencia HAP. Los ejemplos no limitativos de la secuencia HAP incluyen, pero sin limitarse a (Gly)_n, (Gly₄Ser)_n o S(Gly₄Ser)_n, donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. En una realización, n es 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40. En otra realización, n es 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150,

60 160, 170, 180, 190 o 200.

(h) Transferrina o fragmento de la misma

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo es transferrina o un fragmento de la misma. Se puede usar cualquier transferrina para preparar los conjugados de la invención. Como ejemplo, la Tf humana de tipo silvestre (Tf) es una proteína de 679 aminoácidos, de aproximadamente 75 kDa (sin tener en cuenta la glucosilación), con dos dominios principales, N (aproximadamente 330 aminoácidos) y C (aproximadamente 340 aminoácidos), que parecen originarse a partir de una duplicación de genes. Véase los números de acceso a GenBank NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM 039847 y S95936 (www.ncbi.nlm.nih.gov/) La Transferrina comprende dos dominios, el dominio N y el dominio C. El dominio N comprende dos subdominios, el dominio N1 y el dominio N2, y el dominio C comprende dos subdominios, el dominio C1 y el dominio C2.

En una realización, el resto heterólogo de transferrina incluye una variante de splicing de transferrina. En un ejemplo, una variante de splicing de la transferrina puede ser una variante de splicing de transferrina humana, por ejemplo, Genbank Acceso AAA61140. En otra realización, la parte de transferrina de la proteína quimérica incluye uno o más dominios de la secuencia de transferrina, por ejemplo, dominio N, dominio C, dominio N1, dominio N2, dominio C1, dominio C2 o cualquiera de sus combinaciones.

(i) Polímero, por ejemplo, polietilenglicol (PEG)

En otras realizaciones, el resto heterólogo es un polímero soluble conocido en la técnica, que incluye, pero sin limitarse a, polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano o alcohol polivinílico. La invención también proporciona compuestos procoagulantes de la invención que comprenden restos heterólogos que pueden proporcionar ventajas adicionales tales como un aumento de la solubilidad, la estabilidad y el tiempo de circulación del polipéptido, o una disminución de la inmunogenicidad (véase la patente de EE.UU. N.º 4.179.337). Dichos restos heterólogos para modificación pueden seleccionarse de entre el grupo que consiste en polímeros solubles en agua que incluyen, pero sin limitarse a, polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano y alcohol polivinílico, poli(óxido de alquileno), poli(vinilpirrolidona), polioxazolina o poli(acrilolmorfolina).

El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. Para el polietilenglicol, en una realización, el peso molecular está entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa para facilitar la manipulación y la fabricación. Se pueden usar otros tamaños, dependiendo del perfil deseado (por ejemplo, la duración de la liberación sostenida deseada, los efectos, si los hay, sobre la actividad biológica, la facilidad de manipulación, el grado o la falta de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol para una proteína o análogo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10.000, 10.500, 11.000, 11.500, 12.000, 12.500, 13.000, 13.500, 14.000, 14.500, 15.000, 15.500, 16.000, 16.500, 17.000, 17.500, 18.000, 18.500, 19.000, 19.500, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, 70.000, 75.000, 80.000, 85.000, 90.000, 95.000 o 100.000 kDa.

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

El número de restos de polietilenglicol unidos a cada compuesto o conjugado de la invención (es decir, el grado de sustitución) también puede variar. Por ejemplo, el compuesto o conjugado PEGilado se puede unir, en promedio, a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20 o más moléculas de polietilenglicol. De manera similar, el grado promedio de sustitución dentro de intervalos tales como 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19 o 18-20 restos de polietilenglicol por molécula de proteína. Los procedimientos para determinar el grado de sustitución se discuten, por ejemplo, en Delgado et al., Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9:249-304 (1992).

En un ejemplo, el resto heterólogo es un polímero soluble en agua, por ejemplo, un resto de polietilenglicol (PEG) lineal o ramificado, un resto de polipropilenglicol (PPG) lineal o ramificado, un resto de almidón hidroxietílico (HES), o un polipéptido de prolongación de la semivida (por ejemplo, XTEN; véase, por ejemplo, Schellenberger V. et al., Nat Biotechnol. Diciembre de 2009;27(12):1186-90, US20100189682, PCT/US07/05952, US 12/228,859, US 12/646,566, PCT/US08/09787, US 12/699.761 y PCT/US2010/23106). El polímero puede unirse al extremo N, el extremo C de la secuencia peptídica o un aminoácido interno del compuesto o el polipéptido. En un ejemplo, el polímero está unido al

aminoácido N-terminal, por ejemplo, a través de un enlace amida. En otro ejemplo, el polímero está unido al aminoácido C-terminal a través de un enlace amida. En otro ejemplo más, el polímero está unido a la secuencia peptídica a través de la derivatización de una cadena lateral de aminoácido situada en una posición interna de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, el polímero está unido a la secuencia peptídica a través de la derivatización de una cadena lateral de tirosina, una cadena lateral de lisina o una cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico.

Los procedimientos adecuados de PEGilación se divulgan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 5.122.614 de Zalipsky et al. y 5.539.063 de Hakimi et al. Se pueden usar diversos pesos moleculares de PEG, adecuadamente de 1000 Da a 80.000 Da (o de 5000 Da a 60.000 DA). En un ejemplo, el PEG es monodisperso, lo que significa que hay poca variación en el peso molecular entre las moléculas de PEG. La PEGilación puede mejorar la solubilidad y la semivida plasmática de un péptido.

En un ejemplo de acuerdo con esta realización, el compuesto de la presente divulgación contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre o es un péptido seleccionado de entre:

KLTCCLASYCWLF-(PEG)₄,

(PEG)₂₇-KLTCCLASYCWLF,

(PEG)₂₇(PEG)₂₇-KLTCCLASYCWLF,

PEG₄-RRAPGKLTCCLASYCWLFWTGIA y

RRAPGKLTCCLASYCWLFWTGIA-PEG₄

o una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa del mismo. En un ejemplo en los péptidos anteriores, el aminoácido N-terminal está acetilado, y el aminoácido C-terminal está amidado. En otro ejemplo en los péptidos anteriores, el extremo N es libre (-NH₂ o una forma de sal del mismo), y el aminoácido C-terminal está amidado.

30 (j) Restos XTEN

En ciertos aspectos, un compuesto de la invención está unido covalentemente a al menos un resto heterólogo que es o comprende un polipéptido XTEN o fragmento, variante o derivado del mismo. Tal como se usa en el presente documento, "polipéptido XTEN" se refiere a polipéptidos de longitud prolongada con secuencias no de origen natural, sustancialmente no repetitivas, que están compuestas principalmente por pequeños aminoácidos hidrófilos, con la secuencia teniendo un grado bajo o ninguna estructura secundaria o terciaria en condiciones fisiológicas. Como un resto heterólogo, los XTEN pueden servir como un resto de prolongación de la semivida. Además, XTEN puede proporcionar propiedades deseables que incluyen, pero sin limitarse, parámetros farmacocinéticos y características de solubilidad mejorados.

La incorporación de un resto heterólogo que comprende una secuencia XTEN en un conjugado de la invención puede conferir una o más de las siguientes propiedades ventajosas al conjugado resultante: flexibilidad conformacional, solubilidad acuosa mejorada, alto grado de resistencia a proteasas, baja inmunogenicidad, baja unión a receptores de mamíferos, o radios hidrodinámicos (o Stokes) aumentados.

En ciertos aspectos, un resto XTEN puede aumentar las propiedades farmacocinéticas, tales como una semivida in vivo más larga o un área bajo la curva (AUC) aumentada, de modo que un compuesto o conjugado de la invención permanece *in vivo* y tiene actividad procoagulante durante un período mayor de tiempo en comparación con un compuesto o conjugado con el mismo, pero sin el resto heterólogo XTEN.

Se divulgan ejemplos de restos XTEN que pueden usarse como restos heterólogos en los conjugados procoagulantes de la invención, por ejemplo, en las publicaciones de patente de EE. UU. N.º 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 o 2011/0172146 A1, o las publicaciones de patentes internacionales N.º WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1 o WO 2011028344 A2.

(k) Almidón hidroxietílico (HES)

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo es almidón hidroxietílico (HES) o un derivado del mismo. El almidón hidroxietílico (HES) es un derivado de amilopectina de origen natural y es degradado por alfa-amilasa en el cuerpo. El

HES es un derivado sustituido del polímero de carbohidratos amilopectina, que está presente en el almidón de maíz a una concentración de hasta el 95 % en peso. El HES exhibe propiedades biológicas ventajosas y se usa como agente de reemplazo del volumen sanguíneo y en la terapia de hemodilución en las clínicas (Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278 (1987); y Weidler et al., Arzneim.-Forschung/Drug Res., 41, 494-498 (1991)).

5

La amilopectina contiene restos de glucosa, donde en la cadena principal están presentes enlaces alfa-1,4-glucosídicos y en los sitios de ramificación se encuentran enlaces alfa-1,6-glucosídicos. Las propiedades fisicoquímicas de esta molécula están determinadas principalmente por el tipo de enlaces glucosídicos. Debido al enlace alfa-1,4-glucosídico mellado, se producen estructuras helicoidales con aproximadamente seis monómeros de glucosa por vuelta. Las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas del polímero pueden modificarse mediante sustitución. La introducción de un grupo hidroxietilo se puede conseguir mediante hidroxietilación alcalina. Adaptando las condiciones de reacción es posible explotar la diferente reactividad del grupo hidroxil respectivo en el monómero de glucosa no sustituido con respecto a una hidroxietilación. Debido a este hecho, el experto en la materia es capaz de influir en el patrón de sustitución en una medida limitada.

15

HES se caracteriza principalmente por la distribución de peso molecular y el grado de sustitución. El grado de sustitución, indicado como DS, se refiere a la sustitución molar, es conocido por los expertos en la materia. Véase Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278 (1987), como se cita anteriormente, en particular p. 273.

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

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

55 (I) Ácidos polisialícos (PSA)

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo es un ácido polisialílico (PSA) o un derivado del mismo. Los ácidos polisialícos (PSA) son polímeros no ramificados de origen natural del ácido siálico producidos por ciertas cepas bacterianas y en mamíferos en ciertas células Roth J., et al. (1993) en Polysialic Acid: From Microbes to Man, eds Roth J., Rutishauser U., Troy F. A. (Birkhäuser Verlag, Basilea, Suiza), págs. 335-348. Pueden producirse en diversos

60

- grados de polimerización a partir de $n \approx$ aproximadamente 80 o más residuos de ácido siálico hasta $n=2$ mediante hidrólisis ácida limitada o mediante digestión con neuraminidasas, o mediante fraccionamiento de las formas naturales derivadas de bacterias del polímero. La composición de diferentes ácidos polisiálicos también varía de tal manera que existen formas homopoliméricas, es decir, el ácido polisiálico unido en alfa-2,8 que comprende el polisacárido capsular de la cepa K1 de *E. coli* y los meningococos del grupo B, que también se encuentra en la forma embrionaria de la molécula de adhesión celular neuronal (N-CAM). También existen formas heteropoliméricas, tales como el ácido polisiálico alfa-2,8 alfa-2,9 de la cepa K92 de *E. coli* y los polisacáridos del grupo C de *N. meningitidis*. El ácido siálico también se puede encontrar en copolímeros alternos con monómeros distintos de los de ácido siálico tales como el grupo W135 o el grupo Y de *N. meningitidis*. Los ácidos polisiálicos tienen funciones biológicas importantes que incluyen la evasión de los sistemas inmunitario y del complemento por bacterias patógenas y la regulación de la adhesividad glial de las neuronas inmaduras durante el desarrollo fetal (donde el polímero tiene una función antiadhesiva) Cho y Troy, PNAS, EE. UU., 91 (1994) 11427-11431, aunque no se conocen receptores para los ácidos polisiálicos en los mamíferos. El ácido polisiálico unido en alfa-2,8 de la cepa K1 de *E. coli* también se conoce como "ácido colomínico" y se usa (en diversas longitudes) para ejemplificar la presente invención. Se han descrito diversos procedimientos para unir o conjugar ácidos polisiálicos a un polipéptido (por ejemplo, véase la patente de EE. UU. N.º 5.846.951; WO-A-0187922 y US 2007/0191597 A1.

(m) Receptores de aclaramiento

- En algunas realizaciones, el resto heterólogo que comprende un receptor de aclaramiento, fragmento, variante o derivado del mismo. Por ejemplo, las formas solubles de los receptores de aclaramiento, tales como el receptor de proteína relacionada con lipoproteínas de baja densidad LRP1, o sus fragmentos, pueden bloquear la unión de un polipéptido (por ejemplo, FVIII o FIX) a los receptores de aclaramiento y, por lo tanto, prolongar su semivida *in vivo*.
- LRP1 es una proteína de membrana integral de 600 kDa que está implicada en el aclaramiento mediado por el receptor de una variedad de proteínas. Véase, *por ejemplo*, Lenting et al., Haemophilia 16:6-16 (2010). LRP1 también media el aclaramiento del Factor IX (véase, *por ejemplo*, Strickland & Medved. J. Thromb. Haemostat. 4:1484-1486 (2006).
- Otros receptores de aclaramiento adecuados son, *por ejemplo*, LDLR (receptor de lipoproteínas de baja densidad), VLDLR (receptor de lipoproteínas de muy baja densidad) y megalina (LRP-2), o fragmentos de los mismos. Véase, *por ejemplo*, Bovenschen et al., Blood 106:906-912 (2005); Bovenschen, Blood 116:5439-5440 (2010); Martinelli et al., Blood 116:5688-5697 (2010).

Visualización y localización

- En ciertas realizaciones, el resto heterólogo facilita la visualización o localización de los compuestos o conjugado de la invención. Los péptidos y otros restos para la inserción o conjugación en un compuesto que facilitan la visualización o la localización son conocidos en la técnica. Dichos restos pueden usarse para facilitar la visualización o localización *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* o cualquier combinación de las mismas.
- Dado que la trombina desempeña un papel central en la cascada de coagulación, la detección de imágenes de su actividad *in vivo* es altamente deseable. Por consiguiente, diversos restos heterólogos facilitan la visualización o la localización de los compuestos o conjugados de la invención (por ejemplo, tintes fluorescentes) y pueden modificarse genéticamente en los conjugados de la invención. En algunas realizaciones, los tintes fluorescentes pueden modificarse para que no sean fluorescentes hasta que sus aminos se regeneren tras la escisión de la trombina.
- Los ejemplos no limitantes de péptidos o polipéptidos que permiten la visualización o localización incluyen péptidos aceptores de biotina que pueden facilitar la conjugación de reactivos basados en avidina y estreptavidina, péptidos aceptores de ácido lipoico que pueden facilitar la conjugación de sondas reactivas al tiol para unir el ácido lipoico o ligar directamente de análogos del ácido lipoico fluorescente, proteínas fluorescentes, *por ejemplo*, proteína verde fluorescente (GFP) y variantes de las mismas (por ejemplo, EGFP, YFP tal como EYFP, mVenus, YPet o Citrine, o CFP como Cerulean o ECFP) o proteína roja fluorescente (RFP), péptidos que contienen cisteína para el ligamiento de tintes biarsenicales tales como 4',5'-bis(1,3,2-ditioarsolan-2-il)fluoresceína (FIAsH), o para conjugar tecnecio metaestable, péptidos para conjugar clatratos de europio para ensayos de proximidad basados en transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), cualquier variante de los mismos y cualquier combinación de los mismos.

- Los compuestos procoagulantes de la presente descripción etiquetados mediante estas técnicas se pueden usar, *por ejemplo*, para imágenes en 3-D de la formación y disolución de trombos patológicos, imágenes de tumores en tumores malignos procoagulantes, cuantificación citométrica de flujo y caracterización de micropartículas procoagulantes en

sangre y plasma, monitorización de la formación de trombos por microscopía intravital.

Polipéptidos

5 FVIII

El término "FVIII" o "Factor VIII", como se usa en el presente documento, significa proteína funcional de FVIII en su papel normal en la coagulación, a menos que se especifique lo contrario (es decir, se refiere a cualquier resto de FVIII que exhibe actividad biológica asociada con el FVIII nativo). Por lo tanto, el término FVIII incluye proteínas variantes
10 FVIII que son funcionales. Las proteínas FVIII preferidas son proteínas FVIII de primate (por ejemplo, chimpancé), humanas, porcinas, caninas y murinas. Se conocen las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos de longitud completa de FVIII, al igual que muchos fragmentos funcionales, mutantes y versiones modificadas. Las secuencias de FVIII ejemplares se divulgan, por ejemplo, en el documento WO2011/069164. Los polipéptidos de FVIII incluyen, por ejemplo, FVIII de longitud completa, FVIII de longitud completa menos Met en el extremo N, FVIII maduro (menos la
15 secuencia señal), FVIII maduro con un Met adicional en el extremo N, y/o FVIII con una eliminación total o parcial del dominio B. En un ejemplo, el FVIII es una variante en la que se elimina el dominio B, ya sea parcial o totalmente. Se puede encontrar una secuencia ejemplar de FVIII como el Número de Acceso NCBI NP000123 o la entrada de UniProtKB/Swiss-Prot P00451.

20 Una serie de moléculas FVIII funcionales, que incluyen eliminaciones del dominio B, se divulgan en las siguientes patentes: US 6.316.226 y US 6.346.513, ambas concedidas a Baxter; US 7.041.635 concedidas a In2Gen; US 5.789.203, US 6.060.447, US 5.595.886 y US 6.228.620 concedidas a Chiron; US 5.972.885 y US 6.048.720 concedidas a Biovitrum, US 5.543.502 y US 5.610.278 concedidas a Novo Nordisk; US 5.171.844 concedida a Immuno Ag; US 5.112.950 concedida a Transgene S.A.; US 4.868.112 concedida a Genetics Institute.

25 Como se usa en el presente documento, "FVIII derivado de plasma" incluye todas las formas de la proteína que se encuentra en la sangre obtenida de un mamífero que tiene la propiedad de activar la vía de coagulación.

El «dominio B» de FVIII, como se usa en el presente documento, es el mismo que el dominio B conocido en la técnica
30 que se define por la identidad de secuencia de aminoácidos interna y los sitios de escisión proteolítica por trombina, por ejemplo, los residuos Ser741-Arg1648 de FVIII humano de longitud completa. Los otros dominios de FVIII humano se definen por los siguientes residuos de aminoácidos: A1, residuos Ala1-Arg372; A2, residuos Ser373-Arg740; A3, residuos Ser1690-Ile2032; C1, residuos Arg2033-Asn2172; C2, residuos Ser2173-Tyr2332. La secuencia A3-C1-C2 incluye los residuos Ser1690-Tyr2332. Por lo general, la secuencia restante, residuos Glu1649-Arg1689, se denomina
35 péptido de activación de cadena ligera de FVIII. Las ubicaciones de los límites para todos los dominios, incluidos los dominios B, para el FVIII porcino, de ratón y canino también se conocen en la técnica. Preferentemente, el dominio B de FVIII se elimina («FVIII con dominio B eliminado» o «BDD FVIII»). Un ejemplo de un BDD FVIII es REFACTO (BDD FVIII recombinante).

40 Un «FVIII con dominio B eliminado» puede tener las eliminaciones completas o parciales descritas en las patentes de EE.UU. N.º 6.316.226, 6.346.513, 7.041.635, 5.789.203, 6.060.447, 5.595.886, 6.228.620, 5.972.885, 6.048.720, 5.543.502, 5.610.278, 5.171.844, 5.112.950, 4.868.112, y 6.458.563. En algunas realizaciones, una secuencia de FVIII con dominio B eliminado de la presente invención comprende cualquiera de las eliminaciones descritas en la col. 4, línea 4 hasta la col. 5, línea 28 y en los ejemplos 1 - 5 de la patente de EE.UU. N.º 6.316.226 (también en la patente
45 de EE.UU. N.º 6.346.513). En algunas realizaciones, un FVIII con dominio B eliminado de la presente invención tiene una eliminación en la col. 2, líneas 26-51 y en los ejemplos 5 - 8 de la patente de EE.UU. N.º 5.789.203 (también en las patentes de EE.UU. N.º 6.060.447, 5.595.886, y 6.228.620). En algunas realizaciones, un FVIII con dominio B eliminado tiene una eliminación descrita en la col. 1, líneas 25 a col. 2, línea 40 de la patente de EE.UU. N.º 5.972.885; col. 6, líneas 1 - 22 y ejemplo 1 de la patente de EE.UU. N.º 6.048.720; col. 2, líneas 17-46 de la patente de EE.UU.
50 N.º 5.543.502; col. 4, línea 22 a col. 5, línea 36 de la patente de EE.UU. N.º 5.171.844; col. 2, líneas 55-68, figura 2, y ejemplo 1 de la patente de EE.UU. N.º 5.112.950; col. 2, línea 2 a col. 19, línea 21 y tabla 2 de la patente de EE.UU. N.º 4.868.112; col. 2, línea 1 a col. 3, línea 19, col. 3, línea 40 a col. 4, línea 67, col. 7, línea 43 a col. 8, línea 26, y col. 11, línea 5 a col. 13, línea 39 de la patente de EE.UU. N.º 7.041.635; o col. 4, líneas 25-53, de la patente de EE.UU. N.º 6.458.563. En algunas realizaciones, un FVIII con dominio B eliminado tiene una eliminación de la mayor parte del
55 dominio B, pero aún contiene secuencias amino-terminal del dominio B que son esenciales para el procesamiento proteolítico *in vivo* del producto de traducción primario en dos cadenas de polipéptidos, como se divulga en la publicación internacional WO 91/09122. En algunas realizaciones, un FVIII con dominio B eliminado se construye con una eliminación de los aminoácidos 747-1638, es decir, prácticamente una eliminación completa del dominio B. Hoebein R.C., et al. J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990). Un FVIII con el dominio B eliminado también puede
60 contener una eliminación de los aminoácidos 771-1666 o los aminoácidos 868-1562 del FVIII. Meulien P., et al. Protein

Eng. 2(4): 301-6 (1988). Las eliminaciones del dominio B adicionales que son parte de la invención incluyen, por ejemplo, eliminación de los aminoácidos 982 a 1562 o 760 a 1639 (Toole et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1986) 83, 5939-5942)), 797 a 1562 (Eaton, et al. *Biochemistry* (1986) 25:8343-8347)), 741 a 1646 (Kaufman (solicitud publicada del PCT N.º WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, et al., *DNA* (1987) 6:553-564)), 741 a 1648 (Pasek (solicitud del PCT N.º 88/00831)), 816 a 1598 o 741 a 1689 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, EP 295597). Cada una de las eliminaciones anteriores puede realizarse en cualquier secuencia de FVIII.

En un ejemplo, el polipéptido de FVIII es un FVIII monocaténario.

10 En algunas realizaciones, el FVIII tiene una semivida aumentada ($t_{1/2}$) debido a la unión a un resto heterólogo que es un resto que prolonga la semivida. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, FVIII fusionado a Fc (que incluye, por ejemplo, construcciones de FVIII en forma de un híbrido tal como un híbrido dímero de monómeros FVIII₂Fc; véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 7.404.956 y 7.348.004), FVIII fusionado a albúmina, FVIII fusionado a XTEN, FVIII fusionado a PAS, FVIII fusionado a HES y FVIII fusionado a un polímero soluble en agua, tal como PEG.

15 La semivida se incrementa en comparación con un "FVIII de referencia" que no está fusionado al resto que prolonga la semivida (por ejemplo, el FVIII sin la parte Fc, o sin la parte de albúmina). Del mismo modo, el FVIII de referencia en el caso de un FVIII modificado es el mismo FVIII sin la modificación, por ejemplo, un FVIII sin la pegilación.

20 En un ejemplo, el FVIII se fusiona a uno o más polipéptidos de albúmina (construcción de FVIII-albúmina), por ejemplo, albúmina humana. El FVIII puede fusionarse al extremo N-terminal de la albúmina o al extremo C-terminal de la albúmina, siempre que el componente del FVIII de la proteína de fusión FVIII-albúmina pueda procesarse por una proproteína convertasa enzimáticamente activa para producir un polipéptido procesado que contiene FVIII. Se conocen ejemplos de albúmina, por ejemplo, fragmentos de la misma, que pueden usarse en la presente invención. Por ejemplo, patente de EE. UU. N.º 7.592.010; patente de EE. UU. N.º 6.686.179; y Schulte, *Thrombosis Res.* 124 Supl. 2:S6-S8 (2009).

Se conocen variantes de FVIII funcionales, como se discute en el presente documento. Además, se han identificado cientos de mutaciones no funcionales en el FVIII en pacientes con hemofilia, y se ha determinado que el efecto de estas mutaciones en la función del FVIII se debe más al lugar que ocupan dentro de la estructura tridimensional del FVIII que a la naturaleza de la sustitución (Cutler et al., *Hum. Mutat.* 19:274-8 (2002)). Además, las comparaciones entre FVIII de seres humanos y otras especies han identificado residuos conservados que probablemente sean necesarios para la función (Cameron et al., *Thromb. Haemost.* 79:317-22 (1998); US 6.251.632).

35 El gen FVIII humano se aisló y expresó en 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); la publicación internacional WO 87/04187; la publicación internacional WO 88/08035; la publicación internacional WO 88/03558; la patente de EE.UU. N.º 4.757.006) y la secuencia de aminoácidos se dedujo de ADNc. Capon et al., patente de EE.UU. N.º 4.965.199, divulga un procedimiento de ADN recombinante para producir FVIII en células huésped de mamífero y la purificación de FVIII humano. Se ha informado sobre la expresión de FVIII humano en células CHO (ovario de hámster chino) y BHKC (células de riñón de hámster recién nacido). El FVIII humano se ha modificado para eliminar parte o todo el dominio B (patentes de EE.UU. N.º 4.994.371 y 4.868.112), y se ha realizado la sustitución del dominio B de FVIII humano por el dominio B del factor V humano (patente de EE.UU. N.º 5.004.803. La secuencia de ADNc que codifica el FVIII humano y la secuencia de aminoácidos predicha se muestran en las SEQ ID NO:1 y 2, respectivamente, de la publicación de solicitud de EE.UU. N.º 2005/0100990.

La patente de EE.UU. N.º 5.859.204, Lollar, J. S. informa sobre mutantes funcionales de FVIII que tienen antigenicidad reducida e inmunorreactividad reducida. La patente de EE.UU. N.º 6.376.463, Lollar, J. S. también informa sobre mutantes de FVIII con inmunorreactividad reducida. La Pub. de solicitud de Estados Unidos N.º 2005/0100990, Saenko et al., informa sobre mutaciones funcionales en el dominio A2 del FVIII.

La secuencia de FVIII porcino se publica, (Toole, J. J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5939-5942 (1986)), y se ha informado de la secuencia de ADNc porcino completa obtenida de la amplificación por PCR de secuencias de FVIII de un banco de ADNc de bazo de cerdo (Healey, J. F. et al., *Blood* 88:4209-4214 (1996)). El FVIII híbrido humano/porcino que tenía sustituciones de todos los dominios, todas las subunidades y secuencias de aminoácidos específicas se describieron en la patente de EE.UU. N.º 5.364.771 por Lollar y Runge, y en la publicación internacional WO 93/20093. Más recientemente, se informó sobre el nucleótido y las correspondientes secuencias de aminoácidos de los dominios A1 y A2 de FVIII porcino y un FVIII quimérico con dominios porcinos A1 y/o A2 sustituidos por los dominios humanos correspondientes en la publicación internacional WO 94/11503. La patente de EE.UU. N.º 5.859.204, Lollar, J. S., también describe el ADNc porcino y las secuencias de aminoácidos deducidas. 6.458.563,

cedida a Emory, describe un FVIII porcino con dominio B eliminado.

En un ejemplo, el FVIII está unido a Fc. Dichas construcciones se conocen bien en la técnica Polipéptidos FVIII y FVIII-Fc ejemplares incluyen, por ejemplo, las SEQ ID NO: 700-711 o una parte de las mismas.

5

El FVIII puede ser al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a una parte de la secuencia de aminoácidos de FVIII de las SEQ ID NO: 701, 705, 707, 709, o 711 sin una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO: 701; los aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO: 705; los aminoácidos 20 a 759 de la SEQ ID NO: 707; los aminoácidos 20 a 764 de la SEQ ID NO: 709, o los aminoácidos 20 a 703 de la SEQ ID NO: 711).

10

El FVIII (o la parte de FVIII de un conjugado) puede ser idéntico a una parte de la secuencia de aminoácidos de FVIII de las SEQ ID NO: 701, 705, 707, 709 o 711 sin una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO: 701; los aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO: 705; los aminoácidos 20 a 759 de la SEQ ID NO: 707; los aminoácidos 20 a 764 de la SEQ ID NO: 709; o los aminoácidos 20 a 703 de la SEQ ID NO: 711).

15

El FVIII (o la parte de FVIII de un conjugado) puede ser al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a una parte de la secuencia de aminoácidos del FVIII de las SEQ ID NO: 701, 705, 707, 709 o 711, con una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO: 701; los aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO: 705; los aminoácidos 1 a 759 de la SEQ ID NO: 707; los aminoácidos 1 a 764 de la SEQ ID NO: 709, o los aminoácidos 1 a 703 de la SEQ ID NO: 711).

20

El FVIII (o la parte de FVIII de un polipéptido quimérico) puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos de FVIII de las SEQ ID NO: 701, 705, 707, 709 o 711, con una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO: 701; los aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO: 705; los aminoácidos 1 a 759 de la SEQ ID NO: 707; los aminoácidos 1 a 764 de la SEW ID NO: 709; o los aminoácidos 1 a 703 de la SEQ ID NO: 711).

25

En un ejemplo, el FVIII está unido a Fc. Dichas construcciones se conocen bien en la técnica El FVIII-Fc puede comprender una secuencia al menos el 90 % o el 95 % idéntica a las secuencias de aminoácidos de FVIII-Fc de las SEQ ID NO: 701, 705, 707, 709 o 711 sin una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO: 701) o al menos el 90 % o el 95 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de FVIII y Fc de las SEQ ID NO: 701, 705, 707, 709 o 711 con una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 1 a 1684 de la SEW ID NO: 701).

30

El FVIII-Fc puede comprender una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos de FVIII y Fc de las SEQ ID NO: 701, 705, 707, 709 o 711 sin una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO: 701) o idénticas a las secuencias de aminoácidos de FVIII y Fc de las SEQ ID NO: 701, 705, 707, 709 o 711 con una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 1 a 1684 de la SEQ ID NO: 701).

35

Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o ambas. Son especialmente preferidas las variantes de polinucleótidos que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o eliminaciones silenciosas, pero que no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. Se prefieren las variantes de nucleótidos producidas por sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Además, también se prefieren las variantes en las que 5-10, 1-5 o 1-2 aminoácidos se sustituyen, eliminan o añaden en cualquier combinación. Las variantes de polinucleótidos se pueden producir por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un huésped particular (cambiar los codones en el ARNm humano por los preferidos por un huésped bacteriano, tal como *E. coli*).

40

En algunas realizaciones, el FVIII está modificado, por ejemplo, pegilado, en cualquier ubicación conveniente. En algunas realizaciones, el FVIII se pega en un aminoácido expuesto en la superficie del FVIII, preferentemente una cisteína expuesta en la superficie, que puede ser una cisteína modificada genéticamente. Mei et al. (2010). En algunas realizaciones, el FVIII modificado, por ejemplo, FVIII pegilado, es un FVIII de acción prolongada.

50

En un ejemplo, el FVIII de la presente divulgación es un polipéptido que tiene actividad similar a FVIII, pero no tiene la secuencia de aminoácidos de FVIII. Por ejemplo, el polipéptido que tiene actividad similar a FVIII aumenta la actividad catalítica de FIXa. En un ejemplo, el polipéptido que tiene actividad similar a FVIII es un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos y derivados de anticuerpos activadores de FIX/FIXa). Ejemplos de polipéptidos que tienen actividad similar a FVIII se describen en la patente de EE.UU. N.º 7.033.590.

55

Los procedimientos para la preparación de construcciones de FVIII o FVIII-Fc recombinantes se divulgan, por ejemplo, en WO2011/069164.

60

FIX

"Factor IX" o "FIX", como se usan en el presente documento, significa polipéptido de factor IX funcional en su papel normal en la coagulación, a menos que se especifique otra cosa. Por lo tanto, el término Factor IX incluye polipéptidos variantes de FIX que son funcionales y los polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos variantes funcionales. Los polipéptidos de Factor IX preferidos son los polipéptidos de Factor IX humano, bovino, porcino, canino, felino y murino. Se conocen las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos de longitud completa del Factor IX, al igual que muchas variantes funcionales, por ejemplo, fragmentos, mutantes y versiones modificadas. Los polipéptidos del factor IX incluyen, factor IX de longitud completa, factor IX de longitud completa menos Met en el extremo N, factor IX maduro (menos la secuencia señal) y factor IX maduro con un Met adicional en el extremo N.

El FIX puede ser al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a una secuencia de aminoácidos de FIX sin una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 47 a 461 de la SEQ ID NO: 713). El FIX puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos de FIX sin una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 47 a 461 de la SEQ ID NO: 713).

El FIX puede ser al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntico a una secuencia de aminoácidos del FIX con una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 1 a 461 de la SEQ ID NO: 713). El FIX puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos de FIX con una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 1 a 461 de la SEQ ID NO: 713).

En un ejemplo, FIX está unido a Fc. Las secuencias de aminoácidos y ADN de FIX-Fc ejemplares incluyen las SEQ ID NO: 712 y 713, con o sin su secuencia señal.

El polipéptido FIX-Fc puede comprender una secuencia al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a las secuencias de aminoácidos de FIX y Fc sin una secuencia señal (los aminoácidos 47 a 688 de la SEQ ID NO: 713) o al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor IX y Fc con una secuencia señal (los aminoácidos 1 a 688 de la SEQ ID NO: 713).

El polipéptido FIX-Fc puede comprender una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos de Factor IX y Fc sin una secuencia señal (los aminoácidos 47 a 688 de la SEQ ID NO: 713) o idéntica a la secuencia de aminoácidos de Factor IX y Fc con una secuencia señal (los aminoácidos 1 a 688 de la SEQ ID NO: 713).

Se conocen muchas variantes funcionales de FIX. La publicación internacional número WO 02/040544 A3 divulga mutantes que muestran una mayor resistencia a la inhibición por heparina en la página 4, líneas 9-30 y página 15, líneas 6-31. La publicación internacional número WO 03/020764 A2 divulga mutantes de Factor IX con inmunogenicidad de linfocitos T reducida en las tablas 2 y 3 (en las páginas 14-24), y en la página 12, líneas 1-27. La publicación internacional número WO 2007/149406 A2 divulga moléculas de Factor IX mutantes funcionales que exhiben una mayor estabilidad de la proteína, mayor semivida in vivo e in vitro, y mayor resistencia a las proteasas en la página 4, línea 1 a página 19, línea 11. WO 2007/149406 A2 también divulga moléculas de Factor IX con otras variantes quiméricas y de otro tipo en la página 19, línea 12 a página 20, línea 9. La publicación internacional número WO 08/118507 A2 divulga mutantes del Factor IX que muestran una actividad de coagulación incrementada en la página 5, línea 14 a la página 6, línea 5. La publicación internacional número WO 09/051717 A2 divulga mutantes del Factor IX que tienen un número incrementado de sitios de glucosilación con enlaces N y/o enlaces O, lo que da como resultado una semivida y/o una recuperación aumentadas en la página 9, línea 11 a página 20, línea 2. La publicación internacional número WO 09/137254 A2 también divulga mutantes del Factor IX con un mayor número de sitios de glucosilación en la página 2, párrafo [006] a página 5, párrafo [011] y la página 16, párrafo [044] a la página 24, párrafo [057]. La publicación internacional número WO 09/130198 A2 divulga moléculas de Factor IX mutantes funcionales que tienen un mayor número de sitios de glucosilación, lo que da como resultado una semivida aumentada, en la página 4, línea 26 a página 12, línea 6. La publicación internacional número WO 09/140015 A2 divulga mutantes funcionales del Factor IX que un número mayor de residuos de Cys, que se pueden usar para la conjugación de polímeros (por ejemplo, PEG), en la página 11, párrafo a la página 13, párrafo [0053].

Además, se han identificado cientos de mutaciones no funcionales en el Factor IX en pacientes con hemofilia, muchas de las cuales se divulgan en la tabla 1, en las páginas 11-14 de la publicación internacional número WO 09/137254 A2. Dichas mutaciones no funcionales no están incluidas en la invención, pero proporcionan una guía adicional para qué mutaciones tienen más o menos probabilidades de dar como resultado un polipéptido del Factor IX funcional.

En diversas realizaciones, FIX se fusiona con uno o más polipéptidos XTEN. Schellenburger et al., Nat. Biotech.

27:1186-90 (2009). El FIX puede fusionarse con extremo N-terminal del polipéptido XTEN o con el extremo C-terminal del polipéptido XTEN, siempre que el componente del FIX de la construcción de FIX-XTEN pueda procesarse por una proteasa para producir un polipéptido que contiene el FIX procesado. Se puede incluir un sitio de proteasa entre la parte XTEN y la parte del FIX para permitir tal procesamiento. El polipéptido XTEN incluye, por ejemplo, los divulgados en los documentos WO 2009/023270, WO 2010/091122, WO 2007/103515, US 2010/0189682 y US 2009/0092582.

Los polinucleótidos de FIX variantes pueden comprender, o como alternativa consisten en, una secuencia de nucleótidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a, por ejemplo, la secuencia que codifica nucleótidos en la SEQ ID NO:712 (la parte del Factor IX, la parte Fc, individualmente o en conjunto) o la cadena complementaria a la misma, la secuencia codificante de nucleótidos del mutante conocido y el Factor IX recombinante o Fc tales como los descritos en las publicaciones y patentes citadas en el presente documento o la cadena complementaria a la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:713 o SEQ ID NO:703 (la parte de Factor IX, la parte Fc, individualmente o en conjunto), y/o fragmentos de polinucleótidos de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, los fragmentos descritos en el presente documento).

Los polinucleótidos que se hibridan con estas moléculas de ácido nucleico en condiciones de hibridación rigurosas o condiciones de astringencia inferiores también se incluyen como variantes, como lo son los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos siempre que sean funcionales.

Los polipéptidos de FIX variantes pueden comprender, o como alternativa pueden consistir en, una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a, por ejemplo, la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO:713 o 703 (la parte del Factor IX, la parte Fc, individualmente o en conjunto), y/o fragmentos polipeptídicos de cualquiera de estos polipéptidos (por ejemplo, los fragmentos descritos en el presente documento).

25 **FVIIa**

El término "Factor VII" o "FVII", incluye "Factor VIIa" o "FVIIa", y en el presente documento se refiere a la proteína FVII funcional o a la proteína FVIIa funcional en su papel normal en la coagulación, a menos que se especifique lo contrario (es decir, se refiere a cualquier resto FVII que exhibe actividad biológica que está asociada con FVII nativo). Por lo tanto, el término FVII incluye proteínas variantes que son funcionales. Las proteínas FVII preferidas son proteínas FVII de primate (por ejemplo, chimpancé), humanas, porcinas, caninas y murinas. Se conocen las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos de longitud completa de FVII, al igual que muchos fragmentos funcionales, mutantes y versiones modificadas. Secuencias de FVII químicas e híbridas ejemplares se divulgan, por ejemplo, en los documentos US 2009/0291890 A1, US2009/0041744 A1 y US 2008/0318276 A1. Los polipéptidos del factor VII incluyen, por ejemplo, FVII de longitud completa, FVII de longitud completa menos Met en el extremo N, FVII maduro (menos la secuencia señal) y FVII maduro con un Met adicional en el extremo N. Una secuencia ejemplar de FVII se puede encontrar como el número de acceso NCBI NP000122.

Como se usa en el presente documento, "FVII derivado de plasma" incluye todas las formas de la proteína que se encuentra en la sangre obtenida de un mamífero que tiene la propiedad de activar la vía de coagulación.

El término Factor VII incluye polipéptidos variantes que son funcionales. Las proteínas del factor VII preferidas son las proteínas del factor VII humano, porcino, canino y murino. Como se describe en la sección de la técnica anterior, se conocen las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos de longitud completa, así como muchos fragmentos funcionales, mutantes y versiones modificadas. El Factor VII de zimógeno de una cadena es un polipéptido que comprende 406 residuos de aminoácidos, 10 de los cuales son residuos de ácido glutámico γ -carboxilado, residuos de asparaginas N-glucosiladas (no 145 y no 322), y residuos de serina O-glucosilada en la posición 52 y 60. Las formas variantes de FVII abarcan, entre otras, moléculas donde uno o más residuos de aminoácidos han sido sustituidos, añadidos o eliminados, moléculas con diferente número de residuos de GLA, moléculas con un patrón de glucosilación modificado o incompleto. Ejemplos no limitantes de modificaciones de residuos de aminoácidos son amidación, alquilación, acilación y PEGilación.

Los ejemplos de las secuencias de ADN y aminoácidos del FVII humano se muestran como subsecuencias en la SEQ ID NO: 714 y la SEQ ID NO: 715. Los polipéptidos del FVII incluyen, por ejemplo, FVII de longitud completa, FVII de longitud completa menos Met en el extremo N, FVII maduro (menos la secuencia señal) y FVII maduro con un Met adicional en el extremo N.

El término "Factor VII activado" o "FVIIa" se refiere a la forma bicatenaria enzimáticamente activa del FVII circulante generado, así como a sus variantes en caso de que sea necesaria la actividad de coagulación (por ejemplo, la generación de trombina). El Factor VIIa bicatenario es un polipéptido producido a partir de FVII por hidrólisis del enlace

peptídico Arg152-Ile153 de FVII. FVIIa de también comprende 406 residuos de aminoácidos, 10 de los cuales son residuos de ácido glutámico γ -carboxilado, residuos de asparaginas N-glucosiladas (no 145 y no 322), y residuos de serina O-glucosilada en la posición 52 y 60. Las formas variantes de FVIIa abarcan, entre otras, moléculas donde uno o más residuos de aminoácidos han sido sustituidos, añadidos o eliminados, moléculas con diferente número de residuos de GLA, moléculas con un patrón de glucosilación modificado o incompleto. Los términos "FVII" y "FVII activado" incluyen FVII de origen natural y FVII activado, pero también abarcan variantes conservativas de función y formas modificadas de los mismos.

El término "Factor VIIa" o "FVIIa" incluye FVII activable.

Las secuencias de FVII ejemplares se divulgan en este documento. Por ejemplo, el FVII puede ser al menos el 90 % o el 95 % idéntico a una secuencia de aminoácidos del FVII sin una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 61 a 466 de la SEQ ID NO: 715). El FVII puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos del Factor VII sin una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 61 a 466 de la SEQ ID NO: 715).

El Factor VII puede ser al menos el 90 % o el 95 % idéntico a una secuencia de aminoácidos del Factor VII con una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 1 a 466 de la SEQ ID NO: 715). El Factor VII puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos de FVII con una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 1 a 466 de la SEQ ID NO: 715).

En un ejemplo, FVII está unido a Fc. Las secuencias de aminoácidos y ADN de FVII-Fc ejemplares están representadas por la SEQ ID NO: 714 y 715. El FVII-Fc puede comprender una secuencia al menos un 90 % o un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de FVII y Fc sin una secuencia señal (aminoácidos 61 a 693 de SEQ ID NO: 715) o al menos un 90 % o un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de FVII y Fc con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 693 de SEQ ID NO: 715).

El FVII-Fc puede comprender una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos de FVII y Fc sin una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 61 a 693 de la SEQ ID NO: 715) o idéntica a la secuencia de aminoácidos de FVII y Fc con una secuencia señal (por ejemplo, los aminoácidos 1 a 693 de la SEQ ID NO: 715).

Los polinucleótidos FVII incluyen, por ejemplo, los de la SEQ ID NO: 714 y sus fragmentos, por ejemplo, aquellos que codifican el fragmento FVII.

El término "derivado de Factor VIIa" o "derivado de FVIIa" como se usa en el presente documento, pretende designar un polipéptido FVIIa que exhibe una actividad biológica sustancialmente igual o mejorada en relación con el Factor VIIa de tipo silvestre, en el que uno o más de los aminoácidos del péptido original ha sido modificado genéticamente y/o químicamente y/o enzimáticamente, por ejemplo por alquilación, glucosilación, desglucosilación, PEGilación, acilación, formación de ésteres o formación de amidas o similares. Esto incluye, pero sin limitarse a, el factor VIIa PEGilado, el factor VIIa humano PEGilado con cisteína y sus variantes.

El término "Factor VIIa PEGilado" (y similares) significa un polipéptido del Factor VIIa conjugado con una molécula de PEG. Debe entenderse que la molécula de PEG puede unirse a cualquier parte del polipéptido del Factor VIIa, incluyendo cualquier residuo de aminoácido o resto de carbohidrato del polipéptido del Factor VIIa. El término "cisteína-Factor VIIa PEGilado" significa polipéptido del Factor VIIa que tiene una molécula de PEG conjugada con un grupo sulfhidrilo de una cisteína no nativa del polipéptido del Factor VIIa.

Los ejemplos no limitantes de derivados del Factor VIIa incluyen derivados de FVIIa glucopegilados como se divulga en los documentos WO 03/31464 y solicitudes de patente de EE. UU. US 20040043446, US 20040063911, US 20040142856, US 20040137557, and US 20040132640 (Neose Technologies, Inc.); Los conjugados de FVIIa como se divulgan en los documentos WO 01/04287, solicitud de patente de EE. UU. 20030165996, WO 01/58935, WO 03/93465 (Maxygen ApS) y WO 02/02764, solicitud de patente de EE. UU. 20030211094 (Universidad de Minnesota).

El término "actividad biológica mejorada" se refiere a polipéptidos de FVIIa con i) una actividad proteolítica sustancialmente igual o mayor en comparación con el Factor VIIa humano recombinante de tipo silvestre o ii) a los polipéptidos de FVIIa con una actividad de unión a TF sustancialmente igual o mayor en comparación con el Factor VIIa humano recombinante de tipo silvestre o iii) a polipéptidos de FVIIa con una semivida sustancialmente igual o mayor en el plasma sanguíneo en comparación con el Factor VIIa humano recombinante de tipo silvestre.

El término "Factor VIIa humano PEGilado" significa Factor VIIa humano, que tiene una molécula de PEG conjugada a un polipéptido del Factor VIIa humano. Debe entenderse que la molécula de PEG puede unirse a cualquier parte del

polipéptido del Factor VIIa, incluyendo cualquier residuo de aminoácido o resto de carbohidrato del polipéptido del Factor VIIa.

Los ejemplos no limitantes de variantes de FVIIa que tienen actividad biológica aumentada en comparación con FVIIa de tipo silvestre incluyen variantes de FVIIa como se divulga en los documentos WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, PCT/DK02/00635 (correspondiente a WO 03/027147), solicitud de patente danesa PA 2002 01423 (correspondiente a WO 04/029090), solicitud de patente danesa PA 2001 01627 (correspondiente a WO 03/027147); WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y variantes de FVIIa con actividad mejorada como se divulga en IP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.).

Los polinucleótidos variantes pueden comprender, o como alternativa consisten en, una secuencia de nucleótidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a, por ejemplo, la secuencia que codifica nucleótidos en la SEQ ID NO:15 (la parte del factor VII, la parte Fc, individualmente o en conjunto) o la cadena complementaria a la misma, la secuencia codificante de nucleótidos del mutante conocido y el factor VII recombinante o Fc tales como los descritos en las publicaciones y patentes citadas en el presente documento o la cadena complementaria a la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:16 o 4 (la parte de factor VII, la parte Fc, individualmente o en conjunto), y/o fragmentos de polinucleótidos de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, los fragmentos descritos en el presente documento). Los polinucleótidos que se hibridan con estas moléculas de ácido nucleico en condiciones de hibridación rigurosas o condiciones de astringencia inferiores también se incluyen como variantes, como lo son los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos siempre que sean funcionales.

Los polipéptidos de variantes pueden comprender, o como alternativa pueden consistir en, una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a, por ejemplo, la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO:715 o 703 (la parte del FVII, la parte Fc, individualmente o en conjunto), y/o fragmentos polipeptídicos de cualquiera de estos polipéptidos (por ejemplo, los fragmentos descritos en el presente documento).

Usando los procedimientos conocidos de ingeniería de proteínas y tecnología de ADN recombinante, se pueden generar variantes para mejorar o alterar las características de los polipéptidos. Por ejemplo, uno o más aminoácidos se pueden eliminar del extremo N o del extremo C de la proteína secretada sin pérdida sustancial de la función biológica. Los autores de Ron et al., J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993) informaron sobre variantes de proteínas KGF que tenían actividad de unión a heparina incluso después de eliminar 3, 8 o 27 residuos de aminoácidos amino terminales. De forma similar, el interferón gamma mostró una actividad hasta diez veces mayor después de eliminar 8-10 residuos de aminoácidos del extremo carboxi de esta proteína. (Dobeli et al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988).

Como se ha indicado anteriormente, las variantes polipeptídicas incluyen, por ejemplo, polipéptidos modificados. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de enlaces cruzados covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación (Mei et al., Blood 116:270-79 (2010), procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por transferencia de RNA para proteínas tales como arginilación y ubiquitinación. En algunas realizaciones, el FVII está modificado, por ejemplo, pegilado, en cualquier ubicación conveniente. En algunas realizaciones, FVII se pega en un aminoácido expuesto en la superficie del Factor VII, preferentemente uno expuesto en la superficie.

En una realización, un factor de coagulación mejorado de la invención se fabrica en una forma activada. Por ejemplo, el FVII, generalmente se produce de forma recombinante como un zimógeno, y requiere la activación durante la fabricación para producir la forma activa para la administración. En una realización, un factor de coagulación mejorado de la invención se secreta de la célula en la que se expresa en forma activa para mejorar la capacidad de fabricación. Dichos factores de coagulación pueden producirse expresando la cadena ligera de un factor de coagulación y la cadena pesada de un factor de coagulación por separado. En una realización, dicho polipéptido comprende un sitio de procesamiento intracelular cadena arriba de la cadena pesada. La activación de dicha construcción se retrasa hasta el final de la vía secretora, por ejemplo, cuando la proteína se colocaliza con enzimas de procesamiento activas en el aparato trans-Golgi. En una realización, dicha construcción comprende un resto de andamio Fc, por ejemplo, un andamio scFc en el que el enlazador scFc comprende uno o más sitios de procesamiento intracelular.

En otra realización, un factor de coagulación mejorado de la invención se prepara en forma activable. Para su uso en

terapia de derivación, los factores de coagulación exógenos solo son eficaces cuando se administran en forma activada. Sin embargo, dichos factores de coagulación activados se inactivan rápidamente por vías endógenas (por ejemplo, antitrombina III, TFPI), lo que lleva a la eliminación de la forma activa y una semivida efectiva corta. Administrar dosis más altas no resuelve este problema ya que puede dar como resultado efectos trombógenos. Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a construcciones de factor de coagulación mejoradas "activables" que circulan como zimógenos. Estas moléculas tienen una semivida más larga, pero pueden activarse fácilmente en el sitio de la coagulación por escisión por una enzima. En una realización, dicha enzima es una producida durante la cascada de coagulación. Por ejemplo, en una realización, el sitio de escisión de una construcción activable comprende un sitio de escisión por Factor XIa, Xa o trombina. Los sitios de escisión por FXIa ejemplares incluyen: TQSFNDFTR y SVSQTSLKTR. Los sitios de escisión por trombina ejemplares incluyen: DFLAEGGGVR, TTKIKPR y ALRPRVVGGA.

Como se ha analizado anteriormente, los polipéptidos ejemplares incluyen FVII fusionado con uno o más polipéptidos XTEN. Schellenburger et al., Nat. Biotech. 27:1186-90 (2009). El FVII puede fusionarse con el extremo N-terminal del polipéptido XTEN o con el extremo C-terminal del polipéptido XTEN, siempre que el componente del Factor VII de la proteína de fusión del Factor VII-XTEN pueda procesarse por una proteasa para producir un polipéptido que contiene el Factor VII procesado. Se puede incluir un sitio de proteasa entre la parte XTEN y la parte del Factor VII para permitir tal procesamiento. El polipéptido XTEN incluye, por ejemplo, los divulgados en los documentos WO 2009/023270, WO 2010/091122, WO 2007/103515, US 2010/0189682 y US 2009/0092582.

Los polipéptidos ejemplares también incluyen el Factor VII fusionado con uno o más polipéptidos de albúmina. Preferentemente, la albúmina es albúmina humana. El factor VII puede fusionarse al extremo N-terminal de la albúmina o al extremo C-terminal de la albúmina, siempre que el componente del Factor VII de la proteína de fusión Factor VII-albúmina pueda procesarse por una proproteína convertasa enzimáticamente activa para producir un polipéptido procesado que contiene Factor VII. Se conocen ejemplos de albúmina, por ejemplo, fragmentos de la misma, que pueden usarse en la presente invención. Por ejemplo, patente de EE. UU. N.º 7.592.010; patente de EE. UU. N.º 6.686.179; y Schulte, Thrombosis Res. 124 Supl. 2:S6-S8 (2009).

En algunas realizaciones, un polipéptido quimérico que comprende una parte de Factor VII tiene una semivida aumentada ($t_{1/2}$) con respecto a un polipéptido que consiste en la misma parte de Factor VII sin la parte diferente del Factor VII. Un polipéptido de Factor VII quimérico con un $t_{1/2}$ aumentado puede denominarse en el presente documento Factor VII de acción prolongada. Los polipéptidos de Factor VII quiméricos de acción prolongada incluyen, por ejemplo, Factor VII fusionado a Fc (que incluye, por ejemplo, polipéptidos quiméricos de Factor VII en forma de un híbrido tal como un híbrido monómero-dímero de FVIIFc; véase la tabla 1), Factor VII fusionado a XTEN, y Factor VII fusionado a albúmina.

Resto de direccionamiento a plaquetas

En una realización, el resto de direccionamiento a plaquetas comprende al menos uno de un sitio de unión al antígeno (por ejemplo, un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo, variante de anticuerpo o fragmento de anticuerpo), un polipéptido, una parte de unión al receptor del ligando, o una parte de unión al ligando de un receptor que se une específicamente a plaquetas, por ejemplo, plaquetas en reposo o activadas. Los ejemplos de restos de direccionamiento incluyen moléculas de scFv o péptidos que se unen a moléculas que serán dianas. En una realización, el resto de direccionamiento se une a las plaquetas en reposo. En una realización, el resto de direccionamiento se une selectivamente a las plaquetas activadas.

En una realización, el resto de direccionamiento se une selectivamente a una diana seleccionada de entre el grupo que consiste en: GPIIb, GPVI y la forma no activa de GPIIb/IIIa. En otra realización, el resto de direccionamiento se une selectivamente a una diana seleccionada de entre el grupo que consiste en: GPIIb/IIIa, selectina P, GMP-33, LAMP-1, LAMP-2, CD40L y LOX-1. A continuación se describen ejemplos de restos de direccionamiento a plaquetas.

Sitios de unión al antígeno

En ciertas realizaciones, el resto de direccionamiento a plaquetas es una parte de unión al antígeno (por ejemplo, un sitio de unión) de un anticuerpo. En una realización, la parte de unión al antígeno dirige la composición a plaquetas

En otras realizaciones, un sitio de unión de un polipéptido de la invención puede comprender un fragmento de unión al antígeno. El término "parte de unión al antígeno" se refiere a un fragmento polipeptídico de una inmunoglobulina, anticuerpo o variante de anticuerpo que se une al antígeno o compete con el anticuerpo intacto (*es decir*, con el anticuerpo intacto del que se derivaron) por la unión del antígeno (*es decir*, unión específica). Por ejemplo, dichos

fragmentos de unión al antígeno pueden derivarse de cualquiera de los anticuerpos o variantes de anticuerpos descritos anteriormente. Las partes de unión al antígeno pueden producirse mediante procedimientos recombinantes o bioquímicos que son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de fragmentos de unión al antígeno incluyen Fv, Fab, Fab' y (Fab')₂, así como moléculas scFv.

- 5 En otras realizaciones, el resto de direccionamiento es un sitio de unión de una molécula de unión monocatenaria (por ejemplo, una región variable monocatenaria o scFv). Técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de EE. UU. N.º 4.694.778; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); y Ward et al., Nature 334:544-554 (1989)) pueden adaptarse para producir moléculas de unión monocatenarias. Los anticuerpos monocatenarios se forman al unir los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, dando como resultado un anticuerpo monocatenario. También se pueden usar técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988)).
- 10 En ciertas realizaciones, el resto de direccionamiento a plaquetas incluye uno o más sitios o regiones de unión que comprenden o consisten en una secuencia de región variable monocatenaria (scFv). Las secuencias de región variable monocatenarias comprenden un único polipéptido que tiene uno o más sitios de unión al antígeno, por ejemplo, un dominio V_L unido por un enlazador flexible a un dominio V_H. Los dominios V_L y/o V_H pueden derivarse de cualquiera de los anticuerpos o variantes de anticuerpos descritos anteriormente. Las moléculas scFv pueden construirse en una orientación V_H-enlazador-V_L o una orientación V_L-enlazador-V_H. El enlazador flexible que une los dominios V_L y V_H que forman el sitio de unión al antígeno comprende preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos. En una realización, el enlazador polipeptídico es un enlazador polipeptídico gly-ser. Un enlazador polipeptídico gly/ser ejemplar es de la fórmula (Gly₄Ser)_n, donde n es un número entero positivo (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6). Otros enlazadores polipeptídicos son conocidos en la técnica. Los anticuerpos que tienen
- 15 secuencias de región variable monocatenarias (por ejemplo, anticuerpos Fv de una sola cadena) y procedimientos para producir dichos anticuerpos monocatenarios son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ho et al. 1989. Gene 77:51; Bird et al. 1988 Science 242:423; Pantoliano et al. 1991. Biochemistry 30:10117; Milenic et al. 1991. Cancer Research 51:6363; Takkinen et al. 1991. Protein Engineering 4:837).
- 20 En ciertas realizaciones, una molécula scFv es una molécula scFv estabilizada. En una realización, la molécula cFv estabilizada puede comprender un enlazador de scFv interpuesto entre un dominio V_H y un dominio V_L, donde los dominios V_H y V_L están unidos por un enlace disulfuro entre un aminoácido en el V_H y un aminoácido en el dominio V_L. En otras realizaciones, la molécula scFv estabilizada puede comprender un enlazador de scFv que tiene una longitud o composición optimizada. En otras realizaciones más, la molécula scFv estabilizada puede comprender un dominio
- 25 V_H o V_L que tiene al menos una o más sustituciones de aminoácidos estabilizantes. En otra realización más, una molécula scFv estabilizada puede tener al menos dos de las características estabilizantes enumeradas anteriormente.

- Las moléculas scFv estabilizadas tienen una estabilidad proteica mejorada o imparten una estabilidad proteica mejorada al polipéptido al que están unidas operativamente. Los enlazadores de scFv preferidos de la invención mejoran la estabilidad térmica de un polipéptido de la invención en al menos aproximadamente 2°C o 3°C en comparación con un polipéptido convencional. Se pueden hacer comparaciones, por ejemplo, entre las moléculas scFv de la invención. En ciertas realizaciones preferidas, la molécula scFv estabilizada comprende un enlazador de scFv (Gly₄Ser)₄ y un enlace disulfuro que une el aminoácido 44 de V_H y el aminoácido 100 de V_L. Se describen otras moléculas scFv estabilizadas ejemplares que pueden emplearse en los polipéptidos de la invención en la solicitud de
- 30 patente de EE. UU. N.º 11/725.970, presentada el 19 de marzo de 2007.

- En un ejemplo, el resto de direccionamiento a plaquetas incluye una región variable o una parte de la misma (por ejemplo, un dominio V_L y/o V_H) derivado de un anticuerpo usando protocolos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, el dominio variable puede derivarse de un anticuerpo producido en un mamífero no humano, por ejemplo, murino, conejillo de indias, primate, conejo o rata, inmunizando al mamífero con el antígeno o un fragmento del mismo. Véase Harlow y Lane, anteriormente.
- 35

- La inmunoglobulina puede generarse mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno relevante (por ejemplo, antígenos o células asociadas a tumores purificados o extractos celulares que comprenden dichos antígenos) y un adyuvante. Esta inmunización típicamente provoca una respuesta inmunitaria que comprende la producción de anticuerpos reactivos a antígenos a partir de esplenocitos o linfocitos activados.
- 40

- Opcionalmente, los anticuerpos pueden cribarse para unión a plaquetas de un estado de activación específico o a una región específica o fragmento deseado del antígeno sin unirse a otros fragmentos no superpuestos del antígeno. Este
- 45 última cribado puede realizarse determinando la unión de un anticuerpo a una colección de mutantes por eliminación

del antígeno y determinando qué mutantes por eliminación se unen al anticuerpo. La unión se puede evaluar, por ejemplo, mediante Western blot o ELISA. El fragmento más pequeño para mostrar la unión específica al anticuerpo define el epítipo del anticuerpo. Como alternativa, la especificidad del epítipo puede determinarse mediante un ensayo de competencia, en el que un anticuerpo de ensayo y de referencia compiten por la unión al antígeno. Si los anticuerpos de prueba y de referencia compiten, entonces se unen al mismo epítipo o epítopos lo suficientemente próximos, de modo que la unión de un anticuerpo interfiere en la unión del otro.

En otras realizaciones, el sitio de unión se deriva de un anticuerpo completamente humano. Se pueden generar anticuerpos humanos o sustancialmente humanos en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son incapaces de producir inmunoglobulina endógena (véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 6.075.181, 5.939.598, 5.591.669 y 5.589.369). Otro medio de generar anticuerpos humanos usando ratones SCID se divulga en la patente de EE.UU. N.º 5.811.524. Se apreciará que el material genético asociado con estos anticuerpos humanos también puede aislarse y manipularse como se describe en el presente documento.

Otro medio altamente eficiente para generar anticuerpos recombinantes se divulgan en Newman, *Biotechnology*, 10: 1455-1460 (1992). Específicamente, esta técnica da como resultado la generación de anticuerpos primatizados que contienen dominios variables de mono y de secuencias constantes humanas.

Además, esta técnica también se describe en la Patente de EE.UU. Nos. 5.658.570, 5.693.780 y 5.756.096.

En otra realización, un dominio de región variable de un anticuerpo alterado de la invención consiste en un dominio V_H, por ejemplo, derivado de camélidos, que es estable en ausencia de una cadena V_L (Hamers-Casterman et al. (1993). *Nature*, 363:446; Desmyter et al. (1996). *Nat. Struct. Biol.* 3: 803; Decanniere et al. (1999). *Structure*, 7:361; Davies et al. (1996). *Protein Eng.*, 9:531; Kortt et al. (1995). *J. Protein Chem.*, 14:167).

Además, el resto de direccionamiento a plaquetas puede comprender un dominio variable o CDR derivado de un anticuerpo completamente murino, completamente humano, quimérico, humanizado, de primate no humano o primatizado. Los anticuerpos no humanos, o fragmentos o dominios de los mismos, pueden alterarse para reducir su inmunogenicidad usando técnicas reconocidas en la técnica.

En una realización, los dominios variables se alteran mediante al menos un reemplazo parcial de una o más CDR. En otra realización, los dominios variables pueden alterarse opcionalmente, por ejemplo, mediante el reemplazo parcial de la región marco y el cambio de secuencias. Al preparar una región variable humanizada, las CDR pueden derivarse de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del que se derivan las regiones marco, sin embargo, se prevé que las CDR se derivarán de un anticuerpo de diferente clase y, preferentemente, de un anticuerpo de una especie diferente. Puede que no sea necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donadora para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede que solo sea necesario transferir aquellos residuos que son necesarios para mantener la actividad del dominio de unión. Dadas las explicaciones expuestas en las patentes de EE. UU. N.º 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762, estará bien dentro de la competencia de los expertos en la materia, ya sea mediante experimentación rutinaria o mediante ensayos de prueba y error para obtener un sitio funcional de unión al antígeno con inmunogenicidad reducida.

En otros aspectos, los polipéptidos de la invención pueden comprender sitios de unión al antígeno, o partes de los mismos, derivados de formas modificadas de anticuerpos. Dichas formas ejemplares incluyen, por ejemplo, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, nanocuerpos, de camélidos, Dabs, anticuerpos tetravalentes, intradiacuerpos (por ejemplo, Jendreyko et al. 2003. *J. Biol. Chem.* 278:47813), proteínas de fusión (por ejemplo, citocinas de anticuerpos proteínas de fusión, proteínas fusionadas a al menos una parte de un receptor de Fc) y anticuerpos biespecíficos. Otros anticuerpos modificados se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 4.745.055; EP 256.654; Faulkner et al., *Nature* 298:286 (1982); EP 120.694; EP 125.023; Morrison, *J. Immun.* 123:793 (1979); Kohler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197 (1980); Raso et al., *Cancer Res.* 41:2073 (1981); Morrison et al., *Ann. Rev. Immunol.* 2:239 (1984); Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984); EP 255.694; EP 266.663; and WO 88/03559. También se conocen cadenas de inmunoglobulina reorganizadas. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.444.878; WO 88/03565; y EP 68.763 y las referencias citadas en el mismo.

En otra realización, el resto de direccionamiento a plaquetas incluye un sitio o región de unión al antígeno que es un diacuerpo o un sitio de unión al antígeno derivado del mismo. Los diacuerpos son moléculas dimericas, tetravalentes, cada una con un polipéptido similar a las moléculas scFv, pero que usualmente tienen un enlazador de residuos de aminoácidos corto (por ejemplo, menos de 10 y preferentemente 1-5) que conecta ambos dominios variables, de manera que los dominios V_L y V_H en la misma cadena polipeptídica no puedan interactuar. En cambio, el dominio V_L y V_H de una cadena polipeptídica interactúan con el dominio V_H y V_L (respectivamente) en una segunda cadena

polipeptídica (véase, por ejemplo, el documento WO 02/02781). En una realización, un polipéptido inmaduro de la invención comprende un diacuerpo que está unido operativamente al extremo N y/o al extremo C de al menos una región Fc genéticamente fusionada (es decir, la región scFc).

- 5 Los anticuerpos de un solo dominio ejemplares empleados en las moléculas de unión de la invención incluyen, por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada de camélido (aproximadamente de 118 a 136 residuos de aminoácidos) como se describe en Hamers-Casterman, et al., Nature 363:446-448 (1993) y Dumoulin, et al., Protein Science 11:500-515 (2002). Otros anticuerpos de dominio único ejemplares incluyen dominios VH o VL únicos, también conocidos como Dabs® (Domantis Ltd., Cambridge, Reino Unido). Otros anticuerpos de dominio único
- 10 ejemplares más incluyen anticuerpos de tiburón (por ejemplo, Ig-NAR de tiburón). Las Ig-NAR de tiburón comprenden un homodímero de un dominio variable (V-NAR) y cinco dominios constantes similares a C (C-NAR), donde la diversidad se concentra en una región CDR3 alargada que varía de 5 a 23 residuos de longitud. En especies de camélidos (por ejemplo, llamas), la región variable de la cadena pesada, denominada VHH, forma el dominio de unión al antígeno completo. Los procedimientos para preparar moléculas de unión a un solo dominio se describen en las
- 15 patentes de EE. UU. N.º 6.005.079 y 6.765.087. Ejemplos de anticuerpos de dominio único que comprenden dominios VHH incluyen Nanobodies® (Ablynx NV, Ghent, Bélgica).

- Los anticuerpos ejemplares a partir de los cuales se pueden derivar sitios de unión para uso en las moléculas de unión de la invención son conocidos en la técnica. Los anticuerpos que se sabe que se unen a las plaquetas se pueden usar
- 20 para derivar sitios de unión, por ejemplo, el anticuerpo MB9 descrito en el documento US 2007/0218067 o la región variable o una molécula scFv que comprende la región variable se pueden usar como un resto de direccionamiento en una construcción de la invención.

Moléculas de unión a plaquetas no de inmunoglobulina

- 25 En ciertas otras realizaciones, el resto de direccionamiento comprende uno o más sitios de unión derivados de una molécula de unión no de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término "moléculas de unión no de inmunoglobulina" son moléculas de unión cuyos sitios de unión comprenden una parte (por ejemplo, un andamio o marco) que se deriva de un polipéptido distinto de una inmunoglobulina, pero que puede ser manipulado (por ejemplo,
- 30 mutagenizado) para conferir una especificidad de unión deseada.

Otros ejemplos de moléculas de unión que comprenden sitios de unión no derivados de moléculas de anticuerpo incluyen sitios de unión a receptores y sitios de unión a ligandos que se unen a plaquetas.

- 35 Las moléculas de unión no de inmunoglobulina pueden identificarse mediante la selección o el aislamiento de una variante de unión a diana de una biblioteca de moléculas de unión que tienen sitios de unión artificialmente diversificados. Las bibliotecas diversificadas pueden generarse usando enfoques completamente aleatorios (por ejemplo, PCR propensa a errores, transposición de exones o evolución dirigida) o ayudadas por estrategias de diseño reconocidas en la técnica. Por ejemplo, las posiciones de aminoácidos que suelen estar implicados cuando el sitio de
- 40 unión interactúa con su molécula diana relacionada se pueden aleatorizar mediante la inserción de codones degenerados, trinucleótidos, péptidos aleatorios o bucles completos en las posiciones correspondientes dentro del ácido nucleico que codifica el sitio de unión (véase, por ejemplo, la publicación de EE.UU. N.º 20040132028). La ubicación de las posiciones de los aminoácidos puede identificarse mediante la investigación de la estructura cristalina del sitio de unión en complejo con la molécula diana. Las posiciones candidatas para la aleatorización incluyen bucles,
- 45 superficies planas, hélices y cavidades de unión del sitio de unión. En ciertas realizaciones, los aminoácidos dentro del sitio de unión que son probables candidatos para la diversificación pueden identificarse usando técnicas conocidas en la técnica. Después de la aleatorización, la biblioteca diversificada se puede someter después a un procedimiento de selección o cribado para obtener moléculas de unión con las características de unión deseadas, por ejemplo, plaquetas de unión específica usando procedimientos conocidos en la técnica. La selección se puede lograr mediante
- 50 procedimientos reconocidos en la técnica, tales como la presentación en fagos, la presentación en levadura o la presentación en ribosomas. En una realización, las moléculas conocidas en la técnica para unirse a plaquetas pueden emplearse en las construcciones de la invención. Por ejemplo, se pueden usar péptidos que se unen a GPIIb como se describe en la técnica (por ejemplo, PS4, OS1 o OS2) (Benard et al. 2008. Biochemistry 47:4674-4682).

- 55 En un ejemplo, los restos de direccionamiento están unidos a un resto Fc.

Actividad biológica

- En diversas realizaciones, los compuestos y conjugados de la presente divulgación tienen actividad procoagulante.
- 60 Se apreciará que se dispone de diferentes ensayos para medir la actividad procoagulante. En un ejemplo, el conjugado

tiene actividad procoagulante cuando muestra actividad en al menos uno de: un ensayo de generación Fxa, un ensayo de generación de trombina (TGA) y un ensayo de tromboelastometría rotacional (ROTEM), que se describen en el presente documento, por ejemplo, en los ejemplos 2, 3 y 4, respectivamente.

- 5 Un compuesto o conjugado de la presente divulgación puede promover la coagulación en plasma agotado en FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI o vWF. En un ejemplo, el compuesto o conjugado de la presente divulgación promueve la generación de trombina y/o el depósito de fibrina en plasma en el que FVIII está agotado o ausente. Este tipo de actividad se conoce como actividad FVIII de coagulación. Cuando el plasma proviene de un individuo que carece de FVIII o que tiene niveles reducidos de FVIII, la actividad se denomina típicamente actividad equivalente a FVIII. Cuando el plasma contiene inhibidores contra FVIII, la actividad se denomina típicamente inhibidor del FVIII que evita la actividad equivalente. Otras actividades procoagulantes incluyen actividad FV, actividad FVII, actividad FX y actividad FXI.

Los compuestos individuales y los conjugados pueden variar en su eficacia relativa entre diferentes tipos de ensayo.

- 15 Por lo tanto, incluso si un compuesto o conjugado parece tener una baja eficacia en un ensayo particular, sin embargo, puede poseer un nivel adecuadamente alto de actividad procoagulante en otro ensayo.

Otros ensayos adecuados útiles para determinar la actividad procoagulante incluyen los divulgados, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2010/0022445 de Scheiflinger and Dockal.

- 20 En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación tiene una CE_{50} de aproximadamente 20 μM o menos, por ejemplo, de aproximadamente 10 μM o menos, o aproximadamente 5 μM o menos en un ensayo de generación de Factor Xa (FXa) que mide la conversión de Factor X (FX) en FXa. En un ejemplo, el compuesto tiene una CE_{50} en el ensayo de generación de FXa de aproximadamente 4 μM o menos, de aproximadamente 3 μM o menos, aproximadamente 2 μM o menos, o aproximadamente 1 μM o menos. En otro ejemplo, el compuesto tiene una CE_{50} en el ensayo de generación FXa de aproximadamente 900 nM o menos, aproximadamente 800 nM o menos, aproximadamente 700 nM o menos, aproximadamente 600 nM o menos, aproximadamente 500 nM o menos, aproximadamente 400 nM o menos, aproximadamente 300 nM o menos, o de aproximadamente 200 nM o menos. Un ensayo de generación de FXa ejemplar útil para determinar la CE_{50} de un compuesto de la presente descripción se describe en el ejemplo 2 de esta solicitud.

- En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica (por ejemplo, aumenta la k_{cat}) de un factor de coagulación sanguínea, tal como FIXa o FVIIa, por ejemplo, cuando se compara con una actividad catalítica de referencia medida en ausencia del compuesto, por ejemplo, al menos 2 veces. En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica (por ejemplo, aumenta la k_{cat}) de un factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, FIXa o FVIIa) *in vitro* (por ejemplo, en un sistema de ensayo *in vitro* adecuado, tal como un ensayo de generación FXa), por ejemplo, al menos 2 veces. En otro ejemplo, el compuesto de la presente descripción aumenta la actividad catalítica (por ejemplo, aumenta la k_{cat}) de un factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, FIXa o FVIIa) *in vivo*, por ejemplo, al menos 2 veces.

- 40 En diversas realizaciones, los compuestos de la presente divulgación disminuyen la K_M y aumentan la k_{cat} de hFIXa o hFVIIa. En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica de FIXa o FVIIa al menos 2 veces a una concentración de compuesto de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 500 μM , de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 50 μM , de aproximadamente 200 nM a aproximadamente 40 μM , de aproximadamente 300 nM a aproximadamente 30 μM , o de aproximadamente 400 nM a aproximadamente 20 μM . En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica de FIXa o FVIIa al menos 2 veces a una concentración de aproximadamente 500 nM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 4 μM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 5 μM a aproximadamente 10 μM . En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica de FIXa o FVIIa al menos 2 veces a una concentración de 100 μM o menos, por ejemplo, 50 μM o menos, 40 μM o menos, 30 μM o menos, 20 μM o menos, 15 μM o menos, 10 μM o menos, o 5 μM o menos.

- 55 En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto se usa *in vitro* y está presente en la mezcla de ensayo a una concentración de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 20 μM , de 1 μM a aproximadamente 10 μM , de 5 μM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 5 μM a aproximadamente 10 μM .

60

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica (por ejemplo, aumenta la k_{cat}) de FIXa (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 5 μM o menos, o a una concentración de aproximadamente 1 μM o menos) medida para la conversión de FX en FXa (por ejemplo, en un ensayo de generación de FXa adecuado) cuando se compara con una actividad catalítica de referencia (por ejemplo, k_{cat} de referencia) del FIXa medida en ausencia del compuesto.

En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica (por ejemplo, aumenta la k_{cat}) de FVIIa (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 5 μM o menos, o a una concentración de aproximadamente 1 μM o menos) medida para la conversión de FX en FXa (por ejemplo, en un ensayo de generación de FXa adecuado) cuando se compara con una actividad catalítica de referencia (por ejemplo, k_{cat} de referencia) del FVIIa medida en ausencia del compuesto.

En otras realizaciones, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica (por ejemplo, aumenta la k_{cat}) de un factor de coagulación sanguínea seleccionado de entre FXa (por ejemplo, para la conversión de protrombina en trombina), y la trombina (por ejemplo, para una conversión seleccionada de entre: FVIII en FVIIIa, fibrinógeno en fibrina, FV en FVa, proteína C en proteína C activa, FXI en FXIa y FXIII en FXIIIa).

En otro ejemplo, el compuesto de la presente descripción aumenta la actividad catalítica de al menos un factor de coagulación sanguínea seleccionado de entre FIXa, FXa, FVIIa y trombina. En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica de al menos un factor de coagulación sanguínea seleccionado de entre FIXa y FVIIa. En otro ejemplo más de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica de al menos dos factores de coagulación sanguínea diferentes seleccionados de entre FIXa, FXa, FVIIa y trombina. En otro ejemplo más de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica de FIXa así como FVIIa.

En otras realizaciones, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica de FIXa y/o FVIIa, por ejemplo, como se mide usando un ensayo de generación de FXa, pero no aumenta sustancialmente la actividad catalítica de FXa (por ejemplo, como se mide usando un ensayo de generación de trombina). Por ejemplo, los inventores han descubierto que el compuesto 5 no afecta significativamente a la actividad de FXa (por ejemplo, hacia un sustrato cromógeno o macromolecular cuando se usa un ensayo de generación de trombina, por ejemplo, un TGA con componentes purificados, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 3). Los inventores han descubierto además que el compuesto 5 no aumenta significativamente la actividad del complejo de protrombinasa (FXa/FVa) cuando se usa un ensayo de generación de trombina, por ejemplo, un TGA con componentes purificados, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 3b).

En otras realizaciones, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica de FIXa y/o FVIIa, por ejemplo, como se mide usando un ensayo de generación de FXa, pero no aumenta sustancialmente las actividades catalíticas de FXa (por ejemplo, como se mide usando un ensayo de generación de trombina), y no aumenta significativamente la actividad catalítica de trombina (por ejemplo, como se mide usando un ensayo de escisión de fibrinógeno). Por ejemplo, los inventores han descubierto que el compuesto 5 no afecta sustancialmente a la actividad amidolítica de alfa-trombina (véase, por ejemplo, el ejemplo 12).

En otros ejemplos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación aumenta la actividad catalítica (k_{cat}) de un factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, FIXa o FVIIa) en al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, o al menos alrededor de 100 veces. En otro ejemplo, el compuesto aumenta la actividad catalítica (k_{cat}) del factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, FIXa o FVIIa) en al menos aproximadamente 120 veces, al menos aproximadamente 140 veces, al menos aproximadamente 160 veces, al menos aproximadamente 180 veces, o al menos aproximadamente 200 veces. En otro ejemplo, el compuesto aumenta la actividad catalítica (k_{cat}) del factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, FIXa o FVIIa) en al menos aproximadamente 250 veces, al menos aproximadamente 300 veces, al menos aproximadamente 350 veces, al menos aproximadamente 400 veces, al menos aproximadamente 450 veces, o al menos aproximadamente 500 veces.

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto está presente a una concentración suficiente para causar el aumento especificado en la actividad catalítica. En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto está presente a una concentración de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 1 μM

a aproximadamente 50 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 20 μM , de 1 μM a aproximadamente 10 μM , de 5 μM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 5 μM a aproximadamente 10 μM para causar cualquiera de los aumentos especificados anteriormente en la actividad catalítica. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto está presente a una concentración por debajo de 5 aproximadamente 100 nM para causar cualquiera de los aumentos especificados anteriormente en la actividad catalítica.

Los ensayos de generación de FXa ejemplares útiles para medir las actividades catalíticas de FIXa o FVIIa en presencia o ausencia de un compuesto de la presente divulgación se describen en el ejemplo 2 de esta solicitud.

10

En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación es capaz de reducir el tiempo de coagulación en un ensayo de coagulación adecuado, por ejemplo, como se mide en un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada modificado (aPTT*) o un ensayo de tromboelastometría rotacional (ROTEM) cuando se compara con un tiempo de coagulación de referencia medido en ausencia del compuesto.

15

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto está presente a una concentración suficiente para reducir el tiempo de coagulación (por ejemplo, en al menos un 10 % cuando se compara con el tiempo de coagulación de referencia). En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto reduce el tiempo de coagulación en al menos un 10 % a una concentración de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 20 μM , de 1 μM a aproximadamente 10 μM , de 5 μM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 5 μM a aproximadamente 10 μM . En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación reduce el tiempo de coagulación en al menos un 10 % a una concentración de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 500 μM , de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 50 μM , de aproximadamente 200 nM a aproximadamente 40 μM , de aproximadamente 300 nM a aproximadamente 30 μM , o de aproximadamente 400 nM a aproximadamente 20 μM . En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación reduce el tiempo de coagulación en al menos un 10 % a una concentración de aproximadamente 500 nM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 4 μM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 5 μM a aproximadamente 10 μM . En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación reduce el tiempo de coagulación en al menos un 10 % a una concentración de 100 μM o menos, por ejemplo, 50 μM o menos, 40 μM o menos, 30 μM o menos, 20 μM o menos, 15 μM o menos, 10 μM o menos, o 5 μM o menos. En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto se ensaya *in vitro* y está presente en la mezcla de ensayo a una concentración de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 20 μM , de 1 μM a aproximadamente 10 μM , de 5 μM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 5 μM a aproximadamente 10 μM .

40

Por ejemplo, en un ensayo adecuado, una reducción del 10 % de un tiempo de coagulación de referencia de 10 minutos (medida en ausencia del compuesto), significa que la coagulación se produce después de 9 minutos en presencia del compuesto. En la técnica se conocen ensayos ejemplares útiles para medir el tiempo de coagulación. Los ensayos adecuados se describen en el ejemplo 9 (ensayo aPPT) y en el ejemplo 4 (ensayo ROTEM).

45

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto reduce el tiempo de coagulación en más del 10 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, o al menos aproximadamente el 90 % en comparación con un tiempo de coagulación de referencia medido en ausencia del compuesto.

50

En una realización, el tiempo de coagulación medido para un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, en un ensayo ROTEM) es dependiente del calcio. Esta dependencia del calcio del tiempo de coagulación es comparable a la dependencia del calcio medida para FVIII. Las actividades procoagulantes de los compuestos de la presente divulgación se examinaron para determinar la dependencia del calcio usando un ensayo Rotem, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 4. Por ejemplo, el compuesto 5 a 2,5 y 5 μM y 0,1 UI/ml de FVIII se ensayaron a 7 concentraciones de calcio diferentes que van de 0 a aproximadamente 16 mM de calcio. Similar al control de FVIII, el efecto procoagulante observado para el compuesto 5 fue sensible a la concentración de calcio (es decir, el tiempo de coagulación medido para una concentración de compuesto particular fue mayor a concentraciones elevadas de calcio).

60

En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación reduce el tiempo de coagulación o aumenta el ángulo α (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) en un ensayo ROTEM que usa plasma deficiente en el factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, plasma deficiente en el factor de coagulación humano o canino) cuando se compara con un tiempo de coagulación de referencia o un ángulo α de referencia medido en ausencia del compuesto.

En un ejemplo, el compuesto de la presente divulgación reduce el tiempo de coagulación (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) en un ensayo ROTEM que implica plasma deficiente en FVIII (por ejemplo, plasma deficiente en FVIII humano o canino). Un ejemplo de ensayo ROTEM útil para medir el tiempo de coagulación y el ángulo α se describe en el ejemplo 4 de esta solicitud.

En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación reduce el tiempo de coagulación (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) o aumenta el ángulo α en un ensayo ROTEM que implica plasma deficiente en FIX (por ejemplo, plasma deficiente en FIX humano o canino). Los inventores han descubierto que los compuestos de la presente divulgación reducen el tiempo de coagulación en plasma deficiente en FIX incluso en presencia de anticuerpos anti-FIX (por ejemplo, pAb anti-FIX). La adición de anticuerpos anti-FIX al plasma deficiente en FIX elimina la actividad residual de FIX de la muestra de plasma. Estos resultados indican que los compuestos de la presente divulgación pueden reducir el tiempo de coagulación o aumentar el ángulo α empleando un mecanismo distinto al aumento de la actividad catalítica de FIXa (por ejemplo, a través de la activación de la vía extrínseca de la cascada de coagulación sanguínea).

En un ejemplo, los compuestos de la presente divulgación reducen el tiempo de coagulación o aumentan el ángulo α aumentando la actividad catalítica de FVIIa. Por ejemplo, los inventores han descubierto que el tiempo de coagulación medido en presencia de un compuesto actual en un ensayo ROTEM que emplea plasma deficiente en FVIII aumenta significativamente (es decir, la formación de coágulos se reduce significativamente) en presencia de un anticuerpo anti-FVII (por ejemplo, pAb anti-FVII). Asimismo, el ángulo α medido en presencia de un compuesto actual se reduce significativamente cuando se añade un anticuerpo anti-FVII a la mezcla de ensayo. Estos resultados indican que los compuestos actuales pueden inducir la coagulación modulando la actividad catalítica de FVIIa (por ejemplo, además de aumentar la actividad catalítica de FIXa).

Efecto aditivo con FVIII

En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación no compite con FVIII, sino que muestra al menos una actividad aditiva (o incluso sinérgica) con FVIII en al menos un ensayo adecuado. Los ensayos ejemplares se seleccionan de entre los ensayos de generación de trombina (por ejemplo, los descritos en el presente documento) y los ensayos ROTEM (por ejemplo, los descritos en el presente documento). En un ejemplo, el compuesto muestra actividad aditiva con FVIII (es decir, la actividad del compuesto no se inhibe ni se reduce por la presencia de FVIII; o la actividad de FVIII no se inhibe por la presencia del compuesto) cuando el FVIII está presente a una concentración baja (por ejemplo, a concentración fisiológica). En un ejemplo, el FVIII está presente a una concentración de aproximadamente 0,005 U/ml a aproximadamente 1,0 U/ml, o de aproximadamente 0,01 U/ml a aproximadamente 0,5 U/ml, o de aproximadamente 0,01 U/ml a aproximadamente 0,3 U/ml, o de aproximadamente 0,01 U/ml a aproximadamente 0,2 U/ml o de aproximadamente 0,04 U/ml a aproximadamente 0,2 U/ml).

En un ejemplo, el compuesto muestra actividad aditiva con FVIII en un ensayo de generación de trombina cuando el FVIII está presente a una concentración de aproximadamente 0,01 U/ml a aproximadamente 0,5 U/ml, o de aproximadamente 0,05 U/ml a aproximadamente 0,2 U/ml. En otro ejemplo, el compuesto muestra actividad aditiva con FVIII en un ensayo ROTEM cuando FVIII está presente a una concentración de aproximadamente 0,01 U/ml a aproximadamente 0,5 U/ml, o de aproximadamente 0,05 U/ml a aproximadamente 0,1 U/ml.

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto está presente a una concentración suficiente para tener actividad aditiva con FVIII.

En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación está presente (por ejemplo, en la mezcla de ensayo usada para medir el efecto aditivo con FVIII) a una concentración de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 500 μ M, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μ M, de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 50 μ M, de aproximadamente 200 nM a aproximadamente 40 μ M, de aproximadamente 300 nM a aproximadamente 30 μ M, o de aproximadamente 400 nM a aproximadamente 20 μ M. En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación está presente a una concentración de aproximadamente 500 nM a aproximadamente 20 μ M, o de aproximadamente 1 μ M

a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 4 μM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 10 μM . En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación está presente a una concentración de 100 μM o menos, por ejemplo, 50 μM o menos, 40 μM o menos, 30 μM o menos, 20 μM o menos, 15 μM o menos, 10 μM o menos, o 5 μM o menos. En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto se ensaya *in vitro* y está presente en la mezcla de ensayo a una concentración de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 20 μM , de 1 μM a aproximadamente 10 μM , de 5 μM a aproximadamente 20 μM , o de aproximadamente 5 μM a aproximadamente 10 μM .

Un ensayo de generación de trombina o ROTEM ejemplar útil para medir la actividad aditiva (o sinérgica) entre el compuesto y FVIII, se describen en los ejemplos 3 y 4, respectivamente, de esta solicitud.

Efecto aditivo con FIX

En otras realizaciones, el compuesto de la presente divulgación no compite con FIX, sino que muestra al menos una actividad aditiva con FIX o FVIIa en al menos un ensayo adecuado. Los ensayos ejemplares se seleccionan de entre los ensayos de generación de trombina y los ensayos ROTEM (por ejemplo, los descritos en el presente documento en los ejemplos 3 y 4).

En un ejemplo, el compuesto muestra actividad aditiva con FIX (*es decir*, la actividad del compuesto no se inhibe ni se reduce por la presencia de FIX; o la actividad de FIX no se inhibe por la presencia del compuesto) cuando el FIX está presente a una baja concentración (por ejemplo, a concentración fisiológica). En un ejemplo, el FIX está presente a una concentración de aproximadamente 0,05 U/ml a aproximadamente 2,0 U/ml, o de aproximadamente 0,1 U/ml a aproximadamente 1,0 U/ml, o de aproximadamente 0,1 U/ml a aproximadamente 0,3 U/ml, o aproximadamente 0,25 U/ml. En un ejemplo, el FIX es FIX-Fc.

En un ejemplo, el compuesto muestra actividad aditiva con FIX (por ejemplo, FIX-Fc) en un ensayo de generación de trombina, por ejemplo, cuando el FIX está presente a una concentración de aproximadamente 0,1 U/ml a aproximadamente 0,3 U/ml, o aproximadamente 0,25 U/ml. En otro ejemplo, el compuesto muestra actividad aditiva con FIX en un ensayo ROTEM (por ejemplo, usando plasma deficiente en FIX), por ejemplo, cuando el FIX está presente a una concentración de aproximadamente 0,1 U/ml a aproximadamente 0,3 U/ml, o aproximadamente 0,25 U/ml (véase, por ejemplo, el ejemplo 12).

Efecto aditivo con FVIIa

En otras realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación no compite con FVIIa, sino que muestra al menos una actividad aditiva con FVIIa en al menos un ensayo adecuado. Los ensayos ejemplares se seleccionan de entre los ensayos de generación de trombina y los ensayos ROTEM (por ejemplo, los descritos en el presente documento en los ejemplos 3 y 4).

En un ejemplo, el compuesto muestra actividad aditiva con FVIIa (*es decir*, la actividad del compuesto no se inhibe ni se reduce por la presencia de FVIIa; o la actividad de FVIIa no se inhibe por la presencia del compuesto) cuando el FVIIa está presente a una baja concentración (por ejemplo, a concentración fisiológica). En un ejemplo, el FVIIa está presente en la mezcla de ensayo a una concentración de aproximadamente 1 U/ml a aproximadamente 50 U/ml, o de aproximadamente 1 U/ml a aproximadamente 30 U/ml, o de aproximadamente 5 U/ml a aproximadamente 25 U/ml, o de aproximadamente 10 U/ml a aproximadamente 22 U/ml. En un ejemplo, el FVIIa está unido a Fc.

En un ejemplo, el compuesto muestra actividad aditiva con FVIIa (por ejemplo, FVIIa-Fc) en un ensayo de generación de trombina, por ejemplo, cuando el FVIIa está presente a una concentración de aproximadamente 10 U/ml a aproximadamente 20 U/ml. En otro ejemplo, el compuesto muestra actividad aditiva con FVIIa en un ensayo ROTEM (por ejemplo, usando plasma deficiente en FVIII), por ejemplo, cuando el FVIIa está presente a una concentración de aproximadamente 10 U/ml a aproximadamente 20 U/ml, (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 12).

En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación está presente (por ejemplo, en la mezcla de ensayo usada para medir el efecto aditivo con FIX o FVIIa) a una concentración de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 500 μM , de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 50 μM , de aproximadamente 200 nM a aproximadamente 40 μM , de aproximadamente 300 nM a aproximadamente 30 μM , o de aproximadamente 400 nM a aproximadamente 20 μM . En otro ejemplo, el compuesto de la presente

- divulgación está presente a una concentración de aproximadamente 500 nM a aproximadamente 20 μ M, o de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 20 μ M, o de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 20 μ M, o de aproximadamente 4 μ M a aproximadamente 20 μ M, o de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 10 μ M. En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación está presente a una concentración de 100 μ M o menos, por ejemplo, 50 μ M o menos, 40 μ M o menos, 30 μ M o menos, 20 μ M o menos, 15 μ M o menos, 10 μ M o menos, o 5 μ M o menos. En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto se ensaya *in vitro* y está presente en la mezcla de ensayo a una concentración de aproximadamente 0,1 μ M a aproximadamente 100 μ M, de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 100 μ M, de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 50 μ M, de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 20 μ M, de 1 μ M a aproximadamente 10 μ M, de 1 μ M a aproximadamente 5 μ M, de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 3 μ M, o aproximadamente 2,5 μ M. En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto está presente a una concentración suficiente para tener actividad aditiva con FIX. En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto está presente a una concentración suficiente para tener actividad aditiva con FVIIa.
- 15 Debido a que los compuestos de la presente divulgación no compiten con FVIII, FIX y FVII, por ejemplo, con respecto a su capacidad para reducir el tiempo de coagulación o mejorar la formación de trombina, son adecuados para ser usados en terapia conjunta con cualquiera de estos factores de coagulación. En un ejemplo, el compuesto se usa en una terapia conjunta con FVIII. En otro ejemplo, el compuesto se usa en una terapia conjunta con FIX (por ejemplo, FIX-Fc). En otro ejemplo más, el compuesto se usa en terapia conjunta con FVIIa (por ejemplo, FVIIa-Fc).

Reemplazo de FVIII

- En diversas realizaciones, el compuesto de la presente divulgación induce la formación de trombina, por ejemplo, en un ensayo de generación de trombina adecuado en ausencia (o presencia de niveles muy bajos) de FVIII. En un ejemplo, el compuesto de la presente divulgación induce la formación de trombina en un ensayo de generación de trombina utilizando plasma deficiente en FVIII. En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación induce la formación de trombina en un ensayo de generación de trombina (por ejemplo, utilizando plasma deficiente en FVIII) con una actividad de generación de trombina comparable a un estándar de FVIII recombinante (rFVIII). En un ejemplo, el compuesto de la presente divulgación a una concentración de ensayo de aproximadamente 20 μ M muestra al menos tanta actividad de generación de trombina como aproximadamente 0,1 U/ml de rFVIII. En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación a una concentración de ensayo de aproximadamente 20 μ M muestra al menos tanta actividad de generación de trombina como aproximadamente 0,25 U/ml de rFVIII. En otro ejemplo más, el compuesto de la presente divulgación a una concentración de ensayo de aproximadamente 20 μ M muestra al menos tanta actividad de generación de trombina como aproximadamente 0,5 U/ml de rFVIII. En un ejemplo adicional, el compuesto de la presente divulgación a una concentración de ensayo de aproximadamente 20 μ M muestra al menos tanta actividad de generación de trombina como aproximadamente 0,5 U/ml de rFVIII. En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación a una concentración de ensayo de aproximadamente 20 μ M muestra al menos tanta actividad de generación de trombina como aproximadamente 0,5 U/ml de rFVIII. En el ejemplo 3 se describe un ensayo de generación de trombina (TGA) adecuado para medir las actividades anteriores.
- 40 Debido a que los compuestos de la presente divulgación mejoran la formación de trombina en ausencia de FVIII, son adecuados para ser usados en lugar de una terapia con FVIII o junto con la terapia con FVIII.

Unión a FIXa y FVIIa

- Los compuestos de la presente divulgación pueden unirse a FIXa o FVIIa solubles, por ejemplo, con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 300 nM o menos, por ejemplo, de aproximadamente 80 nM a aproximadamente 300 nM, o de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 250 nM (véase, por ejemplo, el ejemplo 8).
- 50 Inesperadamente, los inventores han descubierto que ciertos compuestos de la presente divulgación activan FIXa al interactuar con una región de la secuencia polipeptídica cerca de Tyr₁₇₇ (que también se puede denominar el bucle 170) (Tyr₁₇₇: numeración de quimotripsina de FIXa; corresponde a Tyr₃₄₅ cuando se usa numeración de FIX). Dado que se sabe que esta región de FIXa interactúa con FVIIIa, los compuestos de la presente divulgación pueden activar FIXa de manera similar a FVIII moviendo el bucle. En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto de la presente divulgación es capaz de interactuar con (por ejemplo, unirse a) un péptido, que incluye la secuencia de aminoácidos: MFCAG (SEQ ID NO: 1).
- 60 En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación es capaz de interactuar con (por ejemplo, unirse a) un

péptido, que incluye la secuencia de aminoácidos:
YNNMFCAGFHE (SEQ ID NO: 2).

- 5 En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación es capaz de interactuar con (por ejemplo, unirse a) un péptido, que incluye la secuencia de aminoácidos:
RSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQG (SEQ ID NO: 3),
o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos 20/26, al menos 21/26, al menos 22/26, al menos 23/26, al menos 24/26 o al menos 25/26 homología con la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, al menos 20, al menos 21, al menos 22,
10 al menos 23, al menos 24 o al menos 25 de los 26 aminoácidos son los que se muestran en la SEQ ID NO: 3, o no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2 o no más de 1 de los 26 aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 se reemplazan por otro aminoácido).

En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación es capaz de interactuar con una proteína FIXa en una región
15 correspondiente a la secuencia de aminoácidos:

MFCAG (SEQ ID NO: 1).

En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación es capaz de interactuar con una proteína FIXa en una región
20 correspondiente a la secuencia de aminoácidos:

YNNMFCAGFHE (SEQ ID NO: 2).

En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación es capaz de interactuar con una proteína FIXa en una región
25 correspondiente a la secuencia de aminoácidos:

- RSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQG (SEQ ID NO: 3),
o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos 20/26, al menos 21/26, al menos 22/26, al menos 23/26, al menos 24/26 o al menos 25/26 homología con la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, al menos 20, al menos 21, al menos 22,
30 al menos 23, al menos 24 o al menos 25 de los 26 aminoácidos son los que se muestran en la SEQ ID NO: 3, o no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2 o no más de 1 de los 26 aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 se reemplazan por otro aminoácido).

Existe una fuerte homología entre las proteasas en la cascada de coagulación, por ejemplo, FIX, FX, protrombina, FVII y proteína C. Una región de aminoácidos que mostró cambios en los niveles de HDX (aminoácidos FCAG) en FIXa se
35 conserva en estos péptidos, lo que indica que el compuesto de la invención puede interactuar potencialmente con al menos uno de estos factores de coagulación sanguínea distintos de FIXa. Por ejemplo, los compuestos de la presente divulgación pueden aumentar potencialmente la actividad catalítica de, por ejemplo, FVIIa, FXa o trombina además de FIXa. Por ejemplo, dadas las similitudes estructurales entre FIXa y FVIIa, los compuestos procoagulantes de la presente divulgación pueden emplear un mecanismo similar para aumentar las actividades catalíticas de FVIIa.

40 En un ejemplo, el compuesto de la presente divulgación tiene actividad procoagulante. Se apreciará que se dispone de diferentes ensayos para determinar la actividad procoagulante. En un ejemplo, el compuesto de la presente divulgación tiene actividad procoagulante cuando muestra actividad en al menos uno de: un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada modificado (aPTT *),
45 un ensayo de generación de trombina (TGA), y un ensayo de tromboelastometría rotacional (ROTEM), que se describen en el presente documento, por ejemplo, en los ejemplos 9, 3 y 4, respectivamente.

Un compuesto de la presente divulgación puede promover la coagulación en plasma agotado en FV, FVII, FVIII, FX, FXI o vWF. En un ejemplo, un compuesto de la presente divulgación promueve la generación de trombina y/o el
50 depósito de fibrina en plasma en el que FVIII está agotado o ausente. Este tipo de actividad se conoce como actividad FVIII de coagulación. Cuando el plasma proviene de un individuo que carece de FVIII o que tiene niveles reducidos de FVIII, la actividad se denomina típicamente actividad equivalente a FVIII. Cuando el plasma contiene inhibidores contra FVIII, la actividad se denomina típicamente inhibidor del FVIII que evita la actividad equivalente. Otras actividades procoagulantes incluyen actividad FV, actividad FVII, actividad FX y actividad FXI.

55 Los compuestos individuales pueden variar en su eficacia relativa entre diferentes tipos de ensayo. Por lo tanto, incluso si un compuesto parece tener una baja eficacia en un ensayo particular, sin embargo, puede poseer un nivel adecuadamente alto de actividad procoagulante en otro ensayo.

60 Otros ensayos adecuados útiles para determinar la actividad procoagulante incluyen los divulgados, por ejemplo, en

la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2010/0022445 de Scheifflinger and Dockal.

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, ciertos compuestos de la presente divulgación (por ejemplo, un compuesto enumerado en la tabla 1) inhiben la formación del complejo FIXa-AT catalizado por heparina (acelerado por heparina) cuando se compara con la formación del complejo FIXa-AT en ausencia del compuesto.

"FIXa-AT" es un complejo covalente y equimolar formado entre FIXa y antitrombina (AT). La antitrombina pertenece a la familia de inhibidores de la serpin y es un inhibidor fisiológico conocido de las proteasas de coagulación, por ejemplo FIXa. En la superficie del endotelio intacto, la AT interactúa con el sulfato de heparina y su velocidad de inhibición de la proteasa se acelera. (véase, por ejemplo, Johnson, D. J. D. et al, PNAS 2010, 107, 645-650; Yang L. et al, Journal of Biological Chemistry, 2002, 277, 50756-50760).

La formación del complejo FIXa-AT puede medirse, por ejemplo, como se describe en el presente documento en el ejemplo 11. En una realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de heparina a una concentración de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 200 nM. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de heparina a una concentración de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 150 nM. En una realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de aproximadamente 10 nM de heparina. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de aproximadamente 50 nM de heparina. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de aproximadamente 100 nM de heparina. En otra realización más, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de aproximadamente 150 nM de heparina.

En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide a una concentración de compuesto de aproximadamente 0,1 μ M a aproximadamente 100 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide a una concentración de compuesto de aproximadamente 0,5 μ M a aproximadamente 50 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide a una concentración de compuesto de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 20 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide a una concentración de compuesto de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 10 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide a una concentración de compuesto de aproximadamente 0,1 μ M, aproximadamente 0,5 μ M, aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 2 μ M, aproximadamente 3 μ M, aproximadamente 4 μ M, aproximadamente 5 μ M, aproximadamente 6 μ M, aproximadamente 7 μ M, aproximadamente 8 μ M, aproximadamente 9 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 12 μ M, aproximadamente 14 μ M, aproximadamente 16 μ M, aproximadamente 18 μ M o aproximadamente 20 μ M.

En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de heparina a una concentración de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 200 nM y a una concentración de compuesto de aproximadamente 0,1 μ M a aproximadamente 100 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de heparina a una concentración de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 150 nM y a una concentración de compuesto de aproximadamente 0,5 μ M a aproximadamente 50 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de heparina a una concentración de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 150 nM y a una concentración de compuesto de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 20 μ M.

En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de heparina a una concentración de aproximadamente 100 nM y a una concentración de compuesto de aproximadamente 1 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de aproximadamente 100 nM de heparina y a una concentración de compuesto de aproximadamente 2 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de aproximadamente 100 nM de heparina y a una concentración de compuesto de aproximadamente 3 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de aproximadamente 100 nM de heparina y a una concentración de compuesto de aproximadamente 4 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de aproximadamente 100 nM de heparina y a una concentración de compuesto de aproximadamente 5 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de aproximadamente 100 nM de heparina y a una concentración de compuesto de aproximadamente 6 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de aproximadamente 100 nM de heparina y a una concentración de compuesto de aproximadamente 7 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de aproximadamente 100 nM de heparina y a una concentración de compuesto de aproximadamente 8 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de aproximadamente 100 nM de heparina y a una concentración de compuesto de aproximadamente 9 μ M. En otra realización, la formación del complejo FIXa-AT se mide en presencia de aproximadamente 100 nM de heparina y a una concentración de compuesto de aproximadamente 10 μ M.

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formación del complejo FIXa-AT medida para un compuesto de la presente divulgación se inhibe entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 90 % en comparación con la formación del complejo en ausencia del compuesto. En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formación del complejo FIXa-AT medida para un compuesto de la presente divulgación se inhibe entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 80 % en comparación con la formación del complejo en ausencia del compuesto. En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formación del complejo FIXa-AT medida para un compuesto de la presente divulgación se inhibe entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 80 % en comparación con la formación del complejo en ausencia del compuesto.

En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formación del complejo FIXa-AT medida para un compuesto de la presente divulgación se inhibe en al menos aproximadamente el 5 % en comparación con la formación del complejo en ausencia del compuesto. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formación del complejo FIXa-AT se inhibe en al menos aproximadamente el 10 %. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formación del complejo FIXa-AT se inhibe en al menos aproximadamente el 20 %. En otro ejemplo más de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formación del complejo FIXa-AT se inhibe en al menos aproximadamente el 30 %. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formación del complejo FIXa-AT se inhibe en al menos aproximadamente el 40 %. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formación del complejo FIXa-AT se inhibe en al menos aproximadamente el 50 %. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formación del complejo FIXa-AT se inhibe en al menos aproximadamente el 60 %. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formación del complejo FIXa-AT se inhibe en al menos aproximadamente el 70 %. En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formación del complejo FIXa-AT se inhibe en al menos aproximadamente el 80 %.

En una realización, los compuestos de la presente divulgación pueden competir con la heparina para unirse a FIXa, y por lo tanto pueden considerarse antagonistas de heparina.

En una realización, los compuestos de la presente divulgación antagonizan el retraso en la coagulación del plasma causada por la heparina (por ejemplo, heparina de bajo peso molecular). En otro ejemplo, los compuestos de la presente divulgación se pueden usar como antídotos para las complicaciones hemorrágicas asociadas con la terapia con heparina. En otro ejemplo, los compuestos de la presente divulgación se pueden usar como antídotos para las complicaciones hemorrágicas asociadas con terapias antitrombóticas (por ejemplo, terapias antitrombóticas con SH y LMWH).

En un ejemplo, la invención proporciona un procedimiento para proporcionar un antídoto para la sobredosis de heparina (por ejemplo, heparina de bajo peso molecular) en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad efectiva de un compuesto de la presente divulgación, o una sal o solvato aceptable del mismo, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente divulgación.

Los ensayos para determinar la actividad neutralizante de heparina de un polímero u oligómero se describen en el presente documento o son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Kandrotas, R.J., Clin. Pharmacokinet. 22:359-374 (1992)), Diness, V.O., y Ostergaard, P.B., Thromb. Haemost. 56:318-322 (1986)), y las referencias citadas en este documento, Wong, P.C., et al., J. Pharm. Exp. Therap. 292:351-357 (2000), Ryn-McKenna, J.V., et al., Thromb. Haemost. 63:271-274 (1990) y Wakefield, T.W., et al., J. Surg. Res. 63:280-286 (1996).

Efecto sobre las plaquetas

En una realización, los compuestos de la presente divulgación no afectan a la función plaquetaria y no inducen la agregación plaquetaria como se muestra, por ejemplo, en el ejemplo 13.

Modelo animal

En un ejemplo, un compuesto de la presente divulgación puede compensar al menos parcialmente la ausencia de FVIII biológicamente activo cuando se administra en un modelo animal de hemofilia A humana grave. Por ejemplo, un compuesto puede ser activo para controlar el sangrado en ratones o perros con deficiencia de FVIII.

Un ensayo ejemplar para poner a prueba la capacidad de un compuesto o conjugado para controlar el sangrado es el ensayo de corte en la punta de la cola (véase, por ejemplo, Pan J, et al., Blood 2009;114:2802-2811). Los compuestos

o conjugados se administran a ratones en un vehículo adecuado, típicamente i.v., i.p. o s.c. Se pueden administrar diferentes dosis de cada péptido o derivado peptídico a diferentes grupos de ratones para determinar la dependencia de la dosis. En un ejemplo, los ratones a los que se les administró el compuesto o el conjugado tienen una pérdida de sangre en el ensayo de corte en la punta de la cola a los 62 minutos del corte en la punta de la cola de no más del 70 % de la pérdida de sangre de los ratones que recibieron el vehículo solo, más preferentemente no más del 60 % y de la forma más preferente no más del 50 % de la pérdida de sangre de los ratones a los que se administró el vehículo solo.

En otro ejemplo, la supervivencia de los ratones a los que se administró el compuesto o conjugado en el ensayo anterior es de al menos el 40 %, más preferentemente al menos el 60 % y de la forma más preferente al menos el 80 % a las 2 horas después del corte en la punta de la cola. Preferentemente, la supervivencia de los ratones a los que se administró el compuesto o conjugado en el ensayo de corte en la punta de la cola es al menos 20 %, más preferentemente al menos 30 % y de la forma más preferente al menos 40 % a las 24 horas después del corte en la punta de la cola.

Los compuestos ejemplares de la presente divulgación y sus actividades biológicas *in vitro* medidas usando un ensayo de generación de FXa se describen en el ejemplo 2.

Los compuestos ejemplares de la presente divulgación y sus actividades biológicas *in vitro* medidas usando un ensayo de generación de trombina se describen en el ejemplo 3.

En un ejemplo, el compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, el compuesto 5 o 6) tiene una estabilidad química mejorada en plasma humano (por ejemplo, en presencia de FIXa). Por ejemplo, el compuesto de la presente divulgación, después de la incubación de 30 minutos, 60 minutos o 120 minutos en plasma humano, es al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % estable. Una estabilidad del 100 % indica que no se ha producido una degradación detectable del compuesto durante el tiempo de incubación especificado en plasma humano. En un ejemplo, el compuesto es químicamente estable (por ejemplo, al menos aproximadamente el 90 % estable, o el 100 % estable) durante al menos aproximadamente 60 minutos cuando se incuba en plasma humano. En otro ejemplo, el compuesto es estable durante al menos aproximadamente 80 minutos cuando se incuba en plasma humano. En otro ejemplo más, el compuesto es estable durante al menos aproximadamente 100 minutos cuando se incuba en plasma humano. En un ejemplo adicional, el compuesto es estable durante al menos aproximadamente 120 minutos. Un ensayo adecuado para determinar la estabilidad en plasma humano se describe en el ejemplo 6.

En otro ejemplo, el compuesto de la presente divulgación tiene una solubilidad acuosa en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 y 25°C de al menos aproximadamente 25 µM, preferentemente al menos aproximadamente 60 µM, y de la forma más preferente al menos aproximadamente 100 µM.

Procedimientos de preparación de los compuestos

Los compuestos de la presente divulgación (por ejemplo, péptidos o derivados peptídicos) pueden producirse mediante síntesis química, tecnología de ADN recombinante, fragmentación bioquímica o enzimática de moléculas más grandes, combinaciones de las anteriores o mediante cualquier otro procedimiento.

En un ejemplo, el procedimiento comprende formar la secuencia de aminoácidos del compuesto, o una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa del mismo usando síntesis peptídica en fase sólida. Los procedimientos ejemplares de preparación de los compuestos de la invención se describen en el presente documento en el ejemplo 1. Otros procedimientos para forma péptidos son conocidos por los expertos en la materia.

Por ejemplo, los compuestos de la presente divulgación se pueden sintetizar usando síntesis peptídica en fase sólida como se describe en "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach", editado por WC Chan, PD White, Oxford University Press, Nueva York 2000 y referencias en este documento. La protección temporal del grupo N-amino se proporciona, por ejemplo, por un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). La escisión repetitiva de este grupo protector altamente lábil se efectúa, por ejemplo, usando piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida. Las funcionalidades de las cadenas laterales pueden protegerse como sus éteres butílicos (en el caso de serina, treonina y tirosina), ésteres butílicos (en el caso de ácido glutámico y ácido aspártico), derivado de butiloxycarbonilo (en el caso de lisina e histidina), derivado de tritilo (en el caso de cisteína, asparagina y glutamina) y derivado de 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo (en el caso de la arginina). El soporte en fase sólida se puede basar en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros dimetilacrilamida (esqueleto-monómero), bisacrililetilendiamina (reticulante) y acrililsarcosina metil éster (agente funcionalizante), o puede basarse en

polietilenglicol (PEG), tal como la resina Rink Amide (por ejemplo, NovaPEG Rink Amide). El agente enlazado escindible de péptido a resina puede ser el derivado del ácido 4-hidroximetil-fenoxiacético lábil en ácido, o en el caso de las amidas C-terminales, el enlazador Rink-amida. Todos los derivados de aminoácidos se pueden añadir como sus derivados de anhídrido simétrico preformados con la excepción de asparagina y glutamina, que se añaden usando un procedimiento de acoplamiento mediado por N,N-diciclohexil-carbodiimida/1-hidroxibenzotriazol invertido. Como alternativa, se pueden usar otros reactivos de acoplamiento a péptidos, tales como hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) o hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1-H-benzotriazol-1-il))-1,1,3,3-tetrametilaminio (HCTU) (por ejemplo, *in situ*). Las reacciones de acoplamiento y desprotección se pueden controlar usando ninhidrina, ácido trinitrobencenosulfónico o procedimientos de ensayo de isotina. Al completarse la síntesis, los péptidos se escinden del soporte de resina con la eliminación concomitante de los grupos protectores de la cadena lateral, por ejemplo, mediante tratamiento con ácido trifluoroacético al 95 % que contiene aproximadamente 5-50 % de eliminador. Los eliminadores comúnmente usados son TIPS (triisopropilsilano), etanoditiol, fenol, agua de anisol y mezclas de los mismos. La elección exacta depende de los aminoácidos constituyentes del péptido que se sintetiza. Para los péptidos que contienen metionina, se puede usar, por ejemplo, una mezcla de TIPS (por ejemplo, 2-5 %) y etanoditiol (por ejemplo, 2-5 %).

El ácido trifluoroacético puede eliminarse posteriormente por evaporación en vacío, con la posterior trituración con éter dietílico que produce el péptido en bruto. Cualquier eliminador presente puede eliminarse mediante un simple procedimiento de extracción que, en la liofilización de la fase acuosa, proporciona el péptido en bruto libre de eliminadores.

Los reactivos para la síntesis peptídica están generalmente disponibles, por ejemplo, de Calbiochem-Novabiochem (UK), o EMD4Biosciences (EE.UU.).

La purificación de los péptidos puede efectuarse mediante una cualquiera, o una combinación de, técnicas tales como cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, solubilidad diferencial y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa. El análisis de péptidos se puede llevar a cabo usando cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, espectroscopia de masas (por ejemplo, LC-MS), análisis de aminoácidos después de hidrólisis ácida y espectrometría de masas mediante bombardeo con átomos rápidos (FAB).

También se puede usar la síntesis SPOT, que permite la síntesis química direccionable posicional de péptidos en membranas de celulosa continuas (véase, por ejemplo, R. Frank, Tetrahedron (1992) 48, 9217).

Los compuestos de la presente divulgación también pueden producirse mediante la expresión de proteínas recombinantes o sistemas de traducción *in vitro* (véase, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular cloning: A laboratory manual", 2001, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Los procedimientos recombinantes son generalmente preferidos cuando el péptido es particularmente grande, por ejemplo, mayor que 50 aminoácidos, o mayor que 100 aminoácidos.

Procedimientos de preparación de los conjugados polipeptídicos

Los conjugados de la presente divulgación se pueden preparar de forma recombinante, véase, por ejemplo, los procedimientos para la expresión y purificación de FVIII-Fc descritos en el documento WO2011/069164.

Por ejemplo, el vector o vectores de expresión adecuados se transfectan o cotransfectan en una célula diana adecuada, que expresará los polipéptidos. Las técnicas de transfección conocidas en la técnica incluyen, pero sin limitarse a, precipitación con fosfato de calcio (Wigler et al. (1978) Cell 14:725), electroporación (Neumann et al. (1982) EMBO J 1:841) y reactivos a base de liposomas. Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión del huésped para expresar las proteínas descritas en el presente documento que incluyen tanto células procariotas como eucariotas. Estos incluyen, pero sin limitarse a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante o vectores de expresión de ADN plasmídico que contienen una secuencia codificante apropiada; levaduras u hongos filamentosos transformados con vectores de expresión de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor o virus del mosaico del tabaco) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contienen una secuencia codificante apropiada; o sistemas de células animales, que incluyen células de mamíferos (por ejemplo, células HEK 293, CHO, Cos, HeLa, HKB11 y BHK).

En una realización, la célula huésped es una célula eucariota. Como se usa en el presente documento, una célula eucariota se refiere a cualquier célula animal o vegetal que tiene un núcleo definitivo. Las células eucariotas de animales incluyen células de vertebrados, por ejemplo, mamíferos, y células de invertebrados, por ejemplo, insectos.

- 5 Las células eucariotas de plantas específicamente pueden incluir, sin limitación, células de levadura. Una célula eucariota es distinta de una célula procariota, por ejemplo, una bacteria.

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

- En otro ejemplo, los conjugados de la presente divulgación se pueden preparar de manera semi-recombinante, por ejemplo, como se ilustra en las figuras 23-26 (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 7.381.408 de Mezo, A.R. y Peters, R. P.; Dawson, P.E., Kent, S.B. *Ann. Rev. Biochem.* (2000) 69: 923-9600; Mei, B. et. al., *Blood* (2010) 116:270-279; y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. US2006/0115876 de Pan, C. et. al., cada una de las cuales se incorpora en el presente documento en su totalidad). En un ejemplo, el polipéptido o la construcción polipeptídica que contiene un resto de aminoácido adecuado se fabrica de forma recombinante. El compuesto procoagulante se une después al polipéptido o construcción polipeptídica mediante ligamiento químico como se describe en el presente documento.

- 30 La figura 23 ilustra un procedimiento general para unir covalentemente un péptido o un derivado peptídico a un FVIII-Fc, un FIX-Fc o una construcción FVIIa-Fc, usando una estrategia de ligamiento nativo (véase, por ejemplo, Mezo, A.R.; Peters, R. P., *Methods for Chemically Synthesizing Immunoglobulin Chimeric Proteins*, patente de EE. UU. 7.381.408; y Dawson, P.E., Kent, S.B. *Synthesis of native proteins by chemical ligation*. *Ann. Rev. Biochem.* (2000) 69: 923-9600). Un procedimiento ejemplar incluye poner en contacto una construcción FVIII-Fc (por ejemplo, una construcción truncada FVIII-Fc) que tiene un grupo sulfhidrilo libre ubicado en la parte Fc de la construcción (por ejemplo, que tiene una cisteína N-terminal) con un péptido o derivado peptídico que tiene un grupo reactivo seleccionado de entre un resto tioéster, un resto maleimida y un resto yodoacetamida, en condiciones de reacción suficientes para formar un enlace covalente entre el péptido o derivado peptídico y la construcción FVIII-Fc. El FVIII en la construcción FVIII-Fc se puede reemplazar por FIX o FVIIa, y la construcción resultante se puede ligar a un péptido o derivado peptídico de la misma manera.

- La figura 24 ilustra un procedimiento general para unir covalentemente un péptido o un derivado peptídico a una construcción FVIII-Fc, una construcción FIX-Fc o una construcción FVIIa-Fc usando una estrategia de ligamiento dirigido al sitio (véase, por ejemplo, Mei, B. et. al. *Rational design of a fully active, long-acting PEGylated FVIII for hemophilia A treatment*. *Blood* (2010) 116:270-279; y Pan, C. et. al. *Site-directed modification of FVIII*. publicación de solicitud de patente de EE. UU. US2006/0115876). Esta estrategia de unión también es útil para la preparación de conjugados de FVIII, en los que el péptido o el derivado peptídico está unido a FVIII en lugar de una construcción FVIII-Fc. Un procedimiento ejemplar incluye poner en contacto el FVIII que tiene un grupo sulfhidrilo libre (por ejemplo, una cisteína interna) o una construcción FVIII-Fc que tiene un grupo sulfhidrilo libre ubicado en la parte de FVIII de la construcción (por ejemplo, una cisteína interna) con un péptido o derivado peptídico que tiene un grupo reactivo (por ejemplo, un resto maleimida o yodoacetamida), en condiciones de reacción suficientes para formar un enlace covalente entre el péptido o derivado peptídico y el FVIII o la construcción FVIII-Fc. Esta estrategia de enlace también es útil para la preparación de conjugados de FIX o FVIIa mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente para FVIII. Los expertos en la materia conocen otros reactivos útiles para formar un enlace covalente entre un grupo sulfhidrilo y otro resto.

- La figura 25 ilustra un procedimiento general para unir covalentemente un péptido o un derivado peptídico a una construcción de resto de direccionamiento a plaquetas-Fc, usando una estrategia de ligamiento nativo (véase, por ejemplo, Mezo, A.R.; Peters, R. P., *Methods for Chemically Synthesizing Immunoglobulin Chimeric Proteins*, patente
60

de EE. UU. 7.381.408; y Dawson, P.E., Kent, S.B. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Ann. Rev. Biochem.* (2000) 69: 923-9600). Un procedimiento ejemplar incluye poner en contacto una construcción resto de direccionamiento a plaquetas-Fc (por ejemplo, una construcción truncada resto de direccionamiento a plaquetas-Fc) que tiene un grupo sulfhidrilo libre ubicado en la parte Fc de la construcción (por ejemplo, que tiene una cisteína N-terminal) con un péptido o derivado peptídico que tiene un grupo reactivo seleccionado de entre un resto tioéster, un resto maleimida y un resto yodoacetamida, en condiciones de reacción suficientes para formar un enlace covalente entre el péptido o derivado peptídico y la construcción resto de direccionamiento a plaquetas-Fc.

La figura 26 ilustra un procedimiento general para unir covalentemente un péptido o un derivado peptídico a una construcción una construcción resto de direccionamiento a plaquetas-Fc usando una estrategia de ligamiento dirigido al sitio (véase, por ejemplo, Mei, B. et. al. Rational design of a fully active, long-acting PEGylated FVIII for hemophilia A treatment. *Blood* (2010) 116:270-279; y Pan, C. et. al. Site-directed modification of FVIII. publicación de solicitud de patente de EE. UU.US2006/0115876). Esta estrategia de unión también es útil para la preparación de conjugados de resto de direccionamiento a plaquetas, en los que el péptido o el derivado peptídico está unido al resto de direccionamiento a plaquetas en lugar de una construcción resto de direccionamiento a plaquetas-Fc. Un procedimiento ejemplar incluye poner en contacto el resto de direccionamiento a plaquetas que tiene un grupo sulfhidrilo libre (por ejemplo, una cisteína interna) o una construcción resto de direccionamiento a plaquetas-Fc que tiene un grupo sulfhidrilo libre ubicado en la parte de resto de direccionamiento a plaquetas de la construcción (por ejemplo, una cisteína interna) con un péptido o derivado peptídico que tiene un grupo reactivo (por ejemplo, un resto maleimida o yodoacetamida), en condiciones de reacción suficientes para formar un enlace covalente entre el péptido o derivado peptídico y el resto de direccionamiento a plaquetas o la construcción resto de direccionamiento a plaquetas-Fc. Los expertos en la materia conocen otros reactivos útiles para formar un enlace covalente entre un grupo sulfhidrilo y otro resto (véase, por ejemplo, patente de EE. UU. 7.381.408).

25 **Formulaciones farmacéuticas**

La invención también proporciona una composición farmacéutica (también denominada formulación farmacéutica) que contiene al menos un compuesto de la presente divulgación de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que contiene al menos un conjugado de la presente divulgación de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" significa todos los ingredientes farmacéuticamente aceptables conocidos por los expertos en la materia, que típicamente se consideran ingredientes no activos. El término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye, por ejemplo, disolventes, diluyentes sólidos o líquidos, aditivos, vehículos, adyuvantes, excipientes, deslizantes, aglutinantes, agentes de granulación, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes humectantes, agentes lubricantes, disgregantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes, emulsionantes, cargas, conservantes (por ejemplo, antioxidantes), agentes aromatizantes, agentes edulcorantes, agentes espesantes, agentes tamponantes, agentes colorantes y similares, así como cualquier mezcla de los mismos. Los portadores ejemplares (es decir, excipientes) se describen en, por ejemplo, *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulation*, Volúmenes 1-6, Niazi, Sarfaraz K., Taylor & Francis Group 2005. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, uno o más de agua, tampones (por ejemplo, solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), etanol, aceite mineral, aceite vegetal, dimetilsulfóxido, carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, adyuvantes, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión y/o conservantes.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para cualquier forma de administración adecuada incluyendo, por ejemplo, administración tópica (por ejemplo, transdérmica u ocular), oral, bucal, nasal, vaginal, rectal o parenteral. En algunas realizaciones, el compuesto o conjugado de la presente divulgación se administra por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa o subcutánea.

El término parenteral como se usa en el presente documento incluye inyección subcutánea, intradérmica, intravascular (p, ej., intravenosa), intramuscular, espinal, intracraneal, intratecal, intraocular, periocular, intraorbital, intrasinoval e intraperitoneal, así como cualquier técnica de inyección o infusión similar. Se prefiere que las formulaciones subcutáneas, intraperitoneales, bucales, intravenosas y otras parenterales sean estériles y libres de endotoxinas.

Los compuestos o conjugados de la presente divulgación pueden administrarse por vía parenteral en un medio estéril. El compuesto o el conjugado, dependiendo del vehículo y la concentración usados, pueden suspenderse o disolverse en el vehículo. En una realización, los adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes

tamponantes pueden disolverse en el vehículo.

En un ejemplo, los compuestos de la presente divulgación se administran al sujeto usando una vía no intravenosa, por ejemplo, por administración subcutánea, nasal, bucal, oral o pulmonar.

5

Las formas adecuadas para uso oral incluyen, por ejemplo, comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden formularse como un liofilizado.

- 10 Las composiciones destinadas a uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier procedimiento conocido para la fabricación de composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones pueden contener uno o más agentes elegidos de entre el grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y sabrosas. Los comprimidos contienen el principio activo en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para
- 15 la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y agentes disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o goma arábiga y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas. En algunos casos, dichos recubrimientos pueden
- 20 prepararse mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, proporcionar una acción sostenida durante un período más largo (es decir, los comprimidos pueden estar recubiertos entéricamente). Por ejemplo, se puede utilizar un material retardador de tiempo como glicerol monoestearato o glicerol diestearato.
- 25 Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura, donde el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolina, o como cápsulas de gelatina blanda, donde el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. En otro ejemplo, el principio activo se formula en cápsulas que contienen microcomprimidos o microgránulos recubiertos opcionalmente. Las formulaciones para uso oral también pueden
- 30 presentarse como pastillas para chupar. La composición también puede ser, por ejemplo, una suspensión, emulsión, formulación de liberación sostenida, crema, gel o polvo. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos.

- Las suspensiones aceitosas se pueden formular mediante la suspensión del principio activo en un aceite vegetal, por
- 35 ejemplo aceite de arachis, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes y saborizantes para proporcionar preparaciones orales sabrosas. Estas composiciones se pueden preservar mediante la adición de un antioxidante como ácido ascórbico.
- 40 En un ejemplo, la formulación farmacéutica es una formulación líquida, por ejemplo, una solución tamponada, isotónica, acuosa. En un ejemplo, la composición farmacéutica tiene un pH que es fisiológico, o casi fisiológico. En otro ejemplo, la formulación acuosa tiene una osmolaridad y salinidad fisiológica o casi fisiológica. Puede contener cloruro sódico y/o acetato sódico.

- 45 Las suspensiones acuosas contienen el o los principios activos mezclados con excipientes adecuados para la elaboración de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen agentes de suspensión (por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga); y agentes dispersantes o humectantes (por ejemplo, fosfátidos naturales tales como lecitina, productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos tales como estearato de polioxietileno,
- 50 productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, tales como heptadecaetileno oxiacetanol, productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol tales como monooleato de polietileno sorbitán). Las suspensiones acuosas también pueden comprender uno o más conservantes, por ejemplo etilo, o n-propilo, p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.
- 55

- Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua pueden proporcionar el principio activo en una mezcla con un agente de dispersión o humectante, agente de
- 60 suspensión y uno o más conservantes. Agentes dispersantes o humectantes o agentes de suspensión adecuados se

ejemplifican mediante los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o mezclas de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo, goma arábica o goma tragacanto, fosfatidos de origen natural, por ejemplo, soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietileno sorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol, glucosa o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante, un agente saborizante o un agente colorante. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando aquellos agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, la solución de Ringer y la solución de cloruro sódico isotónica. Además, convencionalmente, se emplean aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Con esta finalidad, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

Los compuestos de la presente divulgación también pueden administrarse en forma de supositorios, por ejemplo, para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ordinaria, pero líquido a la temperatura rectal, y, por lo tanto, se derretirá en el recto para liberar el fármaco. Entre tales materiales se incluyen manteca de cacao y polietilenglicoles.

Los compuestos de la presente divulgación pueden formularse para administración local o tópica, tal como para aplicación tópica en la piel, heridas o membranas mucosas, tal como en el ojo. Las formulaciones para administración tópica típicamente comprenden un vehículo tópico combinado con uno o más agentes activos, con o sin componentes opcionales adicionales. Los vehículos tópicos adecuados y los componentes adicionales son bien conocidos en la técnica, y será evidente que la elección de un vehículo dependerá de la forma física y la vía de administración particulares. Los vehículos tópicos incluyen agua; disolventes orgánicos tales como alcoholes (por ejemplo, etanol o alcohol isopropílico) o glicerina; glicoles (por ejemplo, butileno, isopreno o propilenglicol); alcoholes alifáticos (por ejemplo, lanolina); mezclas de agua y disolventes orgánicos y mezclas de disolventes orgánicos tales como alcohol y glicerina; materiales a base de lípidos como ácidos grasos, acilgliceroles (incluyendo aceites, tales como aceites minerales y grasas de origen natural o sintético), fosfoglicéridos, esfingolípidos y ceras; materiales a base de proteínas tales como colágeno y gelatina; materiales a base de silicona (no volátiles y volátiles); y materiales a base de hidrocarburos tales como microesponjas y matrices poliméricas. Una composición puede incluir además uno o más componentes adaptados para mejorar la estabilidad o efectividad de la formulación aplicada, tales como agentes estabilizantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, ajustadores de viscosidad, agentes gelificantes, conservantes, antioxidantes, mejoradores de la penetración en la piel, humectantes y materiales de liberación sostenida. Ejemplos de dichos componentes se describen en Martindale--The Extra Pharmacopoeia (Pharmaceutical Press, Londres 1993) y Martin (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences. Las formulaciones pueden comprender microcápsulas, tales como microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas o nanocápsulas.

Para trastornos del ojo u otros tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, las formulaciones se aplican, por ejemplo, como un gel tópico, spray, pomada o crema, o como un supositorio escleral, que contiene los principios activos en una cantidad total de, por ejemplo, el 0,075 al 30 % p/p, el 0,2 al 20 % p/p o tal como el 0,4 al 15 % p/p. Cuando se formulan en una pomada, los principios activos se pueden emplear con una base de pomada parafínica o miscible en agua.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en el ojo también incluyen colirios donde los principios activos se disuelven o suspenden en un portador adecuado, especialmente un disolvente acuoso para los principios activos. Los principios activos antiinflamatorios pueden, por ejemplo, estar presentes en dichas formulaciones en una concentración del 0,5 al 20 %, tal como del 0,5 al 10 %, por ejemplo aproximadamente el 1,5 % p/p. Para fines terapéuticos, los compuestos activos de la presente divulgación se combinan normalmente con uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración indicada. Los compuestos pueden mezclarse con lactosa, sacarosa, almidón en polvo, ésteres de celulosa de ácidos alcanóicos, alquilésteres de celulosa, talco, ácido esteárico, estearato de

- magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfóricos y sulfúricos, gelatina, goma arábiga, alginato de sodio, polivinilpirrolidona y/o alcohol polivinílico, y después comprimirse o encapsularse para una administración conveniente. Dichas cápsulas o comprimidos pueden contener una formulación de liberación controlada que se puede proporcionar en una dispersión de compuesto activo en hidroxipropilmetilcelulosa. Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en forma de soluciones o suspensiones para inyección estériles isotónicas acuosas o no acuosas. Estas soluciones y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos o gránulos estériles que tienen uno o más de los portadores o diluyentes mencionados para uso en las formulaciones para administración oral. Los compuestos pueden disolverse en agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, alcohol bencílico, cloruro de sodio y/o diversos tampones.
- 10 Otros adyuvantes y vías de administración son bien conocidos en la técnica farmacéutica.

- Como alternativa, los principios activos pueden formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos el 30 % p/p de un alcohol polihídrico tal como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol, polietilenglicol y mezclas de los mismos.
- 15 La formulación tópica puede incluir deseablemente un compuesto, que mejora la absorción o penetración del principio activo a través de la piel u otras zonas afectadas. Los ejemplos de dichos potenciadores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados. Los compuestos de la presente divulgación también pueden administrarse mediante un dispositivo transdérmico. En una realización, la administración tópica se logrará usando un parche del tipo depósito y membrana porosa, o de una diversidad de matriz sólida. En cualquier caso, el agente activo se administra de manera continua desde el reservorio o microcápsulas a través de una membrana al adhesivo permeable al agente activo, que está en contacto con la piel o la mucosa del receptor. Si el agente activo se absorbe a través de la piel, se administra al receptor un flujo controlado y predeterminado del agente activo. En el caso de las microcápsulas, el agente de encapsulación también puede funcionar como la membrana. El parche transdérmico puede incluir el compuesto en un sistema disolvente adecuado con un sistema adhesivo, tal como una emulsión acrílica
- 20 y un parche de poliéster. La fase oleosa de las emulsiones de la presente divulgación puede estar constituida por ingredientes conocidos de una manera conocida. Aunque la fase puede comprender simplemente un emulsionante, puede comprender una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o aceite o con una grasa y un aceite. En una realización, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo, que actúa como un estabilizante. La fase puede, por ejemplo, incluir tanto un aceite como una grasa. Juntos, el o los emulsionantes con o sin uno o varios estabilizantes forman la llamada cera emulsionante, y la cera, junto con el aceite y la grasa, forman la llamada base de pomada emulsionante, que forma la fase oleosa dispersa de las formulaciones en crema. Los emulsionantes y los estabilizantes de emulsión adecuados para su uso en la formulación de la presente divulgación incluyen Tween 60, Span 80, alcohol cetosteárilico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio, entre otros. La elección de aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en lograr las propiedades
- 35 cosméticas deseadas, ya que la solubilidad del compuesto activo en la mayoría de los aceites que probablemente se usarán en formulaciones de emulsión farmacéutica es muy baja. Por lo tanto, la crema puede ser, por ejemplo, un producto no graso, que no mancha y lavable con una consistencia adecuada para evitar fugas de los tubos u otros recipientes. Se puede usar ésteres alquílicos mono o dibásicos de cadena lineal o ramificada, tales como di-isoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada. Estos pueden usarse solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Como alternativa, se pueden usar lípidos de alto punto de fusión tales como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.
- 45 Una composición farmacéutica puede formularse como formulaciones inhaladas, que incluyen sprays, nieblas o aerosoles. Para formulaciones para inhalación, los compuestos proporcionados en el presente documento pueden administrarse mediante cualquier procedimiento de inhalación conocido por los expertos en la materia. Dichos procedimientos y dispositivos de inhalación incluyen, pero no sin limitarse a, inhaladores de dosis medida con propelentes tales como CFC o HFA o propelentes que son fisiológicamente y ambientalmente aceptables. Otros dispositivos adecuados son los inhaladores de respiración, los inhaladores de polvo seco multidosis y los nebulizadores en aerosol. Las formulaciones de aerosol para uso en el procedimiento en cuestión típicamente incluyen propelentes, tensioactivos y co-disolventes y pueden cargarse en recipientes de aerosol convencionales que están cerrados por una válvula dosificadora adecuada.

- 55 Las formulaciones adecuadas para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se ha descrito anteriormente. Las composiciones pueden administrarse por vía oral o nasal por efecto local o sistémico. Las composiciones se pueden nebulizar mediante el uso de gases inertes o vaporizarse, y respirar directamente desde el dispositivo de nebulización/vaporización o el dispositivo de nebulización se puede unir a una cubierta protectora de máscara o una
- 60

máquina de respiración de presión positiva intermitente.

Las composiciones inhalantes pueden comprender composiciones líquidas o en polvo que contienen el principio activo que son adecuadas para nebulización y uso intrabronquial, o composiciones en aerosol administradas a través de una unidad de aerosol que administra dosis medidas. Las composiciones líquidas adecuadas comprenden el principio activo en un disolvente inhalante acuoso, farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, solución salina isotónica o agua bacteriostática. Las soluciones se administran por medio de una bomba o un dispensador de spray nebulizado accionado por compresión, o por cualquier otro medio convencional para provocar o permitir que la cantidad de dosificación requerida de la composición líquida se inhale en los pulmones del paciente. Las formulaciones adecuadas, en las que el portador es un líquido, para administración, como por ejemplo, un spray nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del principio activo.

Las formulaciones o composiciones adecuadas para administración nasal, en las que el portador es un sólido, incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrones que se administra de la manera en que se administra el tabaco (es decir, por inhalación rápida a través de la fosa nasal desde un recipiente con el polvo que se mantiene cerca de la nariz). Las composiciones en polvo adecuadas incluyen, a modo de ilustración, preparaciones en polvo del principio activo completamente mezcladas con lactosa u otros polvos inertes aceptables para la administración intrabronquial. Las composiciones en polvo pueden administrarse a través de un dispensador de aerosol o encerradas en una cápsula rompible que el paciente puede insertar en un dispositivo que pincha la cápsula y expulsa el polvo en una corriente constante adecuada para inhalación.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse como formulaciones de liberación sostenida (es decir, una formulación tal como una cápsula que efectúa una liberación lenta del modulador después de la administración). Dichas formulaciones pueden prepararse generalmente usando tecnología bien conocida y administrarse mediante, por ejemplo, implantes orales, rectales o subcutáneos, o mediante implantes en el sitio diana deseado. Los portadores para uso dentro de tales formulaciones son biocompatibles, y también pueden ser biodegradables; preferentemente, la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación de modulador. La cantidad de modulador contenida dentro de una formulación de liberación sostenida depende, por ejemplo, del sitio de implantación, la velocidad y la duración esperada de la liberación y la naturaleza de la afección a tratar o prevenir.

En un ejemplo, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden incluir uno o más agentes activos adicionales (es decir, otro principio biológicamente activo). En un ejemplo, el agente activo adicional se selecciona de entre fármacos conocidos aprobados para el tratamiento de un trastorno de la coagulación, tal como la hemofilia A. Por ejemplo, la formulación farmacéutica puede incluir además un factor de coagulación sanguínea.

En otro ejemplo, la formulación farmacéutica contiene además un factor de coagulación sanguínea seleccionado de entre FVIII y FIX. En otro ejemplo, la formulación farmacéutica incluye además FVIII. En otro ejemplo, la formulación farmacéutica incluye además FIX. En otro ejemplo, la formulación farmacéutica incluye desmopresina (DDVAP).

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con un agente para mejorar la biodisponibilidad, tal como un disolvente orgánico. Por ejemplo, Cremophor EL.RTM. (N.º de producto 00647/1/63; BASF Aktiengesellschaft, Alemania) es un aceite de ricino polietoxilado que se prepara haciendo reaccionar 35 moles de óxido de etileno con cada mol de aceite de ricino. Puede usarse para estabilizar emulsiones de materiales no polares en sistemas acuosos. Como alternativa, el péptido, el derivado peptídico o el péptido dual pueden incorporarse dentro o unirse a una micropartícula o nanopartícula proteica para mejorar la biodisponibilidad. Las micropartículas y las nanopartículas adecuadas se describen en la patente de EE.UU. N.º 5.439.686 (Desai et al; Vivorx Pharmaceuticals, Inc., CA) y la patente de EE.UU. N.º 5.498.421 (Grinstaff et al; Vivorx Pharmaceuticals, Inc., CA). Adecuadamente, la nanopartícula proteica comprende albúmina de suero humano, particularmente albúmina de suero humano o una forma recombinante de la misma. El documento WO 2007/077561 (Gabbai; Do-Coop Technologies Ltd., Israel) describe otro portador adecuado que comprende nanoestructuras y un líquido, denominado en este documento Neowater.TM.

Para uso veterinario, un compuesto de la presente divulgación se administra como una formulación adecuadamente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosificación y la vía de administración que será más apropiada para un animal en particular. Para la administración a animales no humanos, la composición se puede añadir al alimento para animales o al agua potable. Puede ser conveniente formular las composiciones de alimento para animales y agua potable para que el animal tome una cantidad terapéuticamente apropiada de la composición junto con su dieta. También puede ser conveniente presentar la composición como una premezcla para adición al alimento o al agua potable.

60 **Procedimientos**

La invención proporciona además un procedimiento *in vitro* para aumentar/mejorar la actividad catalítica (kcat) de un factor de coagulación sanguínea (es decir, activar el factor de coagulación sanguínea). Un procedimiento ejemplar incluye poner en contacto el factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, FIXa o FVIIa) con un compuesto de la presente divulgación de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores. En un ejemplo, el factor de coagulación sanguínea útil en este procedimiento incluye la secuencia de aminoácidos: MFCAG (SEQ ID NO: 1) (por ejemplo, FIXa, FXa, FVIIa y trombina). En un ejemplo, el factor de coagulación sanguínea que está siendo activado es FXa. En otro ejemplo, el factor de coagulación sanguínea que está siendo activado es trombina.

10 La invención proporciona además un procedimiento para aumentar/mejorar la actividad catalítica (kcat) de FIXa (es decir, *in vitro*), el procedimiento incluye poner en contacto el FIXa con un compuesto de la presente divulgación de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores.

La invención proporciona además un procedimiento para aumentar/mejorar la actividad catalítica (kcat) de FVIIa (es decir, *in vitro*), el procedimiento incluye poner en contacto el FVIIa con un compuesto de la presente divulgación de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores.

En un ejemplo, de acuerdo con el procedimiento anterior, el compuesto interactúa con el factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, se une al factor de coagulación sanguínea) en una región correspondiente a la secuencia de aminoácidos: MFCAG (SEQ ID NO: 1).

En un ejemplo adicional, el factor de coagulación sanguínea que siendo activado es FIXa (por ejemplo, FIXa humano o canino). En un ejemplo de acuerdo con esta realización, el compuesto de la presente divulgación interactúa con el FIXa en una región correspondiente a la secuencia de aminoácidos: YNNMFCAGFHE (SEQ ID NO: 2). En otro ejemplo más, el compuesto de la presente divulgación interactúa con el FIXa en una región correspondiente a la secuencia de aminoácidos: RSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQG (SEQ ID NO: 3).

En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el procedimiento es un procedimiento *in vitro* que implica medir la conversión de FX en FXa. Dicho procedimiento también se denomina generalmente un "ensayo de generación FXa". Un ensayo de generación de FXa ejemplar se describe en el ejemplo 2.

En una realización, el compuesto se usa en un sistema de ensayo *in vitro* útil para la identificación de otros compuestos candidatos con actividad procoagulante (por ejemplo, un ensayo de competencia). En un ejemplo, el compuesto de la presente divulgación se usa como un compuesto de referencia en dicho sistema de ensayo. En otro ejemplo, el compuesto se usa en un experimento de competencia de unión como una sonda. En un ejemplo, el compuesto de la presente divulgación se usa como una sonda para medir la unión de un compuesto candidato a un polipéptido (por ejemplo, FIXa, FVIIa o péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3). Para este fin, el compuesto de la presente divulgación se puede unir a una molécula de detección, tal como un anticuerpo (por ejemplo, ensayo ELISA), biotina, una molécula fluorescente, una partícula de fago (por ejemplo, ensayo de competencia de presentación en fagos), y similares.

La divulgación proporciona además un procedimiento (por ejemplo, un procedimiento *in vitro* o *in vivo*) para identificar un compuesto candidato (por ejemplo, un compuesto candidato con actividad procoagulante) (por ejemplo, dentro de un procedimiento de cribado para la identificación de compuestos con actividad procoagulante), comprendiendo el procedimiento poner en contacto un péptido o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3 con un compuesto de la presente divulgación de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores.

Procedimientos farmacéuticos

50 La presente divulgación proporciona además procedimientos para tratar la diátesis hemorrágica en un sujeto mamífero (por ejemplo, un paciente humano) usando los compuestos o conjugados o la presente divulgación.

Procedimiento farmacéutico 1

55 En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar la diátesis hemorrágica en un sujeto mamífero (por ejemplo, un paciente humano), que comprende: administrar al sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la presente divulgación o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente divulgación.

60 En algunos aspectos del procedimiento farmacéutico 1, el compuesto o la composición farmacéutica que contiene el

compuesto se administra al sujeto por vía oral. En otras realizaciones, el compuesto o la composición farmacéutica que contiene el compuesto se administra al sujeto por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa o subcutánea.

Procedimiento farmacéutico 2

- 5 En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar la diátesis hemorrágica en un sujeto mamífero (por ejemplo, un paciente humano), que comprende: administrar al sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de la presente divulgación o una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la presente divulgación.
- 10 En algunos aspectos del procedimiento farmacéutico 2, el conjugado o la composición farmacéutica que comprende el conjugado se administra al sujeto por vía oral. En otras realizaciones, el conjugado o la composición farmacéutica que contiene el conjugado se administra al sujeto por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa o subcutánea.
- 15 En un ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los ejemplos anteriores de los procedimientos farmacéuticos 1 y 2, la diátesis hemorrágica está causada por un trastorno de coagulación sanguínea o está asociada con él. Un trastorno de coagulación sanguínea también se puede denominar coagulopatía. En un ejemplo particular, el trastorno de coagulación sanguínea, que se puede tratar con un compuesto o conjugado de la presente divulgación, es hemofilia o enfermedad de von Willebrand (vWD). En un ejemplo particular, el trastorno de la coagulación sanguínea, que se puede tratar es hemofilia. En otro ejemplo, la hemofilia es hemofilia A. En otro ejemplo, la hemofilia es hemofilia B.

En otro ejemplo, el tipo de hemorragia asociado a la diátesis hemorrágica se selecciona de entre hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, traumatismo, traumatismo de la cabeza, hemorragia gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia en el espacio retrofaríngeo, hemorragia en el espacio retroperitoneal, y hemorragia en la vaina del iliopsoas.

En otro ejemplo, el sujeto que padece la diátesis hemorrágica necesita tratamiento para cirugía, incluyendo, por ejemplo, profilaxis quirúrgica o manejo perioperatorio. En un ejemplo, la cirugía se selecciona de entre cirugía menor y cirugía mayor. Los procedimientos quirúrgicos ejemplares incluyen extracción de dientes, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, craneotomía, osteosíntesis, cirugía de trauma, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, cirugía de reemplazo de articulaciones (por ejemplo, reemplazo total de rodilla, reemplazo de cadera y similares), cirugía cardíaca y cesárea.

35 En algunos aspectos, el trastorno de la coagulación es causado por una deficiencia en al menos un factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, FVIII). La presente divulgación proporciona procedimientos para tratar a un sujeto mamífero (por ejemplo, un sujeto humano) que tiene una deficiencia en al menos un factor de coagulación de la sangre seleccionado de entre Factor de von Willebrand (vWF), FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI y formas activadas de los mismos (por ejemplo, tanto para la profilaxis como para el tratamiento de hemorragias agudas).

Procedimiento farmacéutico 3

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar un trastorno de coagulación en un sujeto mamífero (por ejemplo, un paciente humano) que tiene una deficiencia en al menos un factor de coagulación de la sangre seleccionado de entre Factor de von Willebrand (vWF), FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, y formas activadas de los mismos (por ejemplo, tanto para la profilaxis como para el tratamiento de hemorragias agudas), comprendiendo el procedimiento: administrar al sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la presente divulgación o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente divulgación.

Procedimiento farmacéutico 4

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar un trastorno de coagulación en un sujeto mamífero (por ejemplo, un paciente humano) que tiene una deficiencia en al menos un factor de coagulación de la sangre seleccionado de entre Factor de von Willebrand (vWF), FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, y formas activadas de los mismos (por ejemplo, tanto para la profilaxis como para el tratamiento de hemorragias agudas), comprendiendo el procedimiento: administrar al sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la presente divulgación o una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la presente divulgación.

En un ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los ejemplos anteriores de los procedimientos farmacéuticos 1, 2, 3 y 4, el sujeto tiene una deficiencia de FVIII. En otro ejemplo, el sujeto responde al tratamiento con FVIII.

Procedimiento farmacéutico 5

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto mamífero (por ejemplo, un sujeto humano) que tiene una deficiencia en FVIII, el procedimiento incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la presente divulgación o una composición farmacéutica que contiene un compuesto de la presente divulgación.

Procedimiento farmacéutico 6

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto mamífero (por ejemplo, un sujeto humano) que tiene una deficiencia en FVIII, el procedimiento incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de la presente divulgación o una composición farmacéutica que contiene un conjugado de la presente divulgación.

Los pacientes con una deficiencia de FVIII (es decir, hemofilia A) pueden desarrollar anticuerpos inhibidores de FVIII. La actividad biológica de ciertos compuestos o conjugados de la presente divulgación no está influida esencialmente por la presencia de inhibidores de FVIII, tales como anticuerpos contra FVIII. Por lo tanto, en un ejemplo de acuerdo con cualquiera de los ejemplos anteriores de procedimientos farmacéuticos 1-6, el sujeto mamífero (por ejemplo, un paciente humano) que padece una deficiencia de FVIII es un paciente inhibidor de FVIII (por ejemplo, produce anticuerpos contra FVIII). La magnitud de la respuesta de anticuerpos a FVIII se puede cuantificar usando un ensayo de inhibidor funcional, como el descrito en Kasper CK et al. (1975) *Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors*. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 34(2):612. Los inhibidores de FXI podrían cuantificarse mediante un ensayo aPTT como lo describen Kasper CK et al. Los inhibidores de FV, FVII y FX podrían cuantificarse mediante un ensayo basado en PT siguiendo el procedimiento de Kasper CK et al.

El desarrollo de inhibidores (a FIX) también se conoce en la deficiencia de FIX (es decir, hemofilia B). La actividad biológica (por ejemplo, la actividad de ensayo de generación de FXa) de ciertos compuestos de la presente divulgación no está influida esencialmente por la presencia de inhibidores de FIX, tales como anticuerpos contra FIX. Dado que las deficiencias de FV, FVII, FXI y FX son trastornos congénitos muy raros, se sabe poco sobre el desarrollo de inhibidores, aunque es factible que los pacientes que tienen dichos trastornos puedan desarrollar inhibidores. El tratamiento de los pacientes inhibidores se contempla en la presente divulgación. Dichos pacientes inhibidores pueden tener una respuesta de título alto superior a 5 BU o una respuesta de título bajo de entre 0,5 y 5 BU. Típicamente, los inhibidores se dirigen contra FVIII y los pacientes tienen hemofilia A.

En un ejemplo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, el sujeto mamífero es un sujeto humano (es decir, un paciente humano). En otro ejemplo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto mamífero (por ejemplo, paciente humano) se trata de forma concomitante con al menos un agente activo adicional, por ejemplo, un fármaco aprobado para el tratamiento de trastornos de la coagulación. En un ejemplo, el agente activo adicional se selecciona de entre un factor de coagulación (por ejemplo, FVIII o FIX) y desmopresina (DDVAP). En un ejemplo particular, el sujeto mamífero (por ejemplo, un paciente humano) se trata de forma concomitante con FVIII. En un ejemplo, el agente activo adicional se administra al sujeto al mismo tiempo que el compuesto o conjugado de la presente divulgación se administra al sujeto. Por ejemplo, el al menos un agente activo adicional está contenido en una composición farmacéutica que también contiene el compuesto o conjugado de la presente divulgación. En otro ejemplo, el agente activo adicional se administra al sujeto en un momento diferente pero dentro del período de tratamiento para el compuesto o conjugado de la presente divulgación. Por ejemplo, el agente activo adicional se administra de forma alterna con el compuesto o conjugado de la presente divulgación.

En otro ejemplo, el sujeto mamífero (por ejemplo, paciente humano) se trata de forma concomitante con FIX. Puesto que los compuestos o conjugados de la invención son capaces de activar el FIXa, se podrían utilizar para pre-activar el polipéptido de FIXa antes de administrar FIXa al sujeto.

En otro ejemplo más, el sujeto mamífero (por ejemplo, un paciente humano) se trata de forma concomitante con desmopresina (DDVAP).

Los procedimientos de la divulgación se pueden poner en práctica en un sujeto que necesite tratamiento profiláctico o tratamiento a demanda.

- En diversos aspectos, los compuestos de la presente divulgación se pueden usar como una terapia de reemplazo (por ejemplo, que reemplaza el tratamiento con FVIII) en sujetos que necesitan tratamiento para hemofilia A. En otros aspectos, los compuestos de la presente divulgación se pueden usar junto con otras terapias (por ejemplo, terapia con FVIII o FIX) en sujetos que necesitan tratamiento para hemofilia A o B. En otros aspectos, los compuestos de la presente divulgación son útiles como terapia de derivación en sujetos que necesitan tratamiento para hemofilia A (por ejemplo, pacientes con hemofilia A con inhibidores).

Administración de compuestos

- 10 Para la administración oral y parenteral de compuestos a pacientes, incluidos pacientes humanos, el nivel de dosificación diaria del compuesto (por ejemplo, péptido o derivado peptídico) de la presente divulgación generalmente será de 2 a 2000 mg por adulto (es decir, de aproximadamente 0,03 a 30 mg/kg), administrados en dosis únicas o divididas.
- 15 Una forma de dosificación unitaria (por ejemplo, comprimido o cápsula) puede contener de 2 mg a 2000 mg de compuesto activo. La forma de dosificación unitaria se puede administrar una, dos o más veces al día, según corresponda. En cualquier caso, el facultativo determinará la dosis real que será más adecuada para cualquier paciente individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente en particular. Las dosificaciones anteriores son ejemplares del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se merezcan intervalos de dosificación mayores o menores y que estén dentro del alcance de esta descripción.

Administración de conjugados polipeptídicos

- El cálculo de la dosificación requerida para el conjugado polipeptídico de la presente divulgación se basa en el hallazgo empírico de que, en promedio, 1 UI de FVIII por kg de peso corporal aumenta la actividad de FVIII en plasma en aproximadamente 2 UI/dl. La dosificación requerida se determina usando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades requeridas} = \text{peso corporal (kg)} \times \text{aumento FVIII deseado (UI/dl o \% de lo normal)} \times 0,5 \text{ (UI/kg por UI/dl)}$$

- 30 Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para un paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la vía de administración, y la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad en particular que se está sometiendo a la terapia.
- 35 Los niveles de dosificación del orden de aproximadamente 0,005 mg a aproximadamente 80 mg por kilogramo de peso corporal por día son útiles en el tratamiento de las enfermedades y afecciones descritas en el presente documento (por ejemplo, de aproximadamente 0,35 mg a aproximadamente 5,6 g por paciente humano por día, basándose en el peso promedio de una persona adulta de 70 kg). La cantidad de principio activo que se puede combinar con los materiales vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y el modo de administración concreto. Las formas de dosificación unitaria generalmente contendrán entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de un principio activo. La dosis diaria se puede administrar en de una a cuatro dosis por día. En el caso de afecciones de la piel, se puede aplicar, por ejemplo, como una preparación tópica de los compuestos de la presente divulgación en la zona afectada de una a cuatro veces al día.
- 45 Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para un paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la vía de administración, y la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad en particular que se está sometiendo a la terapia.

Definiciones

- Las definiciones y explicaciones a continuación corresponden a los términos como se usan en todo este documento, incluidas la memoria descriptiva y las reivindicaciones. A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, una fórmula o nombre dado abarcará todos sus isómeros, tales como estereoisómeros, isómeros geométricos, isómeros ópticos, tautómeros y mezclas de los mismos donde existan dichos isómeros, así como sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables, tales como como hidratos.

- También se debe tener en cuenta que, como se usan en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contenido dicte claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos

o más compuestos. También se debe tener en cuenta que el término "o" se emplea generalmente en su sentido que incluye "y/o" a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

El término "dosis terapéutica", como se usa en el presente documento, significa una dosis que logra un objetivo terapéutico, como se describe en el presente documento.

La frase "cantidad terapéuticamente efectiva", como se usa en el presente documento, significa la cantidad de un compuesto, material o composición de la presente divulgación, que es efectiva para producir un efecto terapéutico deseado, en una relación razonable de riesgo/beneficio aplicable a cualquier tratamiento médico. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad efectiva para reducir o disminuir al menos un síntoma de la enfermedad o afección que se está tratando o para reducir o retrasar la aparición de uno o más marcadores clínicos o síntomas asociados con la enfermedad o afección, o para modificar o revertir el proceso de la enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora de EE. UU. O la UE u otro gobierno o que figura en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en seres humanos. Por lo tanto, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas propiedades y/o sustancias que son aceptables para un paciente (por ejemplo, un paciente humano) desde un punto de vista toxicológico y/o de seguridad.

Los términos "tratamiento" o "tratar" cuando se refieren a una enfermedad o afección, significan producir un efecto terapéutico deseado. Los efectos terapéuticos ejemplares incluyen retrasar la aparición o reducir al menos un síntoma asociado con la enfermedad, afectar positivamente (por ejemplo, reducir o retrasar la aparición) a un marcador clínico asociado con la enfermedad y retar o revertir la progresión de la enfermedad.

Cuando los grupos sustituyentes se especifican por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos, que resultarían al escribir la estructura de derecha a izquierda. Por ejemplo, "-CH₂O-" está destinado a leerse también "-OCH₂-".

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene el número de átomos de carbono designado (por ejemplo, C₁-C₁₀ significa de uno a diez átomos de carbono). Típicamente, un grupo alquilo tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, por ejemplo, de 1 a 10 átomos de carbono, de 1 a 8 átomos de carbono o de 1 a 6 átomos de carbono. Un grupo "alquilo inferior" es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. El término "alquilo" incluye radicales di- y multivalentes. Por ejemplo, el término "alquilo" incluye "alquilenos" siempre que sea apropiado, por ejemplo, cuando la fórmula indica que el grupo alquilo es divalente o cuando los sustituyentes se unen para formar un anillo. Los ejemplos de radicales alquilo incluyen, pero sin limitarse a, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *iso*-butilo, *sec*-butilo, así como homólogos e isómeros de, por ejemplo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo y *n*-octilo.

El término "alquilenos" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un grupo alquilo divalente (dirradical), donde alquilo se define en el presente documento. "Alquilenos" se ejemplifica, pero no se limita, por -CH₂CH₂CH₂CH₂-. Típicamente, un grupo "alquilenos" tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, por ejemplo, que tiene 10 o menos átomos de carbono (por ejemplo, de 1 a 8 o de 1 a 6 átomos de carbono). Un grupo "alquilenos inferior" es un grupo alquilenos que tiene de 1 a 4 átomos de carbono.

El término "alquilenos" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 24 átomos de carbono y al menos un doble enlace. Un grupo alquilenos típico tiene de 2 a 10 átomos de carbono y al menos un doble enlace. En una realización, los grupos alquilenos tienen de 2 a 8 átomos de carbono o de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 dobles enlaces. Los grupos alquilenos ejemplares incluyen vinilo, 2-propenilo, 1-but-3-enilo, crotilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), 2-isopentenilo, 1-pent-3-enilo, 1-hex-5-enilo y similares.

El término "alquilenos" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un radical hidrocarburo insaturado o poliinsaturado de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 24 átomos de carbono y al menos un triple enlace. Un grupo "alquilenos" típico tiene de 2 a 10 átomos de carbono y al menos un triple enlace. En un aspecto de la divulgación, los grupos alquilenos tienen de 2 a 6 átomos de carbono y al menos un triple enlace. Los ejemplos de grupos alquilenos incluyen prop-1-inilo, prop-2-inilo (es decir, propargilo), etinilo y 3-butenilo.

Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a grupos alquilo que están unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa un radical hidrocarburo estable, de cadena lineal o ramificada que consiste en el número establecido de átomos de carbono (por ejemplo, C₂-C₁₀ o C₂-C₈) y al menos un heteroátomo elegido, por ejemplo, de entre N, O, S, Si, B y P (en una realización, N, O y S), donde los átomos de nitrógeno, azufre y fósforo están opcionalmente oxidados, y el o los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. El o los heteroátomos se colocan en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo. Ejemplos de grupos heteroalquilo incluyen, pero sin limitarse a, -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -CH₂-Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃, and -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo, -CH₂-NH-OCH₃ y -CH₂-O-Si(CH₃)₃. De manera similar, el término "heteroalquileno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica, pero no se limita por, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- y -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. Típicamente, un grupo heteroalquilo tendrá de 3 a 24 átomos (carbono y heteroátomos, excluyendo el hidrógeno) (heteroalquilo de 3 a 24 miembros). En otro ejemplo, el grupo heteroalquilo tiene un total de 3 a 10 átomos (heteroalquilo de 3 a 10 miembros) o de 3 a 8 átomos (heteroalquilo de 3 a 8 miembros).

El término "heteroalquilo" incluye "heteroalquileno" cuando sea apropiado, por ejemplo, cuando la fórmula indica que el grupo heteroalquilo es divalente o cuando los sustituyentes se unen para formar un anillo.

El término "cicloalquilo" por sí mismo o en combinación con otros términos, representa un radical carbocíclico no aromático saturado o insaturado que tiene de 3 a 24 átomos de carbono, por ejemplo, que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (por ejemplo, cicloalquilo C₃-C₈ o cicloalquilo C₃-C₆). Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero sin limitarse a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. El término "cicloalquilo" también incluye estructuras puenteadas, policíclicas (por ejemplo, bicíclicas), tales como norbornilo, adamantilo y biciclo[2.2.1]heptilo. El grupo "cicloalquilo" se puede fusionar a al menos otro (por ejemplo, de 1 a 3) anillo seleccionado de entre arilo (por ejemplo, fenilo), heteroarilo (por ejemplo, piridilo) y anillos no aromáticos (por ejemplo, carbocíclicos o heterocíclicos). Cuando el grupo "cicloalquilo" incluye un anillo arilo, heteroarilo o heterocíclico fusionado, entonces el grupo "cicloalquilo" se une al resto de la molécula a través del anillo carbocíclico.

El término "heterocicloalquilo", "heterocíclico", "heterociclo" o "heterocíclico", por sí mismo o en combinación con otros términos, representa un anillo carbocíclico, no aromático (por ejemplo, anillo de 3 a 8 miembros y por ejemplo, anillo de 4, 5, 6 o 7 miembros) que contiene al menos uno y hasta 5 heteroátomos seleccionados de entre, por ejemplo, N, O, S, Si, B y P (por ejemplo, N, O y S), donde los átomos de nitrógeno, azufre y fósforo están opcionalmente oxidados, y el o los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados (por ejemplo, de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de entre nitrógeno, oxígeno y azufre), o un sistema de anillo fusionado de 4 a 8 anillos de miembros, que contienen al menos uno y hasta 10 heteroátomos (por ejemplo, de 1 a 5 heteroátomos seleccionados de entre N, O y S) en combinaciones estables conocidas por los expertos en la materia. Los grupos heterocicloalquilo ejemplares incluyen un anillo de fenilo fusionado. Cuando el grupo "heterocíclico" incluye un anillo de arilo, heteroarilo o cicloalquilo fusionado, el grupo "heterocíclico" se une al resto de la molécula a través de un heterociclo. Un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Grupos heterocicloalquilo o heterocíclicos ejemplares de la presente divulgación incluyen morfolinilo, tiomorfolinilo, S-óxido, tiomorfolinilo S,S-dióxido, piperazinilo, homopiperazinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, imidazolidinilo, tetrahidropiranilo, piperidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, piperidinilo, homopiperidinilo, homomorfolinilo, homotiomorfolinilo, S, S-dióxido de homotiomorfolinilo, oxazolidinonilo, dihidropirazolilo, dihidropirrolilo, dihidropirazolilo, dihidropiridilo, dihidropirimidinilo, dihidrofurilo, dihidropiranilo, S-óxido de tetrahidrotienilo, S,S-dióxido de tetrahidrotienilo, S-óxido de homotiomorfolinilo, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y similares.

Por "arilo" se entiende un grupo carbocíclico aromático de 5, 6 o 7 miembros que tiene un solo anillo (por ejemplo, fenilo) o que está fusionado con otros anillos aromáticos o no aromáticos (por ejemplo, de 1 a 3 otros anillos). Cuando el grupo "arilo" incluye un anillo no aromático (tal como en 1,2,3,4-tetrahidronaftilo) o un grupo heteroarilo, el grupo "arilo" se une al resto de la molécula a través de un anillo arilo (por ejemplo, un anillo fenilo). El grupo arilo está opcionalmente sustituido (por ejemplo, con de 1 a 5 sustituyentes descritos en el presente documento). En un ejemplo, el grupo arilo tiene de 6 a 10 átomos de carbono. Ejemplos no limitantes de grupos arilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, quinolina, indanilo, indenilo, dihidronaftilo, fluorenilo, tetralinilo, benzo[d][1,3]dioxolilo o 6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[a]cicloheptenilo. En una realización, el grupo arilo se selecciona de entre fenilo, benzo[d][1,3]dioxolilo y naftilo. El grupo arilo, en otra realización más, es fenilo.

El término "arilalquilo" o "aralquilo" pretende incluir aquellos radicales en los que un grupo arilo o grupo heteroarilo está unido a un grupo alquilo para crear los radicales -alquilarilo y -alquil-heteroarilo, donde alquilo, arilo y heteroarilo se definen en el presente documento. Los ejemplos de grupos arilalquilo o aralquilo incluyen bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares.

Por "ariloxi" se entiende el grupo -O-arilo, donde arilo es como se define en el presente documento. En un ejemplo, la parte arilo del grupo ariloxi es fenilo o naftilo. La parte arilo del grupo ariloxi, en una realización, es fenilo.

- 5 El término "heteroarilo" o "heteroaromático" se refiere a un resto aromático poliinsaturado de 5, 6 o 7 miembros que contiene al menos un heteroátomo (por ejemplo, 1 a 5 heteroátomos, tales como 1-3 heteroátomos) seleccionados de entre N, O, S, Si y B (por ejemplo, N, O y S), donde los átomos de nitrógeno y azufre se oxidan opcionalmente, y el o los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. El grupo "heteroarilo" puede ser un anillo simple o estar fusionado a otros anillos arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo (por ejemplo, de 1 a 3 otros anillos). Cuando el grupo "heteroarilo" incluye un anillo de arilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo fusionado, entonces el grupo "heteroarilo" se une al resto de la molécula a través del anillo heteroarilo. Un grupo heteroarilo se puede unir al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o heteroátomo. En un ejemplo, el grupo heteroarilo tiene de 4 a 10 átomos de carbono y de 1 a 5 heteroátomos seleccionados de O, S y N. Ejemplos no limitantes de grupos heteroarilo incluyen piridilo, pirimidinilo, quinolinilo, benzotienilo, indolilo, indolinilo, piridazinilo, pirazinilo, isoindolilo, isoquinolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, imidazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, tiazolilo, indolizínilo, indazolilo, benzotiazolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, isotiazolilo, naftiridinilo, isocromanilo, cromanilo, tetrahydroisoquinolinilo, isoindolinilo, isobenzotetrahydrofuranilo, isobenzotetrahydrotienilo, isobenzotienilo, benzoxazolilo, piridopiridilo, benzotetrahydrofuranilo, benzotetrahydrotienilo, purinilo, benzodioxolilo, triazinilo, pteridinilo, imidazopiridilo, imidazotiazolilo, dihydrobencisoxazinilo, bencisoxazinilo, benzoxazinilo, dihydrobencisotiazinilo, benzopirranilo, benzotiopirranilo, cromonilo, cromanonilo, N-óxido de piridilo, tetrahydroquinolinilo, dihydroquinolinilo, dihydroquinolinonilo, dihydroisoquinolinonilo, dihydrocumarinilo, dihydroisocumarinilo, isoindolinonilo, benzodioxanilo, benzoxazolinonilo, N-óxido de pirrolilo, N-óxido de pirimidinilo, N-óxido de piridazinilo, N-óxido de pirazinilo, N-óxido de quinolinilo, N-óxido de indolilo, N-óxido de indolinilo, N-óxido de isoquinolilo, N-óxido de quinazolinilo, N-óxido de quinoxalinilo, N-óxido de ftalazinilo, N-óxido de imidazolilo, N-óxido de isoxazolilo, N-óxido de oxazolilo, N-óxido de tiazolilo, N-óxido de indolizínilo, N-óxido de indazolilo, N-óxido de bencimidazolilo, N-óxido de pirrolilo, N-óxido de oxadiazolilo, N-óxido de tiadiazolilo, N-óxido de triazolilo, N-óxido de tetrazolilo, S-óxido de benzotiopirranilo, S,S-dióxido de benzotiopirranilo. Los grupos heteroarilo ejemplares incluyen imidazolilo, pirazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxadiazolilo y piridilo. Otros grupos heteroarilo ejemplares incluyen 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, piridil-4-ilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan de entre el grupo de sustituyentes aceptables del grupo arilo descritos a continuación.

35 Por brevedad, el término "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye anillos tanto arilo como heteroarilo como se han definido anteriormente.

- 40 Cada uno de los términos anteriores (*por ejemplo*, "alquilo", "cicloalquilo", "heteroalquilo", "heterocicloalquilo", "arilo" y "heteroarilo") pretende incluir formas tanto sustituidas como no sustituidas del radical indicado. El término "sustituido" para cada tipo de radical se explica a continuación. Cuando un compuesto de la presente divulgación incluye más de un sustituyente, cada uno de los sustituyentes se elige independientemente.

- 45 El término "sustituido" en relación con los radicales alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heteroalquilo y heterocicloalquilo (incluidos los grupos denominados alqueno, heteroalqueno, heteroalqueno, cicloalqueno, heterocicloalqueno y similares) se refiere a uno o más sustituyentes, donde cada sustituyente se selecciona independientemente de entre, pero sin limitarse a, heteroalquilo de 3 a 10 miembros, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo de 3 a 10 miembros, arilo, heteroarilo, -OR^a, -SR^a, =O, =NR^a, =N-OR^a, -NR^aR^b, -halógeno, -SiR^aR^bR^c, -OC(O)R^a, -C(O)R^e, -C(O)OR^a, -C(O)NR^aR^b, -OC(O)NR^aR^b, -NR^cC(O)R^e, -NR^cC(O)NR^aR^b, -NR^cC(S)NR^aR^b, -NR^cC(O)OR^a, -NR^cC(NR^aR^b)=NR^d, -S(O)R^e, -S(O)₂R^e, -S(O)₂NR^aR^b, -NR^cS(O)₂R^a, -CN y -NO₂. R^a, R^b, R^c, R^d y R^e se refieren cada uno independientemente a hidrógeno, alquilo C₁-C₂₄ (por ejemplo, alquilo C₁-C₁₀ o alquilo C₁-C₆), cicloalquilo C₃-C₁₀, heteroalquilo C₁-C₂₄ (por ejemplo, heteroalquilo C₁-C₁₀ o heteroalquilo C₁-C₆), heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, arilalquilo y heteroarilalquilo, donde, en una realización, R^e no es hidrógeno. Cuando dos de los grupos R anteriores (por ejemplo, R^a y R^b) se unen al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR^aR^b pretende incluir pirrolidinilo, N-alquilpiperidinilo y morfolinilo.

- El término "sustituido" en relación con los grupos arilo y heteroarilo, se refiere a uno o más sustituyentes, donde cada sustituyente se selecciona independientemente de entre, pero sin limitarse a, alquilo (por ejemplo, alquilo C₁-C₂₄, alquilo C₁-C₁₀ o alquilo C₁-C₆), cicloalquilo (por ejemplo, cicloalquilo C₃-C₁₀, o cicloalquilo C₃-C₆), alqueno (por

- ejemplo, alqueno C₁-C₁₀ o alqueno C₁-C₆), alquino (por ejemplo, alquino C₁-C₁₀ o alquino C₁-C₆), heteroalquilo (por ejemplo, heteroalquilo de 3 a 10 miembros), heterocicloalquilo (por ejemplo, heterocicloalquilo C₃-C₈), arilo, heteroarilo, -R^a, -OR^a, -SR^a, =O, =NR^a, =N-OR^a, -NR^aR^b, -halógeno, -SiR^aR^bR^c, -OC(O)R^a, -C(O)R^e, -C(O)OR^a, -C(O)NR^aR^b, -OC(O)NR^aR^b, -NR^cC(O)R^e, -NR^cC(O)NR^aR^b, -NR^cC(S)NR^aR^b, -NR^cC(O)OR^a, -NR^cC(NR^aR^b)=NR^d, -S(O)R^e, -S(O)₂R^e, -S(O)₂NR^aR^b, -NR^cS(O)₂R^a, -CN, -NO₂, -N₃, -CH(Ph)₂, fluoroalcoxi(C₁-C₄) y fluoroalquilo(C₁-C₄), en un número que va de cero al número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático, donde R^a, R^b, R^c, R^d y R^e se refieren, cada uno independientemente, a hidrógeno, alquilo C₁-C₂₄ (por ejemplo, alquilo C₁-C₁₀ o alquilo C₁-C₆), cicloalquilo C₃-C₁₀, heteroalquilo C₁-C₂₄ (por ejemplo, heteroalquilo C₁-C₁₀ o heteroalquilo C₁-C₆), heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, arilalquilo y heteroarilo, donde, en una realización, R^e no es hidrógeno.
- 10 Cuando dos grupos R (por ejemplo, R^a y R^b) están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR^aR^b pretende incluir pirrolidinilo, N-alquil-piperidinilo y morfolinilo.

- El término "sustituido" en relación con los grupos arilo y heteroarilo también se refiere a uno o más anillos fusionados,
- 15 en los cuales dos átomos de hidrógeno en los átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo se reemplazan opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -TC(O)-(CRR')_q-U-, donde T y U son independientemente -NR-, -O-, -CRR'- o un enlace sencillo, y q es un número entero de 0 a 3. Como alternativa, dos de los átomos de hidrógeno en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo se puede reemplazar opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -A-(CH₂)_rB-, donde A y B son independientemente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂NR'- o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces sencillos del anillo formado de este modo puede
- 20 opcionalmente ser reemplazado por un doble enlace. Como alternativa, dos de los átomos de hidrógeno en los átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -(CRR')_sX-(CR''R''')_d-, donde s y d son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, o -S(O)₂NR'-, donde los sustituyentes R, R', R'' y R''' en cada una de las fórmulas anteriores se seleccionan
- 25 independientemente de entre hidrógeno y alquilo(C₁-C₆).

Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan al menos uno de entre flúor, cloro, bromo y yodo.

- 30 Por "haloalquilo" se entiende un radical alquilo, donde alquilo es como se ha definido anteriormente y donde al menos un átomo de hidrógeno se reemplaza por un átomo de halógeno. El término "haloalquilo" pretende incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "haloalquilo(C₁-C₄)" o "haloalquilo(C₁-C₄)" quiere decir, pero sin limitarse a, clorometilo, 1-bromoetilo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, 1,1,1-trifluoroetilo y 4-clorobutilo, 3-bromopropilo.

- 35 Como se usa en el presente documento, el término "acilo" describe el grupo -C(O)R^e, donde R^e se selecciona de entre hidrógeno, alquilo C₁-C₂₄ (por ejemplo, alquilo C₁-C₁₀ o alquilo C₁-C₆), alqueno C₁-C₂₄ (por ejemplo, alqueno C₁-C₁₀ o alqueno C₁-C₆), alquino C₁-C₂₄ (por ejemplo, alquino C₁-C₁₀ o alquino C₁-C₆), cicloalquilo C₃-C₁₀, heteroalquilo C₁-C₂₄ (por ejemplo, heteroalquilo C₁-C₁₀ o heteroalquilo C₁-C₆), heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo, heteroarilo, arilalquilo
- 40 y heteroarilalquilo. En una realización, R^e no es hidrógeno.

Por alcanilo se entiende un radical acilo -C(O)-Alk-, donde Alk es un radical alquilo como se define en el presente documento. Los ejemplos de alcanilo incluyen acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, valerilo, isovalerilo, 2-metilbutirilo, 2,2-dimetilpropionilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo y similares.

- 45 Como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), silicio (Si), boro (B) y fósforo (P). En una realización, los heteroátomos son O, S y N.

Por "oxo" se entiende el grupo =O.

- 50 Por "sulfonamida" se entiende un grupo que tiene la fórmula -S(O)₂NRR, donde cada una de las variables R se selecciona independientemente de entre las variables enumeradas a continuación para R.

- El símbolo "R" es una abreviatura general que representa un grupo sustituyente como se describe en el presente documento. Los grupos sustituyentes ejemplares incluyen grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heteroalquilo, arilo, heteroarilo y heterocicloalquilo, cada uno como se define en el presente documento.

- Como se usa en el presente documento, los términos "anillo aromático" y "anillo no aromático" son coherentes con las definiciones comúnmente usadas en la técnica. Por ejemplo, los anillos aromáticos incluyen fenilo y piridilo. Los anillos
- 60 no aromáticos incluyen ciclohexanos.

Como se usa en el presente documento, el término "sistema de anillo fusionado" significa al menos dos anillos, donde cada anillo tiene al menos 2 átomos en común con otro anillo. "Los sistemas de anillos fusionados pueden incluir anillos aromáticos y no aromáticos. Ejemplos de "sistemas de anillos fusionados" son naftalenos, indoles, quinolinas, cromenos y similares. Asimismo, el término "anillo fusionado" se refiere a un anillo que tiene al menos dos átomos en común con el anillo al que se fusiona.

El término compuesto y molécula se usan indistintamente. Otras formas contempladas por la invención cuando se emplea la palabra "molécula" o "compuesto" son sales, profármacos, solvatos, tautómeros, estereoisómeros y mezclas de estereoisómeros. Los compuestos de esta invención pueden estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal de los compuestos de la presente divulgación, que puede prepararse con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en el presente documento. Cuando los compuestos de la presente divulgación contienen funcionalidades relativamente ácidas (por ejemplo, grupo COOH), se pueden obtener sales de adición de bases poniendo en contacto el compuesto (por ejemplo, forma neutra de dicho compuesto) con una cantidad suficiente de la base deseada, ya sea pura o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables incluyen sales de litio, sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico, magnesio y aluminio y similares. Cuando los compuestos de la presente divulgación contienen funcionalidades relativamente básicas (por ejemplo, aminas), se pueden obtener sales de adición de ácido, por ejemplo, poniendo en contacto el compuesto (por ejemplo, forma neutra de dicho compuesto) con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea puro o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos como clorhídrico, trifluoroacético, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbonico, fosfórico, difosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico y similares, así como a los demás. ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como fórmico, acético, propiónico, isobutírico, málico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, 2-hidroxiethylsulfónico, salicílico, esteárico y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como los ácidos glucurónico o galactunórico y similares (véase, por ejemplo, Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66: 1-19). Determinados compuestos específicos de la presente divulgación pueden contener funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de bases o de ácidos.

Las formas neutras de los compuestos se pueden regenerar, por ejemplo, poniendo en contacto la sal con una base o un ácido y aislando el compuesto original de la manera convencional. La forma original del compuesto puede diferir de las diversas formas de sal en ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares, pero, por lo demás, las sales son equivalentes a la forma original del compuesto para los fines de la presente divulgación.

Cuando un sustituyente incluye un átomo de oxígeno con carga negativa "O-", por ejemplo, en "-COO-", entonces la fórmula pretende incluir opcionalmente un protón (es decir, H+) o un contraión catiónico orgánico o inorgánico (por ejemplo, Na+). En un ejemplo, la forma de sal resultante del compuesto es farmacéuticamente aceptable. Además, cuando un compuesto de la presente divulgación incluye un grupo ácido, tal como un grupo ácido carboxílico, por ejemplo, escrito como el sustituyente "-COOH", "-CO₂H" o "-C(O)₂H", entonces la fórmula es significa incluir opcionalmente la correspondiente forma "desprotonada" de ese grupo ácido, por ejemplo, "-COO-", "-CO₂-" o "-C(O)₂", respectivamente.

Además de las formas de sal, la presente divulgación proporciona compuestos, que están en forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos descritos en el presente documento son aquellos compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos en condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de la presente divulgación. Los ejemplos no limitantes de "derivado farmacéuticamente aceptable" o "profármaco" incluyen ésteres farmacéuticamente aceptables, ésteres de fosfato o sus ésteres de sulfonato, así como otros derivados de un compuesto de la presente divulgación que, tras la administración a un receptor, es capaz de proporcionar, ya sea directa o indirectamente, un compuesto de la presente divulgación. En una realización, los derivados o profármacos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de la presente divulgación cuando dichos compuestos se administran a un mamífero (por ejemplo, al permitir que un compuesto administrado por vía oral se absorba más fácilmente en el torrente sanguíneo) o que mejoran la administración del compuesto original a un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro o el sistema linfático) en relación con la especie original.

Los profármacos incluyen una variedad de ésteres (es decir, éster de ácido carboxílico). Los grupos éster, que son

adecuados como grupos de profármaco, son generalmente conocidos en la técnica e incluyen ésteres de benciloxi, dialquil(C₁-C₆)aminoetiloxi, acetoximetilo, pivaloiloximetilo, ftalidoilo, etoxicarboniloxi, 5-metil-2-oxo-1,3-dioxol-4-il metilo y alcoxi(C₁-C₆), opcionalmente sustituidos con N-morfolino y grupos formadores de amidas, tales como dialquil(C₁-C₆)amino. Por ejemplo, los grupos profármaco de éster incluyen los ésteres de alcoxi C₁-C₆. Los expertos en la materia reconocerán diversas metodologías sintéticas que pueden emplearse para formar profármacos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente divulgación (por ejemplo, a través de la esterificación de un grupo ácido carboxílico).

En una realización ejemplar, el profármaco es adecuado para el tratamiento/la prevención de aquellas enfermedades y afecciones que requieren que la molécula de fármaco cruce la barrera hematoencefálica. En una realización, el profármaco entra en el cerebro, donde se convierte en la forma activa de la molécula de fármaco. Adicionalmente, los profármacos pueden convertirse en los compuestos de la presente divulgación mediante procedimientos químicos o bioquímicos en un entorno *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos pueden convertirse lentamente en los compuestos de la presente divulgación cuando se colocan en un reservorio de parche transdérmico junto con una enzima adecuada u otro reactivo químico.

Ciertos compuestos de la presente divulgación pueden existir en formas no solvatadas, así como en formas solvatadas, que incluyen formas hidratadas. En general, las formas solvatadas equivalen a las formas no solvatadas y están comprendidas dentro del alcance de la presente divulgación. Ciertos compuestos de la presente divulgación pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas ("polimorfos"). En general, todas las formas físicas son utilizables en los procedimientos contemplados por la presente divulgación y pretenden estar dentro del alcance de la presente divulgación. "Compuesto o una sal, hidrato, polimorfo o solvato farmacéuticamente aceptable de un compuesto" se refiere al significado inclusivo de "y/o", en el sentido de que se abarcan materiales que cumplen más de uno de los criterios establecidos, por ejemplo, un material que es tanto una sal como un solvato.

El término "solvato" pretende referirse a un complejo formado por la combinación de moléculas de soluto o iones con moléculas de disolvente. El disolvente puede ser un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico o una mezcla de ambos. Los disolventes ejemplares para la formación de solvatos incluyen, pero sin limitarse a, metanol, N,N-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido, tolueno y agua. En una realización, disolventes que tienen un punto de ebullición más alto, tales como por ejemplo, DMF, DMA y similares.

Los compuestos de la presente divulgación pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar marcados de forma radiactiva con isótopos radiactivos, tales como por ejemplo, tritio (³H), yodo-125 (¹²⁵I) o carbono-14 (¹⁴C). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente divulgación, radiactivas o no, pretenden incluirse dentro del alcance de la presente divulgación. Los compuestos descritos en el presente documento, en los que uno o más de los átomos de hidrógeno están reemplazados por otro isótopo estable de hidrógeno (es decir, deuterio) o un isótopo radiactivo (es decir, tritio), son parte de esta divulgación.

El término "tautómero" pretende referirse a formas alternativas de un compuesto que difieren en la posición de un protón, tales como los tautómeros enol ceto e imina enamina, o las formas tautoméricas de grupos heteroarilo que contienen un átomo del anillo unido a un resto de anillo NH y un resto de anillo =N, tales como pirazoles, imidazoles, bencimidazoles, triazoles y tetrazoles.

El término "aminoácido" dentro del alcance de la presente invención significa alfa-aminoácido a menos que se especifique lo contrario. El término "aminoácido" incluye aminoácidos de origen natural y de origen no natural (es decir, no proteógenos). Las abreviaturas de una y tres letras para los aminoácidos de origen natural se usan en el presente documento (véase, por ejemplo, Lehninger, Biochemistry, 2ª ed., Worth Publishers, Nueva York, 1995: 71-92). El término "aminoácido" también incluye estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) y modificaciones de aminoácidos de origen natural (por ejemplo, aminoácidos alfa-N-alkilados; fenilalanina modificada o derivados de tirosina, y similares).

Convencionalmente, los L-aminoácidos se designan usando letras mayúsculas (por ejemplo, la letra mayúscula "C" se refiere a L-cisteína), y los D-aminoácidos se designan en minúsculas (por ejemplo, la letra minúscula "c" se refiere a la D-cisteína). Cuando no se proporciona una indicación del isómero, se pretenden ambos isómeros. Por ejemplo, cuando se hace referencia al aminoácido con su nombre, se incluyen los aminoácidos tanto L como D (por ejemplo, el término "cisteína" incluye ambos, L-cisteína y D-cisteína).

El término "aminoácido modificado" se refiere a aminoácidos, que están alterados con respecto a su estructura original, por ejemplo, mediante sustitución. Los ejemplos de aminoácidos modificados incluyen, por ejemplo, aminoácidos alfa-

N-alquilados, derivados de tirosina (por ejemplo, aquellos en los que el grupo hidroxilo se convierte en un grupo éter o éster, o aquellos en los que el anillo de fenilo está sustituido, por ejemplo, con un átomo de halógeno), derivados de fenilalanina (por ejemplo, aquellos en los que el anillo fenilo está sustituido, por ejemplo, con un átomo de halógeno), derivados de lisina (por ejemplo, aquellos en los que el grupo NH₂ se convierte en un grupo amida o un grupo sulfonamida), y aminoácidos, en los cuales un grupo ácido carboxílico se derivatiza, por ejemplo, se esterifica, se convierte en un grupo amida, y similares. En un ejemplo, el aminoácido modificado es un residuo de tirosina modificado en el grupo hidroxilo y que tiene la fórmula Y-OR_b, donde R_b se selecciona de entre alquilo lineal o ramificado, por ejemplo, alquilo (C₁-C₁₀), heteroalquilo lineal o ramificado, por ejemplo, heteroalquilo (C₁-C₁₀) que comprende de 1 a 5 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N, y un polímero soluble en agua (por ejemplo, un resto PEG). En otro ejemplo, la tirosina modificada es metoxi-tirosina (Y-OMe).

La introducción de al menos un aminoácido no natural, o la modificación de al menos un aminoácido puede mejorar la estabilidad o solubilidad de un péptido. Puede aumentar aún más la resistencia a la degradación por proteasa o alterar la actividad biológica (por ejemplo, biológica *in vitro*) del péptido.

Otros aminoácidos modificados y no proteógenos útiles en la presente invención se describen, por ejemplo, en Grant, *Synthetic Peptides: A Users Guide*, Oxford University Press, 1992.

Los aminoácidos no proteinógenos pueden incluir, pero sin limitarse a, norvalina (Nva), norleucina (Nle), ácido 4-aminobutírico (gamma-Abu), ácido 2-aminoisobutírico (Aib), ácido 6-aminohexanoico (gamma-Ahx), ornitina (Orn), hidroxiprolina (Hyp), sarcosina, citrulina, ácido cisteico (Coh), ciclohexilalanina, metioninasulfóxido (Meo), metioninasulfona (Moo), homoserinametilester (Hsm), propargilglicina (Eag), 5-fluorotriptófano (5Fw), 6-fluorotriptófano (6Fw), 3',4'-dimetoxifenilalanina (Ear), 3',4'-difluorofenilalanina (Dff), 4'-fluorofenilalanina (Pff), 1-naftilalanina (1-Nal), 1-naftil-alanina, 1-metilriptófano (1Mw), penicilamina (Pen), homoserina (HSe). Además, dichos aminoácidos pueden incluir, pero sin limitarse a, ácido alfa-amino isobutírico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina (Phg), benzotienilalanina (Bta), L-homo-cisteína (L-Hcys), N-metilfenilalanina (NMF), 2-tienilalanina (Thi), 3,3-difenilalanina (Ebw), homofenilalanina (Hfe), s-bencil-L-cisteína (Ece) o ciclohexilalanina (Cha). Estos y otros aminoácidos no proteógenos pueden existir como isómeros D o L.

El término "aminoácidos hidrófobos" o "aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba" significa cualquier aminoácido con cadenas laterales alquilo (por ejemplo, A, L, I, V y P), cualquier aminoácido con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, F, W e Y), y otros aminoácidos que tienen una cadena lateral no polar, por ejemplo, aquellos que contienen un grupo éter o tioéter (es decir, M), o que tienen una cadena lateral, que no está ionizada en condiciones fisiológicas. El término "aminoácido hidrófobo" incluye glicina y aminoácidos que tienen una cadena lateral de cicloalquilo, tal como P.

El término "aminoácido no cargado polar" o "aminoácido que tiene una cadena lateral no cargada polar" significa cualquier aminoácido que tiene una cadena lateral que incorpora un grupo funcional (por ejemplo, -OH o grupo -SH, grupo amida -C(O)NH₂, etc.), donde el grupo funcional no está ionizado en condiciones fisiológicas.

El término "aminoácido hidrófobo o no cargado polar", o "aminoácido que tiene una cadena lateral hidrófoba o no cargada polar", significa cualquier aminoácido que no se ioniza en condiciones fisiológicas (es decir, distinto de los aminoácidos básicos y ácidos). Ejemplos de "aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba o no cargada polar" incluyen G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N, Q y P (por ejemplo, G, A, V, I, L, M, F, W, Y, S, T, N y Q).

El término "aminoácido ácido" o "aminoácido que tiene una cadena lateral ácida", o cualquier variación del mismo, significa cualquier aminoácido que tiene una cadena lateral con un grupo ionizable (cargado negativamente), como un grupo ácido carboxílico. Los ejemplos de "aminoácidos ácidos" incluyen D y E.

El término "aminoácido básico" o "aminoácido que tiene una cadena lateral básica" o cualquier variación del mismo, significa cualquier aminoácido que tiene una cadena lateral con un grupo ionizable (cargado positivamente), como un grupo amino primario o secundario. Los ejemplos de "aminoácidos básicos" incluyen K, R y H.

El término "péptido" o "secuencia peptídica" incluye moléculas en las que los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) (también denominados enlaces amida).

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un compuesto polimérico compuesto por residuos de aminoácidos unidos de manera covalente. En un ejemplo, la proteína o polipéptido incorpora al menos 500 aminoácidos. El término "polipéptido" como se usa en el presente documento se refiere adicionalmente a un factor de coagulación sanguínea o un resto de direccionamiento a plaquetas

como se describe en el presente documento.

El término "variante inversa" de un péptido como se usa en esta solicitud significa un enantiómero o imagen especular de un péptido. Una "variante inversa" es un péptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que su péptido nativo correspondiente, pero incluye el correspondiente D-aminoácido para cada L-aminoácido en el péptido nativo y el correspondiente L-aminoácido para cada D-aminoácido presente en el péptido nativo (*es decir*, la quiralidad para cada aminoácido se invierte). Por ejemplo, la variante inversa del péptido nativo kCLASYC es Kclasyc.

El término "retrovariante" de un péptido, significa un péptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos pero en el que los aminoácidos se ensamblan en dirección opuesta (orden inverso) al péptido nativo. Por ejemplo, la retrovariante del péptido nativo kCLASYC es CYSALCK.

El término "variante retro-inversa" como se usa en esta solicitud significa un retro-péptido como se describe en el presente documento, que también se invierte en su secuencia de aminoácidos como en una retrovariante descrita en el presente documento. Por lo tanto, una "variante retro-inversa" de un péptido se refiere a un péptido que se compone de residuos de aminoácidos que se ensamblan en la dirección opuesta y que tienen una quiralidad invertida con respecto al péptido nativo al que se modifica de forma retro-inversa. Por ejemplo, la variante retro-inversa del péptido kCLASYC es cysalck.

Una variante retro-inversa puede mantener la topología de las cadenas laterales como en la secuencia del péptido nativo. Por ejemplo, Guichard et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9765-9769 describió que un péptido retro-inverso imitaba la estructura y la actividad antigénica del péptido L natural IRGERA, pero no de los péptidos D y retro. Dichos peptidomiméticos retro-inversos pueden prepararse usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, como los descritos en Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237. Los análogos de péptidos retro-inversos parciales son polipéptidos en los que solo una parte de la secuencia se invierte y se reemplaza con residuos de aminoácidos enantioméricos. Los procesos para preparar dichos análogos se describen, por ejemplo, en la patente europea EP0097994 de Pessi et al.

Convencionalmente, cuando los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos, un péptido se representa de manera que el grupo amino en el extremo N aparece a la izquierda y el grupo carboxilo en el extremo C a la derecha. Los péptidos y derivados peptídicos de acuerdo con la presente invención se representan de esta manera.

Un "derivado peptídico" contiene una modificación de uno o más residuos de aminoácidos o un grupo enlazador u otro grupo unido covalentemente. Los ejemplos de derivados de aminoácidos incluyen derivados de N-acilo del extremo amino o de otro grupo amino libre, ésteres del extremo carboxilo o de otro grupo carboxilo o hidroxilo libre, amidas del extremo carboxilo o de otro grupo carboxilo libre producido por reacción con amoníaco o con una amina adecuada, derivados glucosilados, derivados hidroxilados, derivados nucleotidilados, derivados ribosilados de ADP, derivados pegilados, derivados fosforilados, derivados biotinilados, derivados conjugados con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, albúmina, transferrina, HES, y similares. También se incluyen entre los derivados químicos los obtenidos por modificación del enlace peptídico -CO-NH-, por ejemplo, por reducción a -CH₂-NH- o alquilación a -CO-N(alquilo)-. Otros derivados incluyen bioisómeros de enlace amida, cetometileno y derivados de hidroxietileno, así como tioésteres, tioamidas y similares.

Otras modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, halogenación (por ejemplo, yodación), metilación, miristoilación, oxidación, pegilación (Mei et al., Blood 116:270-79 (2010), que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad), procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por transferencia de ARN a proteínas tal como arginilación y ubiquitinación.

En un ejemplo, la derivatización es una amidación C-terminal. La amidación C-terminal de un péptido elimina la carga negativa del grupo carboxilo C-terminal. Los derivados peptídicos que tienen una amida C-terminal se pueden representar con "NH₂" en el extremo C, por ejemplo KLTCLASYCWLF-NH₂. Otra derivatización es la acetilación N-terminal. Esto elimina la carga positiva en el extremo N. El bloqueo del extremo C o N, tal como mediante amidación C-terminal o acetilación N-terminal, puede mejorar la estabilidad proteolítica debido a la susceptibilidad reducida a la digestión exoproteolítica.

"Administrar", como se usa en el presente documento, significa dar un compuesto procoagulante de la presente

divulgación, o una composición farmacéutica que contiene un compuesto procoagulante de la presente divulgación, a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) que lo necesite a través de una vía de administración farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, la vía de administración es parenteral. En un aspecto, el compuesto procoagulante de la presente divulgación se administra por vía subcutánea. En algunos aspectos, la vía de administración es intravenosa, por ejemplo, inyección intravenosa o infusión intravenosa. En otros aspectos, la vía de administración se selecciona de entre administración subcutánea, intramuscular, oral, nasal y pulmonar. En otros aspectos, la vía de administración se selecciona de entre subcutánea e intravenosa. Los compuestos procoagulantes de la invención se pueden administrar como parte de una composición farmacéutica que comprende al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

10

La expresión "área bajo la curva de concentración en plasma frente al tiempo (AUC)", como se usa en el presente documento, es igual que el término de la técnica en farmacología, y se basa en la velocidad y el grado de absorción del compuesto después de la administración. El AUC se determina durante un periodo de tiempo especificado, tal como 12, 18, 24, 36, 48 o 72 horas, o para el infinito utilizando la extrapolación basada en la pendiente de la curva. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, el AUC se determina para el infinito. La determinación de AUC puede llevarse a cabo en un solo sujeto, o en una población de sujetos para los que se calcula el promedio.

15

"Cantidad equivalente", como se usa en el presente documento, significa la misma cantidad de actividad de FVIII que se expresa en Unidades Internacionales, que es independiente del peso molecular del polipéptido en cuestión. Una unidad internacional (UI) de actividad de FVIII corresponde aproximadamente a la cantidad de FVIII en un mililitro de plasma humano normal. Existen varios ensayos para medir la actividad de FVIII, incluido el ensayo de sustrato cromógeno de la Farmacopea Europea y un ensayo de coagulación en una etapa.

20

"Intervalo de dosificación", como se usa en el presente documento, significa la cantidad de tiempo que transcurre entre las múltiples dosis que se administran a un sujeto. La comparación del intervalo de dosificación puede llevarse a cabo en un único sujeto o en una población de sujetos y luego puede calcularse el promedio obtenido en la población.

25

El término «tratamiento a demanda», como se usa en el presente documento, significa un tratamiento que está destinado a llevarse a cabo en un periodo de tiempo breve y que sea en respuesta a una afección existente, tal como un episodio hemorrágico, o una necesidad percibida, tal como una cirugía planeada. Las afecciones que pueden requerir tratamiento a demanda incluyen, por ejemplo, un episodio hemorrágico, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, traumatismo, trauma de la cabeza, hemorragia gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia en el espacio retrofaríngeo, hemorragia en el espacio retroperitoneal o hemorragia en la vaina del iliopsoas. El sujeto puede necesitar profilaxis quirúrgica, manejo perioperatorio o tratamiento para cirugía. Dichas cirugías incluyen, por ejemplo, cirugía menor, cirugía mayor, extracción de dientes, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo total de rodilla, craneotomía, osteosíntesis, cirugía de trauma, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica o cirugía de reemplazo de articulaciones.

40

Preferentemente, el tratamiento a demanda resuelve más del 80 % (más del 80 %, más del 81 %, más del 82 %, más del 83 %, más del 84 %, más del 85 %, más del 86 %, más del 87 %, más del 88 %, más del 89 %, más del 90 %, más del 91 %, más del 92 %, más del 93 %, más del 94 %, más del 95 %, más del 96 %, más del 97 %, más del 98 %, más del 99 %, o el 100 %) o el 80-100 %, 80-90 %, 85-90 %, 90-100 %, 90-95 %, o el 95-100 % de las hemorragias (por ejemplo, hemorragias espontáneas) en una sola dosis. Preferentemente, más del 80 % (más del 81 %, más del 82 %, más del 83 %, más del 84 %, más del 85 %, más del 86 %, más del 87 %, más del 88 %, más del 89 %, más del 90 %, más del 91 %, más del 92 %, más del 93 %, más del 94 %, más del 95 %, más del 96 %, más del 97 %, más del 98 %, o el 100 %) o el 80-100 %, 80-90 %, 85-90 %, 90-100 %, 90-95 %, o el 95-100 % de los episodios de sangrado son calificados como excelentes o buenos por los médicos después del tratamiento a demanda. Preferentemente, más del 5 %, (más del 6 %, más del 7 %, más del 8 %, más del 9 %, más del 10 %, más del 11 %, más del 12 %, más del 13 %, más del 14 %, más del 15 %, más del 16 %, más del 17 %, más del 18 %, más del 19 %, más del 20 %), o el 5-20 %, 5-15 %, 5-10 %, 10-20 %, o el 10-15 % de los episodios de sangrado son calificados como buenos por los médicos después del tratamiento a demanda.

50

El término «tratamiento profiláctico», como se usa en el presente documento, significa administrar un compuesto procoagulante de la presente divulgación a un sujeto durante un periodo de tiempo para aumentar el nivel de actividad en el plasma de un sujeto. Preferentemente, el nivel aumentado es suficiente para disminuir la incidencia de hemorragia espontánea o para prevenir hemorragias, por ejemplo, en el caso de una lesión imprevista. Preferentemente, durante el tratamiento profiláctico, el nivel de proteína en plasma en el sujeto no cae por debajo del nivel inicial para ese sujeto, o por debajo del nivel que caracteriza la hemofilia grave.

60

Preferentemente, el régimen de profilaxis se "adapta" al paciente individual, preferentemente determinando los datos de PK para cada paciente y administrando el compuesto procoagulante de la presente divulgación en un intervalo de dosificación que mantiene un nivel mínimo equivalente al 1-3 % de actividad de FVIII. Se pueden hacer ajustes cuando un sujeto experimenta episodios hemorrágicos inaceptables definidos como ≥ 2 episodios de sangrado espontáneo durante un periodo de dos meses consecutivos. En este caso, el ajuste se dirigirá a niveles mínimos del 3-5 %. Preferentemente, el tratamiento profiláctico da como resultado la prevención y el control de la hemorragia, el control sostenido de la hemorragia, la protección sostenida contra la hemorragia, y/o el beneficio sostenido. Preferentemente, la profilaxis no produce episodios de sangrado espontáneo dentro de aproximadamente 24, 36, 48, 72 o 96 horas (por ejemplo, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, o 96 horas, preferentemente en 72 horas), después del tratamiento (por ejemplo, la última inyección). Preferentemente, la profilaxis da como resultado más del 30 % (por ejemplo, más del 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o el 90 %, preferentemente más del 50 %), de reducción media en los episodios de hemorragia al año con una dosificación de una vez a la semana (por ejemplo, con dosificación una vez por semana).

"Sujeto", como se usa en el presente documento, significa un mamífero humano o no humano. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, ratones, perros, primates, monos, gatos, caballos, vacas, cerdos y otros animales domésticos y animales pequeños. En una realización, el sujeto es un paciente humano.

El término "dosis terapéutica", como se usa en el presente documento, significa una dosis que logra un objetivo terapéutico, como se describe en el presente documento. Las dosis terapéuticas que pueden usarse en los procedimientos de la descripción son de aproximadamente 10-100 mg/kg, más específicamente, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, o 90-100 mg/kg, y más específicamente, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 mg/kg.

Adicionalmente, las dosis terapéuticas que pueden usarse en los procedimientos de la descripción son de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 mg/kg, más específicamente, aproximadamente 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150 mg/kg, y más específicamente, aproximadamente 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 mg/kg.

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento para un intervalo, modifica ambos extremos del intervalo. Por lo tanto, "aproximadamente 10 - 20" significa "de aproximadamente 10 a aproximadamente 20".

Por "actividad procoagulante" se entiende la capacidad de promover la generación de trombina y/o el depósito de fibrina en un sistema de ensayo adecuado. Ensayos ejemplares útiles para medir la actividad procoagulante de un compuesto o conjugado del presente se describen en el presente documento e incluyen, por ejemplo, ensayos de generación de FXa (véase, por ejemplo, el ejemplo 2), ensayos de generación de trombina (véase, por ejemplo, el ejemplo 3), y ensayos ROTEM (véase, por ejemplo, el ejemplo 4).

El término "variante de anticuerpo" o "anticuerpo modificado" incluye un anticuerpo que no se produce en la naturaleza y que tiene una secuencia de aminoácidos o una química de cadena lateral de aminoácidos que difiere de la de un anticuerpo de origen natural en al menos un aminoácido o modificación de aminoácidos como se describe en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "variante de anticuerpo" incluye formas sintéticas de anticuerpos que se alteran de manera que no son de origen natural, por ejemplo, anticuerpos que comprenden al menos dos partes de cadena pesada pero no dos cadenas pesadas completas (tales como, por ejemplo, anticuerpos con dominio eliminado) o minicuerpos; formas multiespecíficas de anticuerpos (por ejemplo, biespecíficos, triespecíficos, etc.) alterados para unirse a dos o más antígenos diferentes o a diferentes epítopos en un único antígeno; moléculas de cadena pesada unidas a moléculas scFv; anticuerpos monocatenarios; diacuerpos; triacuerpos; y anticuerpos con función efectora alterada y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "molécula scFv" incluye moléculas de unión que consisten en un dominio variable de cadena ligera (VL) o una parte del mismo, y un dominio variable de cadena pesada (VH) o una parte del mismo, donde cada dominio variable (o parte del mismo) se deriva de los mismos o diferentes anticuerpos. Las moléculas scFv comprenden preferentemente un enlazador de scFv interpuesto entre el dominio VH y el dominio VL. Las moléculas ScFv se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en patente de EE. UU. 5.892.019, Ho et al. 1989. Gene 77:51; Bird et al. 1988 Science 242:423; Pantoliano et al. 1991. Biochemistry 30:10117; Milenic et al. 1991. Cancer Research 51:6363; Takkinen et al. 1991. Protein Engineering 4:837.

Un "enlazador de scFv", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto interpuesto entre los dominios VL y VH de la scFv. Los enlazadores de scFv mantienen preferentemente la molécula scFv en una conformación de unión a antígeno. En una realización, un enlazador de scFv comprende o consiste en un péptido enlazador de scFv.

- 5 En ciertas realizaciones, un péptido enlazador de scFv comprende o consiste en un enlazador polipeptídico de gly-ser. En otras realizaciones, un enlazador de scFv comprende un enlace disulfuro.

Como se usa en el presente documento, el término "enlazador polipeptídico de gly-ser" se refiere a un péptido que consiste en residuos de glicina y serina. Un enlazador polipeptídico gly/ser ejemplar comprende la secuencia de aminoácidos (Gly4 Ser)_n. En una realización, n=1. En una realización, n=2. En otra realización, n=3, es decir, (Gly4 Ser)₃. En otra realización, n=4, es decir, (Gly4 Ser)₄. En otra realización, n=5. En otra realización más, n=6. En otra realización, n=7. En otra realización más, n=8. En otra realización, n=9. En otra realización más, n=10. Otro enlazador polipeptídico gly/ser ejemplar comprende la secuencia de aminoácidos Ser(Gly4Ser)_n. En una realización, n=1. En una realización, n=2. En una realización preferida, n=3. En otra realización, n=4. En otra realización, n=5. En otra
15 realización más, n=6.

El término "glucosilación" se refiere a la unión covalente de uno o más carbohidratos a un polipéptido. Típicamente, la glucosilación es un evento postraducciona que puede ocurrir dentro del medio intracelular de una célula o extracto de la misma. El término glucosilación incluye, por ejemplo, glucosilación unida a N (cuando uno o más azúcares están
20 unidos a un residuo de asparagina) y/o glucosilación unida a O (donde uno o más azúcares están unidos a un residuo de aminoácido que tiene un grupo hidroxilo (por ejemplo, serina o treonina). En una realización, una molécula de la invención está glucosilada. En otra realización, una molécula de la invención está aglucosilada. En otra realización más, una molécula de la invención tiene una glucosilación reducida en comparación con la de región de Fc de tipo silvestre.

25 Como se usa en el presente documento, el término "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas IgG de origen natural, las regiones CH1 y CL se unen por enlaces disulfuro nativos y las dos cadenas pesadas se unen por dos enlaces disulfuro nativos en las posiciones
30 correspondientes a 239 y 242 utilizando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración de la UE).

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en el presente documento para hacer referencia a vectores usados de acuerdo con la presente invención como un vehículo para introducir y expresar un polinucleótido deseado en una
35 célula. Como se conoce por los expertos en la materia, dichos vectores se pueden seleccionar fácilmente a partir del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción adecuados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicar en células eucariotas o procariotas.

40 Se pueden emplear numerosos sistemas de vectores de expresión para producir los conjugados de la invención. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que se derivan de virus animales tales como virus de papiloma bovino, virus de polioma, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Adicionalmente, las células que tienen el ADN integrado en sus cromosomas se pueden seleccionar introduciendo uno o más marcadores que permiten la selección de células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionar
45 prototrofia a un huésped auxotrófico, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados, tales como cobre. El gen marcador seleccionable puede estar unido directamente a las secuencias de ADN a expresar, o introducirse en la misma célula por cotransformación. En una realización, se puede emplear un sistema de expresión inducible. Los elementos adicionales también se pueden necesitar para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, secuencias de corte y empalme, así como promotores transcripcionales,
50 potenciadores y señales de terminación. En una realización, una señal de secreción, por ejemplo, cualquiera de varios péptidos líderes bacterianos bien caracterizados (por ejemplo, pelB, phoA o ompA), puede fusionarse en el marco al extremo N de un polipéptido de la invención para obtener una secreción óptima del polipéptido. (Lei et al. (1988), Nature, 331:543; Better et al. (1988) Science, 240:1041; Mullinax et al., (1990). PNAS, 87:8095).

55 El término "célula huésped" se refiere a una célula que se ha transformado con un vector construido usando técnicas de ADN recombinante y que codifica al menos un gen heterólogo. En las descripciones de procesos para el aislamiento de proteínas de huéspedes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable para representar la fuente de proteínas a menos que se especifique claramente otra cosa. En otras palabras, la recuperación de proteínas de las "células" puede significar de células enteras centrifugadas, o del cultivo celular que
60 contiene tanto el medio como las células suspendidas. La línea celular huésped usada para la expresión de proteína

es, de la manera más preferente, de origen mamífero; los expertos en la materia tienen la capacidad de determinar, preferentemente, líneas celulares huésped particulares que son más adecuadas para el producto génico deseado a expresar en el mismo. Las líneas celulares huésped incluyen, pero sin limitación, DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno SV40 T), R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). Las células CHO son particularmente preferidas. Las líneas celulares huésped típicamente se encuentran disponibles en servicios comerciales, la Colección Americana de Cultivos Tipo o en la bibliografía publicada. Los conjugados de la invención también se pueden expresar en células no de mamíferos tales como células de bacterias o levaduras o vegetales. A este respecto, se apreciará que también pueden transformarse diversos microorganismos unicelulares no mamíferos tales como bacterias; es decir, aquellos capaces de crecer en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son susceptibles de transformación, incluyen miembros de las enterobacterias, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Además, se apreciará que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos normalmente forman parte de los cuerpos de inclusión. Los conjugados polipeptídicos se deben aislar, purificar y después ensamblar en moléculas funcionales.

Además de los procariotas, también se pueden usar microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el más comúnmente usado entre los microorganismos eucariotas, aunque hay muchas otras cepas comúnmente disponibles, incluida *Pichia pastoris*. Para expresión en *Saccharomyces*, comúnmente se usa el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb et al., (1979), *Nature*, 282:39; Kingsman et al., (1979), *Gene*, 7:141; Tschemper et al., (1980), *Gene*, 10:157). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecimiento en triptófano, por ejemplo, ATCC N.º 44076 o PEP4-1 (Jones, (1977), *Genetics*, 85:12). La presencia de la lesión *trp1* como una característica del genoma de célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

Como se usa en el presente documento, el término "sitio de escisión" se refiere a un sitio reconocido por una enzima. En una realización, dicha enzima es una que se activa durante la cascada de coagulación, de modo que la escisión de dichos sitios se produce en el sitio de formación de coágulos. Sitios de este tipo ejemplares incluyen aquellos reconocidos por trombina, Factor XIa o Factor Xa

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

"Factor de coagulación sanguínea" o "factor de coagulación" como se usa en el presente documento significa FVIIa, FVIII o FIX.

"Cultivo", "para cultivar" y "que cultiva", como se usa en el presente documento, significa incubar células en condiciones *in vitro* que permitan el crecimiento o división celular o el mantenimiento de células en un

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan de forma intercambiable y se refieren a un compuesto polimérico compuesto por residuos de nucleótidos unidos de manera covalente. Los polinucleótidos pueden ser ADN, ADNc, ARN, monocatenario o bicatenario, vectores, plásmidos, fagos o virus.

El término "variante", como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere del polinucleótido o polipéptido original, pero que conserva sus propiedades esenciales, por ejemplo, la actividad coagulante de FVIII, o la actividad de Fc (unión a FcRn). Normalmente, las variantes son, en general, muy similares, y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o polipéptido original. Las variantes incluyen, por ejemplo, fragmentos polipeptídicos y de polinucleótidos, eliminaciones, inserciones y versiones modificadas de polipéptidos originales.

Las variantes de origen natural se denominan «variantes alélicas» y se refieren a una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus determinado en un cromosoma de un organismo (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985)). Estas variantes alélicas pueden variar a nivel de polinucleótido y/o el polipéptido y están incluidas en la presente invención. Como alternativa, las variantes no naturales se pueden producir mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

Usando los procedimientos conocidos de ingeniería de proteínas y tecnología de ADN recombinante, se pueden generar variantes para mejorar o alterar las características de los polipéptidos. Por ejemplo, uno o más aminoácidos

se pueden eliminar del extremo N o del extremo C de la proteína secretada sin pérdida sustancial de la función biológica. Los autores de Ron et al., *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993) informaron sobre variantes de proteínas KGF que tenían actividad de unión a heparina incluso después de eliminar 3, 8 o 27 residuos de aminoácidos amino terminales. De forma similar, el interferón gamma mostró una actividad hasta diez veces mayor después de eliminar 5 8-10 residuos de aminoácidos del extremo carboxi de esta proteína. (Dobeli et al., *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988).)

Además, una amplia evidencia demuestra que las variantes a menudo conservan una actividad biológica similar a la de la proteína de origen natural. Por ejemplo, Gayle y colaboradores (*J. Biol. Chem* 268:22105-22111 (1993)) llevaron a cabo un extenso análisis mutacional de la citocina humana IL-1a. Utilizaron mutagénesis aleatoria para generar más 10 de 3.500 mutantes de IL-1a individuales que promediaron 2,5 cambios de aminoácidos por variante en toda la longitud de la molécula. Se examinaron múltiples mutaciones en cada posible posición de aminoácido. Los investigadores descubrieron que "la mayor parte de la molécula podría alterarse con poco efecto sobre la actividad de unión o biológica". De hecho, solo 23 secuencias de aminoácidos únicas, de más de 3.500 secuencias de nucleótidos examinadas, produjeron una proteína que difería significativamente en la actividad del tipo silvestre.

15 Como se ha indicado anteriormente, las variantes polipeptídicas incluyen, por ejemplo, polipéptidos modificados. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfotidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces 20 disulfuro, desmetilación, formación de enlaces cruzados covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación (Mei et al., *Blood* 116:270-79 (2010)), procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por transferencia de RNA para proteínas tales como arginilación y ubiquitinación.

25 Por un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia, se pretende que la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico sea idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de nucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un ácido 30 nucleico que tenga una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede eliminarse o sustituirse con otro nucleótido, o se pueden insertar varios nucleótidos hasta el 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia en la secuencia de referencia.

35 Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" a una secuencia de aminoácidos problema de la presente invención, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto sea idéntica a la secuencia problema, excepto que la secuencia polipeptídica objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos problema. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de 40 aminoácidos problema, hasta un 5 % de los residuos de aminoácidos en la secuencia objeto pueden insertarse, eliminarse, (indeles) o sustituirse con otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

45 En la práctica, si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % idéntico a una secuencia de nucleótidos o polipéptido de la presente invención puede determinarse de manera convencional utilizando programas informáticos conocidos. Un procedimiento preferido para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia problema (secuencia de referencia u original) y una 50 secuencia objeto, también denominada alineación de secuencia global, puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al. (*Comp. App. Biosci.* (1990) 6:237-245). En una alineación de secuencias, las secuencias problema y objeto son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN se puede comparar convirtiendo U en T. El resultado de dicha alineación de secuencia global está en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en una alineación FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de 55 identidad son Matriz = Unitaria, k-tupla = 4, Penalización por desemparejamiento = 1, Penalización de unión = 30, Longitud del grupo de aleatorización = 0, Puntuación de corte = 1, Penalización por huecos = 5, Penalización por tamaño de huecos 0,05, Tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos objeto, la que sea más corta.

60 Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia problema debido a eliminaciones 5' o 3', no debido a

eliminaciones internas, se debe realizar una corrección manual de los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos 5' y 3' de la secuencia objeto al calcular el porcentaje de identidad. Para secuencias objeto truncadas en los extremos 5' o 3', con respecto a la secuencia consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de bases de la secuencia consulta que son 5' y 3' de la secuencia objeto, que no están emparejadas/alineadas, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia consulta. Si un nucleótido está emparejado/alineado se determina con los resultados de la alineación de secuencias FASTDB. Este porcentaje se resta entonces del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB mencionado anteriormente utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación corregida es la que se usa para los fines de la presente invención. Solo las bases fuera de las bases 5' y 3' de la secuencia objeto, como se muestra mediante la alineación FASTDB, que no se emparejan/alinean con la secuencia problema, se calculan con el propósito de ajustar manualmente la puntuación del porcentaje de identidad.

Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 bases se alinea con una secuencia consulta de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las eliminaciones se producen en el extremo 5' de la secuencia objeto y, por lo tanto, la alineación FASTDB no muestra un emparejamiento/alineación de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases no emparejadas representan el 10 % de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' no emparejadas/número total de bases en la secuencia consulta), por lo que el 10 % se resta de la puntuación de porcentaje de identidad que se calcula con el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes estuvieran perfectamente emparejadas, el porcentaje de identidad final sería 90 %. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 bases con una secuencia consulta de 100 bases. Esta vez, las eliminaciones son eliminaciones internas, de manera que no hay bases en 5' o 3' de la secuencia objeto que no están emparejadas/alineadas con la secuencia consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solo las bases 5' y 3' de la secuencia objeto que no están emparejadas/alineadas con la secuencia consulta se corrigen manualmente. No se realizan otras correcciones manuales para los fines de la presente invención.

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia consulta debido a eliminaciones en N o C-terminal, no debido a eliminaciones internas, se debe realizar una corrección manual de los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos N y C-terminales de la secuencia objeto al calcular el porcentaje de identidad global. Para secuencias objeto truncadas en los extremos N y C, con respecto a la secuencia consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de residuos de la secuencia consulta que son N y C-terminales de la secuencia objeto, que no están emparejadas/alineadas con un residuo objeto correspondiente, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia consulta. Si un residuo está emparejado/alineado se determina por los resultados de la alineación de secuencias FASTDB. Este porcentaje se resta entonces del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB mencionado anteriormente utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación de porcentaje de identidad final es la que se usa para los fines de la presente invención. Solamente los residuos en los extremos N y C de la secuencia objeto, que no están emparejados/alineados con la secuencia consulta, se consideran con el propósito de ajustar manualmente la puntuación de porcentaje de identidad. Es decir, solo el residuo problema se sitúa fuera de los residuos N y C-terminales más lejanos de la secuencia objeto.

Por ejemplo, una secuencia objeto de residuos de 90 aminoácidos se alinea con una secuencia consulta de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La eliminación se produce en el extremo N de la secuencia objeto y, por lo tanto, la alineación FASTDB no muestra un emparejamiento/alineación de los primeros 10 residuos en el extremo N-terminal. Los 10 residuos no emparejados representan el 10 % de la secuencia (número de residuos en los extremos N y C no emparejados/número total de residuos en la secuencia consulta), por lo que el 10 % se resta de la puntuación de porcentaje de identidad que se calcula por el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes coincidieran perfectamente, el porcentaje de identidad final sería del 90 %. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 residuos con una secuencia consulta de 100 residuos. Esta vez, las eliminaciones son eliminaciones internas, de manera que no hay residuos en los extremos N o C de la secuencia objeto que no se emparejen/estén alineados con la secuencia consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solo las posiciones de residuos fuera de los extremos N y C-terminales de la secuencia objeto, como se muestra en la alineación FASTDB, que no están emparejados/alineados con la secuencia consulta, se corrigen manualmente. No se realizarán otras correcciones manuales para los fines de la presente invención.

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

Ejemplo 1

Preparación de compuestos

Los compuestos de la presente divulgación (es decir, péptidos) se sintetizaron mediante síntesis peptídica en fase sólida usando la química de 9-fluorenilmetoxycarbonilo/butilo terciario (Fmoc/tBu). El calentamiento se realizó usando un horno de microondas u otros medios. En la mayoría de los casos, los péptidos se sintetizaron en una escala de 0,1 mmol usando una resina Rink Amide de NovaPEG (recipiente de reacción de 35 ml). Los procedimientos estándar para la carga de resina, el acoplamiento de aminoácidos, la desprotección con Fmoc y las etapas de lavado se realizaron en un sintetizador de péptidos CEM Liberty, mientras que la escisión del péptido con ácido trifluoroacético (TFA) se realizó manualmente. En resumen, 5 eq. de aminoácidos protegidos con Fmoc disueltos en *N,N*-dimetilformamida (DMF) se unieron posteriormente a la resina en presencia de 5 eq. de hexafluorofosfato de 2(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HCTU) y 10 eq. de (diisopropiletilamina) DIPEA. El procedimiento de microondas para la etapa de acoplamiento fue un acoplamiento único a 75 °C (20 W durante 300 s), excepto para cisteína e histidina a 50 °C (0 W durante 120 s, 20 W durante 240 s), y la arginina se acopló por duplicado a 75 °C (0 W durante 1500 s, 20 W durante 300 s). La desprotección con Fmoc se realizó con piperazina al 5 %, 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) 0,1 M en DMF a 75 °C (45 W durante 30 s, 45 W durante 180 s). La mayoría de los aminoácidos y los reactivos de acoplamiento se adquirieron de Novabiochem EMD.

Después de la síntesis peptídica automatizada, los péptidos se escindieron de la resina con TFA al 95 % y triisopropilsilano (TIPS) al 5 % durante 4 horas. Los péptidos que contenían metionina se escindieron de la resina con una mezcla de TFA al 95 %, TIPS al 2,5 % y etanoditiol (EDT) al 2,5 %. A continuación, los péptidos se filtraron en matraces de reacción de fondo redondo y, en el caso de los péptidos que contenían metionina, se añadió bromotrimetilsilano (TMSBr) al 2,5 %. Los disolventes se eliminaron al vacío y los concentrados que contenían los péptidos se precipitaron y se trituraron adicionalmente con éter dietílico (Et₂O) enfriado con hielo. Los péptidos sintetizados fueron confirmados por análisis espectral de masas.

Algunos de los péptidos requerían modificaciones antes de la escisión de la resina, por ejemplo, los péptidos que contienen bucles de lactama. En este caso, los grupos de protección ortogonales aliloxycarbonilo (Alloc) y alilo o metiltritilo (Mtt) y 2-fenilisopropilo (2-PhiPr) se eliminaron mediante tratamiento con Pd[P(Ph)₃]₄ o TFA al 1 %, respectivamente. La posterior formación de lactama entre el ácido carboxílico y las cadenas laterales de amina se produjo en presencia de 10 eq. de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP) y 10 eq. de DIPEA en DMF.

Purificación de péptidos

Los péptidos sintetizados se purificaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa preparativa (RP-HPLC) usando el controlador Waters 600 y el sistema de bombeo con detector de UV 2489 y colector de fracciones III. Las purificaciones se realizaron típicamente en una columna Phenomenex Jupiter C18 de 10 micrones de 250 x 21,20 mm con un caudal de 20 ml/min. El gradiente de acetonitrilo/agua (TFA al 0,1 %) se modificó para cada péptido específico en función de la hidrofobicidad. Los péptidos se detectaron a dos longitudes de onda 228 y 280 nm, y las fracciones se analizaron adicionalmente mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). Las fracciones que contenían el péptido de pureza adecuada se agruparon, se congelaron instantáneamente y se liofilizaron.

Caracterización de péptidos

Los péptidos se caracterizaron por LC-MS (Agilent LC-MS TOF 6220 con bomba de la serie 1200, manipulador automático y sistema de detección de UV). La separación por LC se realizó en una columna Phenomenex Jupiter C18 de 5 micrones, 250 x 2,00 mm, usando una fase móvil de A (agua + ácido fórmico al 0,08 % + ácido trifluoroacético al 0,02 %) y B (acetonitrilo + ácido fórmico al 0,08 % + ácido trifluoroacético al 0,02 %). El procedimiento de LC general tuvo un gradiente del 0-70 % de B durante 12 min. La determinación de la masa se logró mediante ionización por electropulverización en modo positivo. La pureza de los péptidos se determinó midiendo la absorbancia de la luz UV a 228 nm sobre el cromatograma.

Ejemplo 2

Ensayo de generación de FXa

Ensayo de cribado primario

La generación de FXa se utilizó para evaluar la capacidad de los compuestos de la presente divulgación para mejorar

las actividades catalíticas de FIXa y/o FVIIa.

Para medir la actividad catalítica de FIXa, FIXa se mezcló con FX y fosfolípidos en presencia de cloruro de calcio. En estas condiciones, FIXa divide el zimógeno FX en la forma activa FXa.

5

La generación de FXa se monitoriza mediante el cambio en la absorbancia de la reacción a 405 nm debido a la presencia de un sustrato cromógeno FXa escindible (S-2765; Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA; escisión de p-nitroanilina). Los componentes del ensayo se obtuvieron del kit de generación de FXa Coatest SP FVIII (Chromogenix) utilizado en la industria para evaluar la actividad de FVIII. El kit contiene todos los componentes para la generación FXa, sin embargo, FIXa y FX obtenidos de este kit son de origen bovino y se reemplazaron con FIXa humano purificado o FVIIa humano y FX humano (Haematologic Technologies).

10

El ensayo también se modificó para mejorar el rendimiento del cribado. En lugar de la adición secuencial, todos los componentes del ensayo se mezclaron y se añadieron simultáneamente al compuesto purificado a ensayar. Se preparó una mezcla de reacción de 125 µl de los componentes del ensayo en el tampón suministrado por el fabricante (Tris 50 mM, pH 7,3 y BSA al 1 %). La mezcla de reacción contenía hFIXa (12 nM), hFX (120 nM), sustrato S-2765 (720 µM), cloruro de calcio (5 mM) y fosfolípidos (8,3 µl de la mezcla de stock de fosfolípidos altamente purificados suministrados) basándose en las recomendaciones del kit. La mezcla de reacción (125 µl) se añadió después a 25 µl de compuesto diluido en agua en una placa de 96 pocillos de fondo plano Costar-3651. Esto dio como resultado una concentración de reacción final de hFIXa 10 nM, hFX 100 nM, sustrato S-2765 de FXa 600 µM y cloruro de calcio 4,17 mM. La absorbancia se monitorizó durante un período de 1 hora a 405 nm usando un lector de placas (Synergy 2, Biotek).

15

20

Los datos de absorbancia a 405 nm se analizaron para obtener la pendiente de la primera derivada que refleja la tasa de cambio en la absorbancia. Los datos de la pendiente de la primera derivada para cada concentración de compuesto se representaron frente a la concentración del compuesto y se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros para obtener los valores de CE50 y Vmáx para cada compuesto ensayado.

25

De manera similar, para medir la actividad catalítica de FVIIa, se estableció un ensayo de generación de FXa que mide la capacidad de los compuestos de la presente divulgación para mejorar la actividad catalítica de FVIIa. La diferencia entre los dos ensayos fue que la concentración final de hFIXa 10 nM se reemplazó con hFVIIa 10 nM. Los reactivos restantes y los procedimientos de ensayo descritos anteriormente permanecieron sin cambios.

30

Km/K_{cat}

35

Para determinar la Km y Kcat de FIXa o FVIIa para el sustrato FX, se usó el ensayo de generación de FXa descrito anteriormente con las siguientes modificaciones. Se puso a prueba una concentración de péptido única (típicamente una que proporcionó la tasa máxima de generación de FXa) y la concentración de todos los componentes del ensayo fue similar a la descrita anteriormente, con la excepción de FX. Las reacciones se establecieron con concentraciones variables de FX que oscilaron entre 400 y 0,8 nM y las tasas de generación de FXa se determinaron para cada péptido en las diferentes concentraciones de FX puestas a prueba como se ha descrito anteriormente. Para cada péptido analizado, los datos se ajustaron a la siguiente ecuación que da la constante de Michaelis-Menten (Km) y la Vmáx para FIXa o FVIIa: $v = V_{\text{máx}} [\text{FX}] / K_m + [\text{FX}]$, donde v es la tasa de generación de FXa determinada como se describe anteriormente. La constante catalítica (Kcat) se calculó normalizando la Vmáx a la concentración de enzima.

40

45

Los compuestos ejemplares de la presente divulgación y sus actividades biológicas in vitro medidas usando el ensayo de generación de FXa como se ha descrito anteriormente (usando FIXa humano) se resumen en la tabla 1, a continuación. En la tabla 1, los péptidos están amidados (-CONH₂) en el extremo C y tienen un extremo N libre, a menos que se indique lo contrario.

50

Tabla 1

Compuestos ejemplares de la presente divulgación y sus actividades en el ensayo de generación FXa			
Secuencia	CE ₅₀ [µM]	Vmáx	
RRAPGKLQCLASYCWLFWTGIA (compuesto 25)	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 4
PLKWTASGCRWLGCQLARFAY (compuesto B)	(+)	(++)	SEQ ID NO: 5
L YTAWIKCQFARLPGCALSGRW (compuesto C)	>25	>0,6	SEQ ID NO: 6
Biotina-PEG ₂ -L YTAWIKCQFARLPGCALSGRW	>10	>1,5	SEQ ID NO: 7
RRAPG-k-NMeLeu-TCLASYCWLFWTGIA	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 9
k-NMeLeu-TCLASYCWLFWTGIA (compuesto 10)	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 10

RRAPGKLQCLASYCWLFWTGAA	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 11
RRAPGKLQCLASYCWLFWTAIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 12
RRAPGKLQCLASYCWLFWAGIA	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 13
RRAPGKLQCLASYCWLFATAIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 14
RRAPAKLQCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 15
RRAAGKLQCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 16
RAAPGKLQCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 17
ARAPGKLQCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 18
rRAAGKLTCLASYCWLFATGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 414
rRAAGKATCLASYCWLFATGIA	(++)	(++)	SEQ ID NO: 415
rRAAGKLTCLASACWLFATGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 416
rRAAGKLTCLASYCWLAATGIA	>10	>0,8	SEQ ID NO: 417
rRAAGKATCLASACWLAATGIA	>10	>3	SEQ ID NO: 418
rRASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 419
rRAPGKLTCLASYCWLFSTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 420
rRAPGKSTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 421
rRAPGKLTCLASSCWLFWTGIA	(++)	(++)	SEQ ID NO: 422
rRAPGKLTCLASYCWLSWTGIA	>5	>1,8	SEQ ID NO: 423
RRAPGKLQCLASYCWLFWTGI	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 19
RRAPGKLQCLASYCWLFWTG	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 20
RRAPGKLQCLASYCWLFWT	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 21
RRAPGKLQCLASYCWLFW	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 22
RRAPGKLQCLASYCWLF	>5	>1,1	SEQ ID NO: 23
RA _μ PGKLQCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 24
APGKLQCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 25
PGKLQCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 26
GKLQCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 27
KLQCLASYCWLFWTGIA	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 28
RRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA (compuesto 4)	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 29
RRAPGKLQCLASYCWLFWTGLA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 30
RRAPGKLQCLASYCWLFWTG-Nle-A	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 31
RRAPGKLQCLASYCWLFWTG-Tle-A	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 32
RRAPGKLQCLASYCWLFWTGFA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 33
RRAPGKLQCLASYCWLFWTG-Cha-A	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 34
RRAPGKLQCLASYCWLFWTG-(1-Nal)-A	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 35
RRAPGKLQCLASYCWLFWT-Aib-IA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 36
RRAPGKLQCLASYCWLFWTGIAAAAAGAP	(++)	(++)	SEQ ID NO: 37
RRAPGKLQCLASYCWLFWTGIG	(+)	(++)	SEQ ID NO: 38
RRAPGKLQCLASYCWLFWTGKA	>5	>1	SEQ ID NO: 39
RRAPGKLQCLASYCWLFWTKIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 40
RRAPGKLQCLASYCWLFWKGIA	>5	>1	SEQ ID NO: 41
RRAPGKLQCLASYCWLFKTGIA	>10	>0,2	SEQ ID NO: 42
RRAPKKLQCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 43
RRAKGKLQCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 44
RRKPGKLQCLASYCWLFWTGIA	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 45
RKAPGKLQCLASYCWLFWTGIA	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 46
KRAPGKLQCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 47
MeArg-RAPGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(+)	SEQ ID NO: 48
R-MeArg-APGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 49
RR-MeAla-PGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 50
RRAP-Sar-KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 51
RRAPG-MeLys-LTCLASYCWLFWTGIA	(++)	(++)	SEQ ID NO: 52
RRAPGK-MeLeu-TCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 53
RRAPGKL-MeThr-CLASYCWLFWTGIA	(+)	(+)	SEQ ID NO: 54
RRAPGKLTCL-MeLeu-ASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 55
RRAPGKLTCL-MeAla-SYCWFWTGIA	(++)	(++)	SEQ ID NO: 56
RRAPGKLTCL-MeSer-YCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 57

RRAPGKLTCLAS-MeTyr-CWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 58
RRAPGKLTCLASYC-MeTrp-LFWTGIA	>10	>1,1	SEQ ID NO: 59
RRAPGKL TCLASYCW-MeLeu-FWTGIA	>10		SEQ ID NO: 60
RRAPGKLTCLASYCWL-MePhe-WTGIA	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 61
RRAPGKLTCLASYCWLF-MeTrp-TGIA	(++)	(+)	SEQ ID NO: 62
RRAPGKLTCLASYCWLFW-MeThr-GIA	(++)	(+)	SEQ ID NO: 63
RRAPGKLTCLASYCWLFWT-Sar-IA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 64
RRAPGKLTCLASYCWLFWTG-Melle-A	>4	>2,3	SEQ ID NO: 65
RRAPGKLTCLASYCWLFWTGI-MeAla	(+)	(++)	SEQ ID NO: 66
rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA (compuesto 5)	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 67
RrAPGKL TCLASYCWLFWTGIA (compuesto 6)	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 68
RRaPGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 69
RRApGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 70
RRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 71
RRAPGKITCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 72
RRAPGKLtCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 73
RRAPGKLtCLASYCWLFWTGIA	(++)	(++)	SEQ ID NO: 74
RRAPGKLtCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 75
RRAPGKL TCLaSYCWLFWTGIA	(+)	(+)	SEQ ID NO: 76
RRAPGKLTCLAsYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 77
RRAPGKLTCLASyCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 78
RRAPGKLTCLASYcWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 79
RRAPGKLTCLASYCwLFWTGIA	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 80
RRAPGKLTCLASYCWIFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 81
RRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 82
RRAPGKLTCLASYCWLFwTGIA	(++)	(++)	SEQ ID NO: 83
RRAPGKLTCLASYCWLFwTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 84
RRAPGKLTCLASYCWLFwTGIA	(++)	(++)	SEQ ID NO: 85
RRAPGKLTCLASYCWLFwTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 86
CRRAPGKLQCLASYCWLFWTGIAC	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 87
CGGSGGRRAPGKLQCLASYCWLFWTGIAC	(+)	(++)	SEQ ID NO: 88
CRRAPGKLQCLASYCWLFWTGIAGGSGGC	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 89
CGGSGGRRAPGKLQCLASYCWLFWTGIAGGSGGC	(+)	(++)	SEQ ID NO: 90
PEG4-RRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 91
Glu (Biotinil-PEG)-RAPGKLTCLASYCWLFWTGIA	>4	>0,8	SEQ ID NO: 92
RK(PEG2-Biotina)APGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 93
RRK(PEG2-Biotina)PGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 94
RRAK(PEG2-Biotina)GKLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 95
RRAPK(PEG2-Biotina)KLTCLASYCWLFWTGIA (compuesto 20)	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 96
RRAPGK(PEG2-Biotina)LTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 97
RRAPGKK(PEG2-Biotina)TCLASYCWLFWTGIA	>5	>2	SEQ ID NO: 98
RRAPGKLK(PEG2-Biotina)CLASYCWLFWTGIA	(++)	(++)	SEQ ID NO: 99
RRAPGKLTCK(PEG2-Biotina)ASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 100
RRAPGKLTCLK(PEG2-Biotina)SYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 101
RRAPGKLTCLAK(PEG2-Biotina)YCWLFWTGIA (compuesto 18)	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 102
RRAPGKLTCLASK(PEG2-Biotina)CWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 103
RRAPGKLTCLASYCK(PEG2-Biotina)LFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 104
RRAPGKLTCLASYCWK(PEG2-Biotina)FWTGIA	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 105
RRAPGKLTCLASYCWLK(PEG2-Biotina)WTGIA	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 106
RRAPGKLTCLASYCWLFK(PEG2-Biotina)TGIA (compuesto 19)	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 107
RRAPGKLTCLASYCWLFWK(PEG2-Biotina)GIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 108
RRAPGKLTCLASYCWLFWTK(PEG2-Biotina)IA	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 109
RRAPGKLTCLASYCWLFWTGK(PEG2-Biotina)A	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 110
RRAPGKLTCLASYCWLFWTGIK(PEG2-Biotina)	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 111

RRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA-PEG4	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 112
QWQIAGQVLK RRAPA KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 113
LQLSYGEQRQ SRAPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 114
WMSAEGIVGV RRATG KLTCLASYCWLFWTGIA			SEQ ID NO: 115
TSGPFGFGGS SRAQG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 116
HLFGADWLGA RTAPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 117
QRAGRVARLH RRAPN KLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 118
WRAGLDESQR DRAPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 119
PSGWAGWAPG RREPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 120
AVDSLPLYGA RSAPS KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 121
ASVWGALALV RRASG KLTCLASYCWLFWTGIA			SEQ ID NO: 122
GYRVPVGGVL RRAHG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 123
TQWAQVGPRG RRAQG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 124
VGSGDERALP SRASG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 125
TLWPWGGQGG RNAPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 126
TGLLQGRRDE RARPP KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 127
RGGFFVWFLS RIAPG KLTCLASYCWLFWTGIA			SEQ ID NO: 128
RRAPGKLTCLASYCWLF STGVA THANTTATAQ	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 129
RRAPGKLTCLASYCWLF WAGFA ASTLAPAHHQ	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 130
RRAPGKLTCLASYCWLF WSGFA SLGGLLWPVA			SEQ ID NO: 131
RRAPGKLTCLASYCWLF WTGYA SGKPSRVYVI	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 132
RRAPGKLTCLASYCWLF WTGLS RYQWQAQEDV	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 133
RRAPGKLTCLASYCWLF GSGIS LSRAPESAAP	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 134
RRAPGKLTCLASYCWLF WTGWA VLARVPVGWT	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 135
RRAPGKLTCLASYCWLF WTGLA PGRGQGGVAG	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 136
RRAPGKLTCLASYCWLF WTGIA DRLVWGVIST			SEQ ID NO: 137
RRAPGKLTCLASYCWLF WTGFA FRVGLASSLY	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 138
RRAPGKLTCLASYCWLF WTGLA STLYKTYTRE	(+)	(++)	SEQ ID NO: 139
RRAPGKLTCLASYCWLF RTQIA TPESYRQQA	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 140
RRAPGKLTCLASYCWLF WAGYP SLRGSLLVGV	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 141
RRAPGKLTCLASYCWLF QTGWA YWGYRQHPSGS	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 142
RRAPGKLTCLASYCWLF WTGWC RDTASHACDS	(+)	(++)	SEQ ID NO: 143
RRAPGKLTCLASYCWLF WTGWS RDTASHASDS	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 144
RRAPGKLTCLASYCWLF WRGFA ERASEDTNQG	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 145
RRAPGKLTCLASYCWLF EPGIA QPYAKSPTRN	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 146
RRAPGKLTCLASYCWLF STPVA RKSLRRHQPT	>10	(++++)	SEQ ID NO: 147
PRIrTVGPGS RSASG KLTCLASYCWLFWTGIA (compuesto 21)	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 148
TVGPGSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA			SEQ ID NO: 424
PRIrTVGPGSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA			SEQ ID NO: 425
PRIrTVGPGSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA (compuesto 23)	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 426
PRIrTVGPGSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA-PEG4			SEQ ID NO: 427
PEG4-PRIrTVGPGSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA			SEQ ID NO: 428
PRIrTVGPGSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA-PEG4-Pra			SEQ ID NO: 429
Pra-PEG4-PRIrTVGPGSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA			SEQ ID NO: 430
Ac-PRIrTVGPGSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA			SEQ ID NO: 431
SRIRTVGPGSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 432
PSIRTVGPGSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 433
PRSRrTVGPGSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 434
PRISTVGPGRSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 435
PRIRSVGPGRSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 436
PRIRTSVGPGRSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 437
PRIRTVSPGRSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 438
PRIRTVSGSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 439
PRIRTVGPSSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 440
PRIRTVGPGRSRSASGKSTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 441

PRlRTVGPGSRsASGKSTCLASYCWLFWTGIA			SEQ ID NO: 442
PRlRTVGPGSRsASGKSTCLASYCWLFWTGIA-PEG4-Pra	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 443
Pra-PEG4-PRlRTVGPGSRsASGKSTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 444
SRlRTVGPGSRsASGKSTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 445
PRlRTVSPGSRsASGKSTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 446
SRI RTVSPGSRsASGKSTCLASYCWLFWTG IA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 447
PRSRTVGPGSRsASGKSTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 448
SRSRTVSPGSRsASGKSTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 449
K(PEG2-biotina)-PEG4- PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLFWTGIA			SEQ ID NO: 450
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLAWTGIA	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 451
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLLWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 452
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 453
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLFFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 454
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLFLWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 455
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLFWTSGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 456
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLFWTLIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 457
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLFWTFIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 458
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLFWTSIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 459
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLFWTGI	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 460
SRI RTVSPGSRsASGKSTCLASYCWLFWTG IA	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 461
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 462
PRlRTVGPGSRsASGKLSCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 463
PRlRTVGPGSRsASGKLTCAASYCWLFWTGIA	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 464
PRlRTVGPGSRsASGKLTCSASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 465
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 466
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLFWTSGIA	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 467
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASYCWLFWTGI	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 468
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASFCWLFWTGIA			SEQ ID NO: 469
PRlRTVGPGSRsASGKLTCLASACWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 470
PTDTGPVISGLRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 149
GSVRRALFVA ARAPA KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 150
RRFVGGSLSQ RRAPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 151
SKQGRPISPD RRAAG KLTCLASYCWLFWTGIA (compuesto 22)	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 152
SKQGRPISPDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA (compuesto 24)	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 471
SKQGRPISPDRRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA-PEG2- K(PEG2-Biotina)	(+)	(++)	SEQ ID NO: 472
SKQGRPISPDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGI	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 473
SKQGRPISPDrRAAGKL TCLASYCWLFWTG	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 474
SKQGRPISPDrRAAGKL TCLASYCWLFWT	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 475
SKQGRPISPDrRAAGKL TCLASYCWLFW	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 476
SKQGRPISPDrRAAGKL TCLASYCWLFW	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 477
AKQGRPISPDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 478
SAQGRPISPDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 479
SKAGRPISPDDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 480
SKQARPISPDDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 481
SKQGAPISPDDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 482
SKQGRAISPDDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 483
SKQGRPASPDDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 484
SKQGRPIAPDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 485
SKQGRPISADDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 486
SKQGRPISPArRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 487
SKQGRPISPDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA	>10	>0,5	SEQ ID NO: 488
SKQGRPISPDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA	>10	>2,4	SEQ ID NO: 489
SKQGRPISPDrRAAGKL TCLAS-NMeTyr-CWLFWTGIA	>10	>0,3	SEQ ID NO: 490

SKQGRPISPDrRAAGKLTCLASYCW-NMeLeu-FWTGIA	>10	>1,9	SEQ ID NO: 491
SKQGRPISSDrRAAGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 492
SKQGRPISSDrRAAGKSTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 493
SKQGRPISSDrRASGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 494
SKQGRPISSDrRASGKSTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 495
RPRSSAHRP RRAAG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 153
TALSRGLVTM RTAPD KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 154
PARGKERELM RRAPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 155
GRAMAAEPWP RQAPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 156
LYPRLYTPGS RRAYG KLTCLASYCWLFWTGIA	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 157
AQWVGRGQWA IRAPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 158
MQIRQAHQPR RSAPQ KLTCLASYCWLFWTGIA	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 159
PRTTANRRSS RRAA KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 160
PNLLRVRTSE VRNPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 161
SLISMTNPSG RRVPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 162
NGALGFRSVV PRAAG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 163
RSHSLDRMAG RRAPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 164
AVVRGQEPHT RRTPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 165
PQTRDPSSRD RRAPG KLTCLASYCWLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 166
RRAPGKLTCLASYCWLF LGGIA PEGASTRTAN	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 167
RRAPGKLTCLASYCWLF VTGTA HAPRVAPAPA	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 168
RRAPGKLTCLASYCWLF WTAVG GQPYMLLAWR	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 169
RRAPGKLTCLASYCWLF WAGIA PHRPLKERVER	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 170
RRAPGKLTCLASYCWLF WAVIA PPKVKGTRQS	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 171
RRAPGKLTCLASYCWLF ATGVT FPQIWAIPSP	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 172
RRAPGKLTCLASYCWLF YTGIA HGHPMEHRKS	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 173
RRAPGKLTCLASYCWLF LTGWA RVPLPPRPHP	(+)	(++)	SEQ ID NO: 174
RRAPGKLTCLASYCWLF WTGIA RWPSHRSGPS	(+)	(++)	SEQ ID NO: 175
RRAPGKLTCLASYCWLF WTTYA SYATKPADTT	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 176
RRAPGKLTCLASYCWLF FTGVA RSTTATTNTQ	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 177
RRAPGKLTCLASYCWLF WSGIA PQPPNMRPSV	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 178
RRAPGKLTCLASYCWLF WTTFA WVFVAVYGS			SEQ ID NO: 179
RRAPGKLTCLASYCWLF WTALA TLSVSMRSPF			SEQ ID NO: 180
RRAPGKLTCLASYCWLF WTTWT TAPTPPLTT	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 181
RRAPGKLTCLASYCWLF WTGLL DYPTPQSHEP	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 182
RRAPGKLTCLASYCWLF WTGIA LGHPPRPAPK			SEQ ID NO: 183
SKQGRPISPDRRAAGKLTCLASYCWLFSGISLSRAPE-SAAP	>10	(+)	SEQ ID NO: 496
RRAPGKLCALASYCWLFWTGIA-COOH	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 184
RRAPGKCTALASYCWLFWTGIA-COOH	(+)	(++)	SEQ ID NO: 185
RRAPGCLTALASYCWLFWTGIA-COOH	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 186
RRAPGKLTCLASYACLFWTGIA-COOH	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 187
RRAPGKLTCLASYAWCFWTGIA-COOH	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 188
RRAPGKLTCLASYAWLCWTGIA-COOH	>10	>0,5	SEQ ID NO: 189
RRAPGKLCALASYACLFWTGIA-COOH	>10	>0,3	SEQ ID NO: 190
RRAPGKCTALASYAWCFWTGIA-COOH	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 191
RRAPGCLTALASYAWLCWTGIA-COOH	>20	>0,1	SEQ ID NO: 192
RRAPGKLCALASYCWLFWTGIA-CONH ₂	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 497
RRAPGKCTALASYCWLFWTGIA-CONH ₂	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 498
RRAPGCLTALASYCWLFWTGIA-CONH ₂	(+)	(++)	SEQ ID NO: 499
RRAPGKLTCLASYACLFWTGIA-CONH ₂	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 500
RRAPGKLTCLASYAWCFWTGIA-CONH ₂	>20	(+)	SEQ ID NO: 501
RRAPGKLTCLASYAWLCWTGIA-CONH ₂	>10	(+)	SEQ ID NO: 502
RRAPGKLCALASYACLFWTGIA-CONH ₂	>10	(+)	SEQ ID NO: 503
RRAPGKCTALASYAWCFWTGIA-CONH ₂	(+)	(++)	SEQ ID NO: 504
RRAPGCLTALASYAWLCWTGIA-CONH ₂	(+)	(++)	SEQ ID NO: 505
RRAPG KLT-Lys-LASY-Asp-WLFWTGIA-COOH	>10	>0,5	SEQ ID NO: 193

RRAPG KLT-Asp-LASY-Lys-WLFWTGIA-COOH	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 194
RRAPGKLT-Orn-LASY-Asp-WLFWTGIA-COOH	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 195
RRAPGKLT-Asp-LASY-Orn-WLFWTGIA-COOH	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 196
RRAPGKLT-Dab-LASY-Asp-WLFWTGIA-COOH	(++)	(++)	SEQ ID NO: 506
RRAPGKLT-Asp-LASY-Dab-WLFWTGIA-COOH	>10	>1,0	SEQ ID NO: 197
RRAPGKLT-Dap-LASY-Asp-WLFWTGIA-COOH	>10	>0,8	SEQ ID NO: 198
RRAPGKLT-Asp-LASY-Dap-WLFWTGIA-COOH	(+)	(++)	SEQ ID NO: 199
RRAPGKLT-Lys-LASY-Glu-WLFWTGIA-COOH	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 507
RRAPGKLT-Lys-LASY-Asp-WLFWTGIA-CONH ₂	(+)	(++)	SEQ ID NO: 508
RRAPGKLT-Asp-LASY-Lys-WLFWTGIA-CONH ₂	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 509
RRAPGKLT-Orn-LASY-Asp-WLFWTGIA-CONH ₂	>10	(+)	SEQ ID NO: 510
RRAPGKLT-Asp-LASY-Orn-WLFWTGIA-CONH ₂	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 511
RRAPGKLT-Dab-LASY-Asp-WLFWTGIA-CONH ₂	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 512
RRAPGKLT-Dap-LASY-Asp-WLFWTGIA-CONH ₂	>10	(+)	SEQ ID NO: 513
RRAPGKLT-Asp-LASY-Dap-WLFWTGIA-CONH ₂	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 514
RRAPGKLT-Lys-LASY-Glu-WLFWTGIA-CONH ₂	(+)	(++)	SEQ ID NO: 515
RRAPGKLT-Asp-LASY-Dab-WLFWTGIA-CONH ₂	>10	(++)	SEQ ID NO: 516
SKQGRPISPDRRAAGKLT-Asp-LASY-Orn-WLFWTGIA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 517
RRAPGKLT-Asp-LASY-Orn-WLFGSGISLRAPESAAP			SEQ ID NO: 518
PRIRTVGPGRSASGKLT-Asp-LASY-Orn-WLFWTGIA			SEQ ID NO: 519
RRFVGGSLSQRRAPGKLT-Asp-LASY-Orn-WLFWTGIA			SEQ ID NO: 520
PQTRDPSSRDRRAPGKLT-Asp-LASY-Orn-WLFWTGIA			SEQ ID NO: 521
C(PEG5k)GGG-RRAPGKLT-Asp-LASY-Lys-WLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 522
CGGG-RRAPGKLT-Asp-LASY-Lys-WLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 523
CGGGLVPRGGG-RRAPGKLT-Asp-LASY-Lys-WLFWTGIA	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 524
C(PEG5k)GGGGLVPRGGG-RRAPGKLT-Asp-LASY-Lys-WLFWTGIA	(++)	(++)	SEQ ID NO: 525
C(N-etilmaleimida)-PEG4-LVPR-PEG4-rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 526
rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA-PEG4-C(N-PEG5k maleimida)	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 527
C(N-PEG5k maleimida)-PEG4-LVPR-PEG4-rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++)	SEQ ID NO: 528
C(N-PEG5k maleimida)-PEG4-SKQGRPISPDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA	(+)	(+)	SEQ ID NO: 529
SKQGRPISPDrRAAGKL TCLASYCWLFWTGIA-PEG4-C(N-PEG5k maleimida)	>5	>0,5	SEQ ID NO: 530
C(Acm)GGGGfpipR-PEG5-rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 531
CKTYFWKpGNIMVTFC-PEG12-Lys(PEG2-Biotina)-PEG12-rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA	>20		SEQ ID NO: 532
rrapgkltclasycwlfwtgia (inversa)	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 533
AIGTWFLWCYSALCTLKGPARR (retro)	(+)	(++)	SEQ ID NO: 534
aigtwflwcysalctlkgparr (retro-inversa)	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 535
RRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA-COOH	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 536
rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA-COOH	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 537
KLTCLASYCWLF (compuesto 1)	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 200
RRRKLCLASYCWLFRRR	(+)	(++)	SEQ ID NO: 201
RRRRRKLCLASYCWLFRRRR	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 202
KKKKLCLASYCWLFKKK	>5		SEQ ID NO: 203
KLTCLASYCWLFK	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 204
KKLTCLASYCWLF	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 205
ALTCLASYCWLF	(+)	(++)	SEQ ID NO: 206
KATCLASYCWLF	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 207
KLACLASYCWLF	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 208
KLTALASYCWLF	(+)	(++)	SEQ ID NO: 209
KLTCAASYCWLF	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 210
KLTCLAAYCWLF	(++)	(++)	SEQ ID NO: 211

KLTCLASACWLF	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 212
KLTCLASYAWLF	(+)	(++)	SEQ ID NO: 213
KLTCLASYCAlF	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 214
KLTCLASYCWAF	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 215
KLTCLASYCWLA	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 216
ALTCLAAYCAlF	(+)	(++)	SEQ ID NO: 217
KAACLASACWLA	>20		SEQ ID NO: 218
KLTCLASYCWLF	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 219
KITCLASYCWLF	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 220
KltCLASYCWLF	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 221
KLTcLASYCWLF	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 222
KLTClASYCWLF	>5		SEQ ID NO: 223
KLTCLaSYCWLF	>5		SEQ ID NO: 224
KLTCLAsYCWLF	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 225
KLTCLASyCWLF	>5		SEQ ID NO: 226
KLTCLASYcWLF	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 227
KLTCLASYCwLF	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 228
KLTCLASYCWIF	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 229
KLTCLASYCWlf	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 230
MeLys-LTCLASYCWLF	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 231
K-MeLeu-TCLASYCWLF	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 232
KL-MeThr-CLASYCWLF	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 233
KLTC-MeLeu-ASYCWLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 234
KLTCL-MeAla-SYCWLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 235
KLTCLA-MeSer-YCWLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 236
KLTCLAS-MeTyr-CWLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 237
KLTCLASYC-MeTrp-LF	>20	(+)	SEQ ID NO: 238
KLTCLASYCW-MeLeu-F	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 239
KLTCLASYCWL-MePhe	(+)	(++)	SEQ ID NO: 240
k-MeLeu-TCLASYCWLF (compuesto 2)	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 241
KLTCLASYCWL	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 242
KLTCLASYCW	>10	(+)	SEQ ID NO: 243
KLTCLASYC	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 244
LTCLASYCWLF	(++)	(++)	SEQ ID NO: 245
TCLASYCWLF	(+++)	(+)	SEQ ID NO: 246
CLASYCWLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 247
WSLCFKLTCAYL	>100	(+)	SEQ ID NO: 248
(compuesto A)			
KLTALASYAWLF	>5,8	(+++)	SEQ ID NO: 249
KLTSLASYSWLF	>15	(+)	SEQ ID NO: 250
KLT-Pen-LASYCWLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 251
KLTCLASY-Pen-WLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 252
KLT-HCy-LASYCWLF	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 253
KLTCLASY-HCy-WLF	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 254
KLT-Lys-LASY-Glu-WLF	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 255
KLT-Glu-LASY-Lys-WLF	(++)	(++)	SEQ ID NO: 256
KLT-Glu-LASY-Orn-WLF	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 257
KLT-Orn-LASY-Glu-WLF-COOH	(+++)	(+)	SEQ ID NO: 258
KLT-Orn-LASY-Glu-WLF-CONH ₂	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 538
KLT-Glu-LASY-Dab-WLF	(+)	(++)	SEQ ID NO: 539
KLT-Dab-LASY-Glu-WLF	(++)	(++)	SEQ ID NO: 540
KLT-Glu-LASY-Dap-WLF	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 541
KLT-Dap-LASY-Glu-WLF	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 542
KKTCLASYCWLF	>50	(++)	SEQ ID NO: 259
KLKCLASYCWLF	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 260
KLTCKASYCWLF	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 261
KLTCLKSYCWLF	(+)	(++)	SEQ ID NO: 262

KLTCLASKCWLF	>100	(+)	SEQ ID NO: 263
KLTCLASYCWLF	>100	(+)	SEQ ID NO: 264
RLTCLASYCWLF	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 265
Dpr-LTCLASYCWLF	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 266
Dab-LTCLASYCWLF	(++)	(++)	SEQ ID NO: 267
QLTCLASYCWLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 268
Orn-LTCLASYCWLF	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 269
Lys(Me)-LTCLASYCWLF	(++)	(++)	SEQ ID NO: 270
Lys(Me) ₂ -LTCLASYCWLF	(+)	(+)	SEQ ID NO: 271
Lys(Me ₃ Cl)-LTCLASYCWLF	(+)	(+)	SEQ ID NO: 272
KLTCLSSYCWLF	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 273
KLTCLVSYCWLF	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 274
KLTCL-Dpr-SYCWLF	(+)	(++)	SEQ ID NO: 275
KLTCL-Abu-SYCWLF	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 276
KLTCLGSYCWLF	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 277
KLTCL-Aib-SYCWLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 278
KLTCLA-HSe-YCWLF	(+)	(++)	SEQ ID NO: 279
KLTCLA-Dpr-YCWLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 280
KLTCLATYCWLF	(+)	(++)	SEQ ID NO: 281
KLTCLASYC-Nal-LF	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 282
KLTCLASYCFLF	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 283
KLTCLASYCLLF	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 284
KLTCLASYCW-Nle-F	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 285
KLTCLASYCWYF	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 286
KLTCLASYCWIF	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 287
TGS-KLTCLASYCWLF-APG	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 288
KLTCLASYCWLF-COOH	(+)	(++)	SEQ ID NO: 289
Ac-KLTCLASYCWLF	(+)	(++)	SEQ ID NO: 290
KLTCLASYCWLF-(PEG) ₄ -CONH ₂	(+)	(++)	SEQ ID NO: 291
(PEG) ₂₇ -KLTCLASYCWLF	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 292
(PEG) ₂₇ (PEG) ₂₇ -KLTCLASYCWLF	(+)	(+)	SEQ ID NO: 293
KLTCQASYCWLF	(+)	(++)	SEQ ID NO: 294
KLTCLASQCWLF	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 295
KLTCLASYCQLF	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 296
QQTCCQASQCQLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 297
NPTCCQASYCQLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 298
QLTCLASECGLS	>20	(+)	SEQ ID NO: 299
AQTRVARCCQLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 300
KKTCVASFCQMI	>5	>4	SEQ ID NO: 301
NLTGRASYGWLP	>20	(+)	SEQ ID NO: 302
KGRCLTSHCWLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 303
TLTCRASYCQLF	(+)	(+)	SEQ ID NO: 304
KLTCRASYCQLF	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 305
KLSCQAGQCWVF	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 306
KLTCLASYCQLV	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 307
KLKCLSSECQLL	>20	(+)	SEQ ID NO: 308
QLTCLASYCGGV	>20	(+)	SEQ ID NO: 309
EQTCLASYCWLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 310
QLPCLASYCGLF	>20	(+)	SEQ ID NO: 311
MLTCIASYCQLG	>20	(+)	SEQ ID NO: 312
SLADTQLTWLARQYWLSVSEGS	>20	(+)	SEQ ID NO: 313
RRCPGKLQALASYCWLFWTGIA	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 314
RRAPGKLQCLASYCWLFWTGIA (compuesto 3)	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 315
DSRSARKKCLASYCWLFGIGQA	>20	(+)	SEQ ID NO: 316
GASSDKLTCRTRHCSMFQPLSV	>20	(+)	SEQ ID NO: 317
GCSSDKLTARTRHCSMFQPLSV	>20	(+)	SEQ ID NO: 318
GSCRDQLTCLSSDRWQFFRRVS	>20	(+)	SEQ ID NO: 319

KEGFAQLPCLVCQGGLFSPRAI	>20	(+)	SEQ ID NO: 320
LRTQPKVTGLASCSGLVNCSR	>20	(+)	SEQ ID NO: 321
RCAQSRLPWLVSYCWLFSPLYGM	>5	>1,5	SEQ ID NO: 322
LQELTKLTCLARSGWLVCNPGY	>20	(+)	SEQ ID NO: 323
WVPQWKVTCCLASCSRLFHGFDA	>5	>1,5	SEQ ID NO: 324
SCVKHELKCLSSDSRLFSVQR	>20	(+)	SEQ ID NO: 325
VAHYGKVTCLASYCQPLPSVGA	>20	(+)	SEQ ID NO: 326
MEGTRQPTCLASYCSPFQYVAP	>20	(+)	SEQ ID NO: 327
RPGGGKVTQASYCWPFLARAG	>20	(+)	SEQ ID NO: 328
ERYRLDMTCMASQCWQFPAAAG	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 329
VGEHRKISCVASNCQLLRSGLA	>20	(+)	SEQ ID NO: 330
SISGQQLTCRASHCWLNLPHWS	>20	(+)	SEQ ID NO: 331
TLDSKNLQCLGSSCWLFSGLS	>20	(+)	SEQ ID NO: 332
VQRSTQLTCLYGGCRLFGWNYH	>20	(+)	SEQ ID NO: 333
VSGTGRLTCVASYCWMFQLGSF	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 334
MAGMLKLTCFASYCGLFPLVSS	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 335
GAQLDKETCLASYCQLFSTVRR	>20	(+)	SEQ ID NO: 336
HMQWGLPCLASYCWLFWYGIG	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 337
LRQRLAKTCVASYCWLFSLVAS	>10	>1,5	SEQ ID NO: 338
WHERQQLTCLASYCGLFVGQVA	(+++)	(+)	SEQ ID NO: 339
RYQRARLTCLASYCGLLFMSA	>15	>0,5	SEQ ID NO: 340
AVAINKVPCVASYCQLFESKIH	>20	(+)	SEQ ID NO: 341
AWPYHKPTCLASQCWQFLAQGS	>20	(+)	SEQ ID NO: 342
SYGRTKLTCLASSCWLFGQVHG	>10	(+)	SEQ ID NO: 343
GVEDRQLTCLASSCWVFSRHSV	(+)	(++)	SEQ ID NO: 344
RSFTSELTCLASSCRRFHHVPP	>20	(+)	SEQ ID NO: 345
AQLRRKLTCLASYCWLFGFFSP	(+)	(++)	SEQ ID NO: 346
HMQWGLPCLASYCWLFWYGIG	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 347
QQRQIKMSCLASYCWLFGSIPW	(++)	(++)	SEQ ID NO: 348
GGALQQLTCPASYCWLFPMES	>10	(+)	SEQ ID NO: 349
HYARVQLRCLDGYCWLLTKSRM	>10	>2,5	SEQ ID NO: 350
YARDSTLTQARTCQLVDYLG	>50	(+)	SEQ ID NO: 351
QGQARKLACLASYCWLPSSAG	>50	(+)	SEQ ID NO: 352
APPGGKRMCLVSGCQLFPWSAS	>50	(+)	SEQ ID NO: 353
QDGDGKLTCRASYCRRFLVGVH	>50	(+)	SEQ ID NO: 354
GIQGSEVACRASFCRLFEQGHV	>50	(+)	SEQ ID NO: 355
RFQTTQLTCLGSASCLFNLSVR	(+)	(+)	SEQ ID NO: 356
AWPYHKPTCLASQCWQFLAQGS	>50	(+)	SEQ ID NO: 357
GFGSRKLTSLASYGWLIQDRLP	>50	(+)	SEQ ID NO: 358
SGRGGKLTQASFCQLFGNGLS	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 359
RSQGRKLTCLASYCWFLWHR	(++)	(++)	SEQ ID NO: 360
EGRRDKLTCLASYCWLVGHGQH	>25	>0,3	SEQ ID NO: 361
RGRSAKLRLCLASYCWLFVGIL	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 362
LLQIPNLCLGSYCWLNDNGVYA	>50	(+)	SEQ ID NO: 363
FGQPSRLTCLASYCWLFGNLVT	(++)	(++)	SEQ ID NO: 364
GEGGGKLSVAVIQCGLFKGLGR	>50	(+)	SEQ ID NO: 365
VDKGHQLRCQAGYCWLGLYNRE	>50	(+)	SEQ ID NO: 366
SGFGMKLTCLASYCGLFQGEIG	(+++)	(+)	SEQ ID NO: 367
LLHAQKLSCLASYCWVFD AEW	(+++)	(+)	SEQ ID NO: 368
SGGSGKLTCLASYCWPFGSQVR	>50	(+)	SEQ ID NO: 369
QDGVEKLTCLASYCWRFGDHGA	>50	(+)	SEQ ID NO: 370
DAGPNKLRCLASYCQLFGGHA	>50	(+)	SEQ ID NO: 371
TLLYQNRTCLASYCWLFDKRSV	>50	(+)	SEQ ID NO: 372
LTWREKLACLASYCWFLWGAP	(++)	(++)	SEQ ID NO: 373
RQLWNKLTCLASYCALIGLSGT	(+)	(++)	SEQ ID NO: 374
KGAYQKLTCLASYCLLFLTAQ	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 375
QEPAKLTCRGSYCWLFKRGDQ	>50	(+)	SEQ ID NO: 376

HDSLDQLTCLASVCQLASMGAR	(+)	(+)	SEQ ID NO: 377
SRQSDKPTCLAISCSLLTSNVR	>50	(+)	SEQ ID NO: 378
HGLADRLTCLSSDCWLQPFQGS	>50	(+)	SEQ ID NO: 379
VARASKVECLASYCQLFVGGEV	(+)	(+)	SEQ ID NO: 380
GASGRRRTCVASYCCLLFQSGLP	>25	>0,1	SEQ ID NO: 381
FPIQHKLTCLSSDCWLFPSHSY	>50	(+)	SEQ ID NO: 382
QAKMLKLTCLASYCWLFVWTRS	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 383
RGRSAKLRCCLASYCWLFVGVIL	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 384
RGRSAKLTCCLASYCWLFVGVIL	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 385
RGRSAKLRCCLASYCWLFVTVIL	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 386
VSGTGRLTCVASYCWMFQLGSF	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 387
VSGTGRLTCVASYCWMFQLGIF	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 388
VSGTGKLTCLASYCWLFQLGSF	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 389
HQQRRLTCLAGYCWLFVLGPS	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 390
GDSGRKLSCLGSYCWLVSQFMA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 391
RSTVSQMRCLASYCWLFPAVLS	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 392
NGGMQKPACLASQCWLFANPLP	(+)	(++)	SEQ ID NO: 393
RHSNHNLTCCASYCWLLPAGLQ	(+)	(+)	SEQ ID NO: 394
HLGSPKLTCCASQCWLLNHEVS	>50	(+)	SEQ ID NO: 395
DAKVAKLRCCLGSQCWLLQYAPG	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 396
SKWEHQRGCLANNCWLFVLAPG	>50	(+)	SEQ ID NO: 397
RGSVHQPTCLGGYCGRLHSSWV	>50	(+)	SEQ ID NO: 398
KRYVYRQMCLVSACWLLQLGYA	(+++)	(++)	SEQ ID NO: 399
k-MeLeu-TCLASYCWLF	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 400
K-k-MeLeu-TCLASYCWLF	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 401
Ac-K-k-MeLeu-TCLASYCWLF	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 402
KK-k-MeLeu-TCLASYCWLF	>10		SEQ ID NO: 403
KKK-k-MeLeu-TCLASYCWLF	>20		SEQ ID NO: 404
k-k-MeLeu-TCLASYCWLF	>2,5		SEQ ID NO: 405
R-k-MeLeu-TCLASYCWLF	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 406
k-MeLeu-TCLASFCWLF	(++)	(+++)	SEQ ID NO: 407
k-MeLeu-TCLAS-(Y-OMe)-CWLF	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 408
k-MeLeu-TCLASYCQLF	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 409
k-MeLeu-TCLASYCWLA	(+)	(+++)	SEQ ID NO: 410
(KLTCLASYCWLF) ₂ =N-O-(CH ₂) ₃ -O-N=	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 411
(KLTCLASYCWLF) ₂ =N-O-(CH ₂) ₃ -O-N=	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 412
"=N-O-(CH ₂) ₃ -O-N=(COCH ₂ CH ₂ CO-KLTCLASYCWLF) ₂ "	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 413
KLLKLLKLLKLLK-k-MeLeu-TCLASYCWLF	(+++)	(+++)	SEQ ID NO: 543
FAM-GGSGG-k-MeLeu-TCLASYCWLF			SEQ ID NO: 544
Palmitoil-(PEG) ₂₇ -KLTCLASYCWLF	(+)	(+)	SEQ ID NO: 545
Palmitoil-(PEG) ₂₇ (PEG) ₂₇ -KLTCLASYCWLF	>20	>0,3	SEQ ID NO: 546
H3N-KLTCLASYCWLF=N-O-CH ₂ -CO-PEG ₂₇ -CNPRGD-(Y-OEt)-RC	>50		SEQ ID NO: 547
(CNPRGD-(Y-OEt)-RC)-PEG ₂₇ -CO-CH ₂ -O-N=CH ₂ NHCOCH ₂ CH ₂ CO-KLTCLASYCWLF			SEQ ID NO: 548
5-FAM-CNPRGD(Y-OEt)RC			SEQ ID NO: 549
rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA-PEG16-Lys(PEG2-Biotin)-PEG 16-Lys(palmitoil)	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 550
Lys(palmitoil)-PEG16-Lys(PEG2-Biotin)-PEG16-rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 551
rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA-PEG16-Lys(PEG2-Biotin)-PEG16	(+++)	(++++)	SEQ ID NO: 552
rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA-PEG16-Lys(PEG2-Biotin)-PEG16-CNPRGD-Tyr(OEt)-RC	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 553
PEG16-Lys(PEG2-Biotin)-PEG16-rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA	(+)	(++++)	SEQ ID NO: 554
CNPRGD-Tyr(OEt)-RC-PEG16-Lys(PEG2-Biotin)-PEG16-	(++)	(++++)	SEQ ID NO: 555

rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA			
------------------------	--	--	--

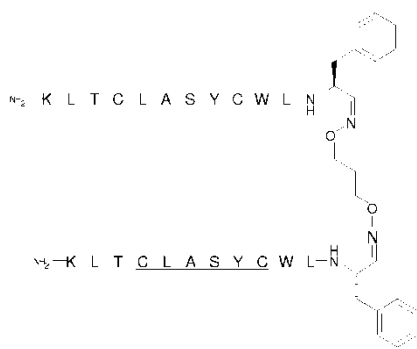
En la tabla 1, anterior, se usaron los siguientes indicadores:

CE ₅₀ :	
(+)	> 1
(++)	0,5 - 1,0
(+++)	< 0,5

5

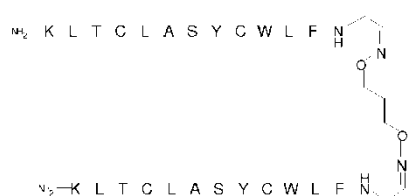
Vmáx:	
(+)	< 1
(++)	1-2
(+++)	> 2
(++++)	> 3

En la tabla 1, "(H₃N-KLTCLASYCWLF)₂=N-O-(CH₂)₃-O-N=" tiene la estructura:



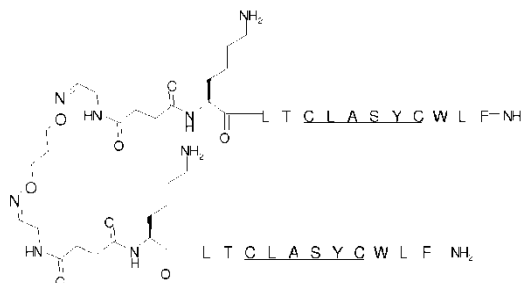
10

En la tabla 1, "(H₃N-KLTCLASYCWLF)₂=N-O-(CH₂)₃-O-N=" tiene la estructura:



15

En la tabla 1, "=N-O-(CH₂)₃-O-N=(COCH₂CH₂CO-KLTCLASYCWLF-CONH₂)₂" tiene la estructura:



20 Actividad del compuesto 1 y sus derivados

Los mutantes de alanina, los mutantes de D-aminoácido y los derivados alfa-N-metilo del compuesto 1, y los mutantes de D-aminoácido y los derivados alfa-N-metilo del compuesto 4 se prepararon y se pusieron a prueba de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 2. Los resultados indican que los residuos de aminoácidos críticos de los compuestos de la presente divulgación (por ejemplo, el compuesto 1 y el compuesto 4) están ubicados dentro del bucle de cisteína

25

(entre C¹ y C²) y hacia el extremo C de la secuencia de aminoácidos del compuesto 1.

Actividades catalíticas de FIXa en ausencia y presencia de diversos compuestos

- 5 Las constantes catalíticas k_{cat} y K_M para FIXa humano (10 nM) medidas en ausencia y presencia de diversos compuestos de la presente divulgación en el ensayo de generación de FXa descrito anteriormente se resumen a continuación. El compuesto C (péptido desordenado; véase la tabla 1) se usó como control a 10,0 μ M. El compuesto 1 se usó a 3 μ M, los compuestos 3, 4 y 5 se usaron a 1 μ M, y el compuesto 10 se usó a 0,3 μ M. FIXa se usó a 10 nM y FX se usó a 10-1000 nM. El ensayo se realizó en presencia de fosfolípidos (PL) y cloruro de calcio. Ciertos compuestos de la presente divulgación disminuyen la K_M y aumentan la k_{cat} de hFIXa. En este experimento, los compuestos de la presente divulgación aumentaron la actividad catalítica de FIXa (es decir, aumentaron la k_{cat} de hFIXa) al menos 160 veces. Como comparación, los mutantes FIXa conocidos aumentan k_{cat} hasta 20 veces (véase, por ejemplo, J Thromb Haemost, 2009, 7, 1656-1662), y los anticuerpos conocidos que mejoran FIXa aumentan la k_{cat} aproximadamente 10 veces (véase, por ejemplo, J Thromb Haemost, 2008, 6, 315-322).

15

	k_{cat} (min ⁻¹)	Δk_{cat}	K_M (nM)	$\Delta K_M K_{M\text{compuesto}} / K_{M\text{tampón}}$
Tampón	0,00009	1,0	78 $\pm$ 30	1,0
Compuesto 1	0,0144	160	24 $\pm$ 4,8	0,31
Compuesto 3	0,0177	197	16 $\pm$ 3,5	0,21
Compuesto 4	0,0171	190	11 $\pm$ 2,7	0,14
Compuesto 5	0,0179	199	11 $\pm$ 2,3	0,14
Compuesto C	0,00044	6	99 $\pm$ 76	~1

Comparación de las actividades catalíticas de FIXa y FVIIa en ausencia y presencia del compuesto 5

- 20 Las actividades catalíticas (k_{cat}) y los valores de K_M para FIXa y FVIIa se midieron en ausencia y presencia del compuesto 5 usando el ensayo de generación de FXa modificado descrito anteriormente. Los resultados se resumen a continuación:

Δk_{cat}		Δk_M	
FVIIa	FIXa	FVIIa	FIXa
2419	199	0,3	0,14

25 k_{cat}/K_M

- La k_{cat}/K_M para FIXa se midió usando diversas concentraciones de FIXa (4, 2, 1, 0,5 y 0,25 μ M) y un sustrato para FIXa en ausencia y presencia del compuesto 1 a 10 μ M (~25 veces CE_{50}) y el control positivo etilenglicol (EG) al 33 %. Los resultados para el sustrato FIXa cromógeno, CH₃SO₂-(D)-CHG-Gly-Arg-pNA (AcOH, BIOPHEN CS-51; [S]₀ = constante 50 nM; [S]₀ < K_M) se resumen a continuación.

30

Muestra	$(k_{cat}/K_M)_{app}(M^{-1}s^{-1})$	Rel k_{cat}/K_M
FIXa solo	1.591	-
FIXa + compuesto 1	1.358	0,85
FIXa + EG	29.730	18,7

Se obtuvieron resultados similares para un sustrato fluorógeno FIXa (Pefluor FIXa 3688). Los resultados anteriores indican que los compuestos de la presente divulgación no aumentan la actividad amidolítica de FIXa directamente (de manera similar a FVIIIa).

FIXa de ratón frente humano

Se midieron los valores de CE_{50} para el compuesto 1 en un ensayo de generación de FXa usando FIXa de ratón (mFIXa) o FIXa humano (hFIXa). Los valores de CE_{50} del compuesto 1 medidos para FIXa de ratón y humano son similares (0,44 μM y 0,30 μM , respectivamente), sin embargo, la $V_{máx}$ se reduce mucho con mFIXa en comparación con hFIXa. Los datos confirman que el péptido se seleccionó para unión a hFIXa.

Los compuestos de la presente divulgación no son un sustrato para FIXa

El compuesto 3 (100 μM) se incubó en un tampón de ensayo de generación FXa que contenía diversas concentraciones de FIXa (0, 10 nM, 1 μM) en ausencia o presencia de albúmina de suero bovino (BSA) durante 3 horas. Las mezclas fueron analizadas a continuación por LC-MS. No se observaron diferencias significativas en los cromatogramas o los espectros de masas para el compuesto 3 en las muestras anteriores. Los resultados indican que el compuesto 3 no es un sustrato para FIXa.

Ejemplo 3

(a) Ensayo de generación de trombina (TGA)

Se generó un trombograma para los compuestos seleccionados de la presente divulgación con el fin de evaluar el potencial de trombina en un entorno de plasma fisiológico. El ensayo TGA se llevó a cabo usando una prueba de trombograma automático calibrado (CAT). En resumen, se reconstituyó plasma humano deficiente en FVIII liofilizado y citratado (Siemens) con 1 ml de agua destilada, se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente y se mezcló bien antes de usar. Como alternativa, se usó plasma deficiente en FVIII congelado de Precision Biologics o HRF. El plasma deficiente en FVIII fue en algunos casos enriquecido con plaquetas liofilizadas (Helena Laboratories, concentración final $0,66 \times 10^8$ células/ml). Se prepararon diluciones de péptidos o controles tales como FVIII en PBS (- Ca, -Mg) o en plasma deficiente. En una placa de fondo redondo de 96 pocillos, se añadieron 20 μl de solución activadora (reactivo PRP [rTF final 0,1 pM], Thrombinoscope bv) a cada pocillo de muestra y se añadieron 20 μl de calibrador de trombina (Thrombinoscope bv) al pocillo de calibrador. Cuando se usaron muestras de plasma sin plaquetas, se usó el reactivo PPP Low [rTF final 1 pM, fosfolípidos 4 μM], Thrombinoscope bv como activador en lugar del reactivo PRP. Posteriormente, se añadieron 80 μl de plasma en blanco al pocillo de calibrador y 80 μl de plasma que contenía los compuestos de la presente divulgación, se añadieron controles como FVIII o blanco a los pocillos de muestra. Todas las muestras se prepararon por duplicado y la placa se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Después de la incubación, se añadieron 20 μl de solución Fluca (Ca^{2+} + sustrato fluorógeno, Diagnostica Stago) a cada pocillo y se midió la fluorescencia en un fluorómetro de placa de microtitulación (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific, software Thrombinoscope) durante 1 hora. De manera similar, los experimentos de TGA se realizaron en plasma deficiente en FIX.

Los compuestos ejemplares de la presente divulgación y sus actividades biológicas *in vitro* medidas usando el ensayo de generación de trombina se resumen en la tabla 2, a continuación. En la tabla 2, los péptidos están amidados (-CONH₂) en el extremo C y tienen un extremo N libre, a menos que se indique lo contrario. En la tabla 2, las actividades de los compuestos se basan en la altura del pico de trombina (trombina nM). Los experimentos de TGA se realizaron en plasma deficiente en FVIII de dos fuentes diferentes que exhiben diferentes valores de referencia: plasma deficiente en FVIII de HRF (1) y plasma deficiente en FVIII de Precision Biologics (2).

Tabla 2

Compuestos ejemplares de la presente divulgación y sus actividades en el TGA		
Compuesto	Concentración (μM)	Trombina por encima del valor inicial (nM) ^{a)}
Valor inicial (1)	0	-
FVIII	0,1 UI/ml	+
FVIII	0,25 UI/ml	++
FVIII	0,5 UI/ml	+++
FVIII	0,75 UI/ml	++++
FVIII	1 UI/ml	++++
KLTCLASYCWLF	2,5 μM	-
	5	-
	10	-
	20	-
k-MeLeu-TCLASYCWLF	2,5	+
	5	-
	10	-
	20	+
rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA	2,5	+
	5	+
	10	++
	20	++
PRIRTVGPGRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	2,5	+
	5	++
	10	+++
	20	+++
PRIRTVGPGRSrSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	2,5	++
	5	+++
	10	+++
Valor inicial (2)		
SRIRTVGPGRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	2,5	++
	5	+++
	10	++++
PSIRTVGPGRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	2,5	+
	5	+
	10	+
PRSRTVGPGRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	2,5	++
	5	+++
	10	+++
PRISTVGPGRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	2,5	+
	5	+
	10	+
PRIRSVGPGRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	2,5	++
	5	+++
	10	+++
PRIRTVGPGRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	2,5	+
	5	++
	10	++
PRIRTVSPGRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	2,5	++
	5	+++
	10	++++
PRIRTVGSGRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	2,5	+
	5	+
	10	+
PRIRTVGPSSRSASGKLTCLASYCWLFWTGIA	2,5	+
	5	++
	10	++

PRIRTVGPGSRASGKSTCLASYCWLFWTGIA	2,5	+
	5	++
	10	+++
PRIRTVGPGSRASGKLTCLASYCWLFWTGIA	2,5	++
	5	+++
	10	+++
Valor inicial (2)		
PRIRTVGPGSRASGKSTCLASYCWLFWTGIA	2,5	+
	5	+++
	10	++++
	20	++++
SRI RTVGPGSRASGKSTCLASYCWLFWTGIA	2,5	+++
	5	++++
	10	++++
PRIRTVSPGSRASGKSTCLASYCWLFWTGIA	2,5	++
	5	+++
	10	++++
	20	++++
SRI RTVSPGSRASGKSTCLASYCWLFWTGIA	2,5	+++
	5	+++
	10	++++
	20	++++
PRSRTVGPGSRASGKSTCLASYCWLFWTGIA	2,5	++
	5	+++
	10	++++
	20	++++
SRSRTVSPGSRASGKSTCLASYCWLFWTGIA	2,5	+++
	5	++++
	10	++++

En la tabla 2, anterior, se usaron los siguientes indicadores:

Trombina por encima del valor inicial

5

1-10 nM (1) o 1-29 nM (2)	(+)
11-20 nM (1) o 30-59 nM (2)	(++)
21-30 nM (1) o 60-90 nM (2)	(+++)
>30 nM (1) o >90 nM (2)	(++++)
En o aproximadamente el valor inicial	(-)

Las actividades de TGA del compuesto 7 (GWKPFLWDPRVLLSSGWYGRG), el compuesto 8 (PWRRFWAWNPRSLALSTWFGRGCD) y el compuesto 9 (GWKPFLWDPRVLLSSGWYGRGGGGGWKPFLWDPRVLLSSGWYGRG), que son menos potentes y estructuralmente no están relacionados con los compuestos de la presente divulgación, se midieron en presencia de FVIII. El compuesto 7 se usó a 100, 50, 25, 12,5 y 6,3 uM en presencia de 0,1 U/ml de FVIII; el compuesto 8 se usó a 50, 25, 12,5, 6,3 y 3,1 uM en presencia de 0,1 U/ml de FVIII; y el compuesto 9 se usó a 50, 25, 12,5, 6,3 y 3,1 uM en presencia de 0,1 U/ml de FVIII. En estas condiciones, cada compuesto compite con FVIII en el TGA. Los fenómenos opuestos se observaron para los compuestos de la presente divulgación.

15

(b) Ensayo de generación de trombina usando componentes hemostáticos purificados

Se usó un ensayo de generación de trombina purificada para medir la selectividad de los compuestos de la presente divulgación. El ensayo se modificó a partir de los procedimientos descritos en Aljamali MN et al., Epub, 29 de julio de 2009, generación de trombina y activación plaquetaria inducida por rFVIIa (NovoSeven) y NN1731 en un modelo basado en células reconstituidas que simula las condiciones de hemofilia, Haemophilia 2009, 15(6):1318-26; y Christiansen ML et al., Functional characteristics of N8, a new recombinant FVIII, Haemophilia 2010, 16(6):878-87.

La mezcla de ensayo de generación de trombina estaba compuesta por FXI (3,1 ug/ml), FIX (3,1 ug/ml), FVII (6,3 nM), FVIIa (6,3 pM), factor tisular (10 fM), FV (4,4 ug/ml), FX (5 ug/ml), FII (54 ug/ml), antitrombina III (ATIII) (75 ug/ml),

inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) (0,06 ug/ml) y plaquetas liofilizadas (6E+07/ml). Los factores de coagulación recombinantes purificados V, XI, II, X, IX, VII, VIIa, factor tisular recombinante y antitrombina III (ATIII) se obtuvieron de Haematologic Technologies (Essex Junction, VT, EE. UU.). Las plaquetas liofilizadas fueron de Helena Laboratorios (Beaumont, TX); TFPI era de American Diagnostica. El compuesto 5 (1 uM), el compuesto 4 (1 uM), el compuesto 10 (1 uM), el FVIII al 10 % (0,1 UI/ml) o al 100 % (1 UI/ml) o tampón se añadió a la mezcla de ensayo junto con el sustrato de trombina (Fluca-kit, Thrombinoscope BV, Países Bajos) y la generación de trombina se midió con un instrumento de trombinoscopia (Thrombinoscope BV, Países Bajos). Tanto el FVIII como los compuestos procoagulantes de la presente divulgación inducen la generación de trombina en este ensayo (es decir, en presencia de componentes hemostáticos purificados). Las actividades de generación de trombina del compuesto 5, 4 y 10 se ilustran en la figura 5.

En un segundo experimento, el compuesto 5 se puso a prueba a diversas concentraciones (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 uM y 2 uM). Los resultados de este experimento se ilustran en la figura 6, que muestra que el compuesto 5 mejora la generación de trombina de una manera dependiente de la dosis.

En un tercer experimento, se investigó si la formación de trombina inducida por FVIII o compuesto 5 depende de FIXa. Los componentes del ensayo de generación de trombina se combinaron para generar las siguientes concentraciones finales: FV (4,4 ug/ml), FX (5 ug/ml), FII (54 ug/ml), ATIII (75 ug/ml) y plaquetas liofilizadas (6E+07/ml) en presencia de 1 %, 10 % o 100 % (3,1 ug/ml) de FIXa fisiológico. FVIII (0,01 U/ml) o compuesto 5 (1 uM) se añadieron junto con el sustrato de trombina (Fluca-kit) y la placa se leyó usando un trombinoscopio. Los resultados muestran que la generación de trombina inducida por el compuesto 5 depende de la concentración de FIXa presente en la mezcla de ensayo. Los resultados de estos experimentos de control se resumen en la figura 7.

En un cuarto experimento, se investigó si la formación de trombina inducida por FVIII o compuesto 5 depende de FXIa. Los componentes del ensayo de generación de trombina se combinaron para generar las siguientes concentraciones finales: FIX (3,1 ug/ml), FV (4,4 ug/ml), FX (5 ug/ml), FII (54 ug/ml), ATIII (75 ug/ml) y plaquetas liofilizadas (6E+07/ml) en ausencia o presencia de FXIa al 50 % o al 100 %. (FXIa al 100 % corresponde a la concentración fisiológica de 3,1 ug/ml). FVIII (0,01 U/ml) o compuesto 5 (1 uM) se añadieron junto con el sustrato de trombina (Fluca-kit) y la placa se leyó usando un trombinoscopio. Los resultados muestran que la generación de trombina inducida por el compuesto 5 depende de la concentración de FXIa presente en la mezcla de ensayo. Los resultados de estos experimentos de control se resumen en la figura 8.

En otro experimento, el compuesto 5 en el sistema de ensayo anterior mejoró la generación de trombina en ausencia de FIX/FIXa, lo que indica que los compuestos de la presente divulgación, además de aumentar la ruta intrínseca, pueden mejorar la formación de trombina a través de la ruta extrínseca (por ejemplo, aumentando la actividad catalítica de FVIIa). En este experimento, la mezcla de ensayo de generación de trombina contenía los siguientes componentes: FVII (6,3 nM), FVIIa (6,3 pM), factor tisular (10 fM), FV (4,4 ug/ml), FX (5 ug/ml), FII (54 ug/ml), ATIII (75 ug/ml), TFPI (0,06 ug/ml) y plaquetas liofilizadas (6E+07/ml). El compuesto 5 (1 uM) o el tampón se añadieron a la mezcla de ensayo junto con el sustrato de trombina (Fluca-kit) y se leyeron las cinéticas usando un trombinoscopio.

Los compuestos de la presente divulgación no aumentan directamente la actividad de FXa

En otro experimento, se determinó si los compuestos de la presente divulgación mejoran o no directamente la actividad de FXa o el complejo de protrombinasa. En este experimento, el compuesto 5 (1 uM), el compuesto 4 (1 uM) o el tampón se añadieron a una mezcla de ensayo de generación de trombina que contenía los siguientes componentes a las concentraciones finales indicadas: FII (54 ug/ml), FXa (0,05 ug/ml), ATIII (75 ug/ml), TFPI (0,06 ug/ml) y plaquetas liofilizadas (6E+07/ml) con o sin FV (4,4 ug/ml).

Se añadió un sustrato de trombina (Fluca-kit) y se midió la generación de trombina usando un trombinoscopio. En estas condiciones, el compuesto 5 y el compuesto 4 no aumentaron sustancialmente la actividad catalítica de FXa o el complejo de protrombinasa.

Los compuestos de la presente divulgación no aumentan directamente la actividad de trombina

En otro experimento se investigó si los compuestos de la presente divulgación aumentan o no la actividad de trombina directamente. La actividad de trombina se midió en ausencia o presencia del compuesto 5 usando un ensayo de generación de fibrina con los siguientes componentes del ensayo que tienen las concentraciones finales indicadas en la mezcla de ensayo: fibrinógeno (0,45 g/l), calcio (16,5 mM), plaquetas (6E+ 07/ml), α -trombina (0 o 0,1 UI/ml). La generación de fibrina se determinó midiendo la absorbancia a DO405 con el lector de microplacas de detección múltiple Biotek Synergy 2.

En este experimento, el compuesto 5 (1 μM) no aumentó sustancialmente la actividad catalítica de trombina directamente (es decir, no aumentó directamente la actividad amidolítica de alfa-trombina).

5 Ejemplo 4

Ensayo de tromboelastometría rotacional (ROTEM®)

Los compuestos de la presente divulgación se pusieron a prueba mediante tromboelastometría rotacional para evaluar parámetros de coagulación tales como el tiempo de coagulación (CT), el ángulo α , el tiempo de formación de coágulos (CFT), la firmeza de coágulos máxima (MCF). En resumen, se reconstituyó plasma humano deficiente en FVIII liofilizado y citratado (Siemens) con 1 ml de agua destilada, se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente y se mezcló bien antes de usar. Como alternativa, se descongeló una parte alícuota de plasma humano deficiente en FVIII citratado (no liofilizado) (HRF, George King, Precision Biologics o donantes en tiempo real) durante 10 minutos en un baño de agua a 37 °C y, cuando fue necesario, se centrifugó a 2800 g durante 5 minutos a 25 °C. El plasma deficiente en FVIII se enriqueció con plaquetas liofilizadas (Helena Laboratories, concentración final de $0,5 \times 10^8$ células/ml) y compuestos, FVIII, o tanto compuestos como FVIII. Las diluciones de los compuestos de la presente divulgación y los controles, tales como FVIII, se prepararon en PBS (-Ca, -Mg). A continuación, se transfirieron 300 μl del plasma enriquecido a una copa ROTEM que ya contenía 20 μl de StarTEM (solución concentrada de cloruro de calcio) y 20 μl de TF lipídado (American Diagnostica, concentración final 10 fM) o caolín (Sigma-Aldrich, concentración final 0,4 $\mu\text{g/ml}$) y se inició el registro. Las copas se mantuvieron a 37 °C durante el ensayo. Todas las pruebas se realizaron durante 1,5 a 2 horas.

Se compararon los tiempos de coagulación y los ángulos α para FVIII y el compuesto 3 medidos en un ensayo ROTEM usando plasma humano deficiente en FVIII que contenía plaquetas liofilizadas y lipTF 10 fM. A continuación, se resumen los tiempos de coagulación y los ángulos α medidos en presencia de FVIII y compuesto 3 a diversas concentraciones. En este experimento, el compuesto 3 (a 5 μM) tiene un tiempo de coagulación más rápido que aproximadamente el 100 % de FVIII (100 % de FVIII correspondiente a 1 UI/ml). En este experimento, el compuesto 3 (a 10 μM) tiene un ángulo α correspondiente a aproximadamente 20 % de FVIII. Los resultados se resumen en las tablas 3 y 4, a continuación.

Tabla 3

	Compuesto 3 en plasma con HemA humano					
Conc., μM	0	0,625	1,25	2,5	5	10
Tiempo de coagulación, s (prom.)	989	792	588	452	329	205
ángulo α , grados (prom.)	18	29	29	33	38	51

Tabla 4

	rFVIII en plasma con HemA humano					
Conc., UI/ml	0,01	0,05	0,10	0,25	0,50	1
Tiempo de coagulación, s (prom.)	852	761	610	521	458	363
ángulo α , grados (prom.)	26	35	48	60	63	71

También se midieron los tiempos de coagulación y los ángulos α para el compuesto 3 en plasma deficiente en FVIII en ausencia y presencia de anticuerpos anti-FVIII neutralizantes (IgG policlonal de oveja contra FVIII humano, 18,4 mg/ml a dilución 1:100). En este experimento, el tiempo de coagulación para el compuesto 3 a 10 μM es independiente del FVIII residual y la presencia de un anticuerpo neutralizante anti-FVIII. El ángulo α medido para el compuesto 3 a 10 μM es independiente del FVIII residual y de la presencia de un anticuerpo neutralizante anti-FVIII. Los resultados se resumen en la tabla 5, a continuación.

Tabla 5

	Compuesto 5 en plasma con HemA humano					
Conc., μM	0	0	5	5	10	10
pab anti-FVIII	-	+	-	+	-	+
Tiempo de coagulación, s	777; 775	1.063; 1.202	154; 164	197; 194	101; 105	108; 110
ángulo α , grados	42; 41	10; 11	51; 58	48; 53	70; 68	67; 69

De manera similar, se compararon los tiempos de coagulación y los ángulos α para FVIII y el compuesto 23 a diversas

concentraciones en un ensayo ROTEM usando plasma humano deficiente en FVIII (HRF). Los resultados se resumen en las tablas 6 y 7, a continuación.

Tabla 6

	Compuesto 23 en plasma con HemA humano (HRF)				
Conc., μM	0	2,5	5	10	20
Tiempo de coagulación, s (prom.)	2.208	983	673	486	472
ángulo α , grados (prom.)	9	13	22	32	39

5

Tabla 7

	rFVIII en plasma con HemA humano (HRF)					
Conc., UI/ml	0	0,10	0,25	0,50	0,75	1
Tiempo de coagulación, s (prom.)	1.823,5	1.062	821	783	654,5	608
ángulo α , grados (prom.)	18	21,5	25	32	38,5	35

Los tiempos de coagulación del compuesto 5 a 5 μM y 10 μM se midieron usando plasma humano deficiente en FIX que contenía plaquetas liofilizadas y TF 10 fM. En este ensayo, el compuesto 5 reduce significativamente el tiempo de coagulación en plasma deficiente en FIX. Los resultados se resumen en la tabla 8, a continuación.

10

Tabla 8

	Compuesto 5 en plasma con HemB humano			rFIX en plasma con HemB
Conc. (μM)	0	5	10	1 UI/ml
Tiempo de coagulación (s)	1.188; 1.288	836; 810	804; 773	468; 468
ángulo α (grados)	19; 18	24; 20	22; 21	54; 51

El tiempo de coagulación (CT) en un ensayo ROTEM usando plasma humano deficiente en FVIII (que contenía plaquetas) o plasma deficiente en FIX (que contenía plaquetas) se midió en ausencia y presencia del compuesto 5. Los resultados, resumidos en la tabla 9, a continuación, indican que el compuesto 5 redujo significativamente el tiempo de coagulación en plasma deficiente en FVIII y FIX. El efecto es más pronunciado en el plasma humano deficiente en FVIII.

15

20

Tabla 9

	Plasma deficiente en FVIII		Plasma deficiente en FIX	
Compuesto 5, μM	0	10	0	10
Tiempo de coagulación, s	1.563; 1.666	277; 298	1.617; 1.628	1.311; 1.328
ángulo α , grados	14; 17	34; 27	20; 15	15; 19

Se midió el tiempo de coagulación y el ángulo α para el compuesto 5 en plasma deficiente en FIX en ausencia y presencia de anticuerpos anti-FIX neutralizantes (IgG policlonal de oveja contra FIX humano, 3,96 mg/ml a una dilución de 1:50). En estos experimentos, el compuesto 5 reduce el tiempo de coagulación y aumenta el ángulo α en el plasma deficiente en FIX inhibido por FIX, lo que indica que el compuesto 5 es capaz de mejorar la actividad catalítica de otras proteínas, por ejemplo, otros factores de coagulación sanguínea, además de FIXa. Los resultados se resumen en la tabla 10, a continuación.

25

Tabla 10

	Compuesto 5 en plasma con HemB humano					
Conc., μM	0	0	5	5	10	10
pab anti-FIX	-	+	-	+	-	+
Tiempo de coagulación, s	3.450; 3.267	5.138; 5.131	1.420; 1.556	1.660; 1.661	1.182; 1.194	1.125; 989
ángulo α , grados	8; 6	-	11; 12	9	12; 12	13; 10

30

Se midió el tiempo de coagulación en ausencia y la presencia del compuesto 5 a diversas concentraciones en un ensayo ROTEM usando plasma deficiente en FVIII canino que contenía plaquetas humanas liofilizadas y lipTF 10 fM. Los resultados se resumen en la tabla 11, a continuación.

35

Tabla 11

	Compuesto 5 en plasma con HemA canino						Compuesto C en plasma con HemA canino	Plasma canino normal
Conc. (μM)	0	0,625	1,25	2,5	5	10	10	0
Tiempo de coagulación (s)	1.062; 1.029	687; 539	404	346; 356	295; 369	286; 294	1.136; 1.491	364; 390
ángulo α (grados)	9; 14	12	14	15; 15	29; 28	58; 57	7	55; 44

Se midió el tiempo de coagulación del ángulo α para el compuesto 21 en sangre completa. La única diferencia con el Rotem de plasma descrito anteriormente es que el experimento se realiza en sangre completa humana con HemA (grave). No se añadieron plaquetas ya que ya están presentes en la sangre completa. La actividad de Rotem se midió después de 30 minutos de preincubación del compuesto 21 en sangre completa. Los resultados se resumen en la tabla 12, a continuación:

Tabla 12

	Compuesto 21 en sangre completa con HemA (grave) humana						rFVIII en SC con HemA
Conc. (μM)	0	1,25	2,5	5	10	20	1 UI/ml
Tiempo de coagulación (s)	2.360; 2.910	1.140; 1.137	1.057; 1.090	930	748, 703	952; 625	702; 618
ángulo α (grados)	15	22; 24	32	32	44; 52	42; 43	42; 46

10 Ejemplo 5

Intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX)

Se usó espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (H/DX-MS) para estudiar el análisis estructural de orden superior del factor IXa humano recombinante (hFIXa) en combinación con y sin el compuesto 4. El procedimiento general se puede encontrar en las siguientes referencias: Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73, 256A-265A.; Wales y Engen (2006) Mass Spectrom. Rev. 25, 158-170.

Condiciones experimentales:

Muestras y tampones:

Las muestras contenían FIXa humano (1 μM , Hematologic Technologies) en Tris 50 mM, pH 7,4; NaCl 100 mM; CaCl_2 2 mM (98,8 % D_2O) con o sin la presencia del compuesto 4 (12 μM).

Análisis HPLC/MS:

Las muestras de FIXa se equilibraron a temperatura ambiente ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 1 hora antes de etiquetar con tampón deuterado (tampones de reacción descritos anteriormente). Después, las muestras se diluyeron 1:15 con tampón deuterado y se incubaron, permitiendo que se produjera un intercambio de hidrógeno durante diversas cantidades de tiempo (10 segundos, 1, 10, 60 y 240 minutos), antes de que la reacción se detuviera con una dilución 1:1 de citrato 200 mM, HCl de guanidinio 8 M y TCEP 0,5 M, pH 2,33. Las muestras inactivadas se incubaron después durante 20 segundos antes de seguir diluyendo 1:1 con ácido fórmico al 0,1 % y se inyectaron inmediatamente en el sistema de LC-MS para su análisis.

Se inyectaron aproximadamente 7 μg de FIXa intercambiado/inactivado en una columna de pepsina inmovilizada donde se realizó la digestión y la captura de péptidos durante 3 minutos con un caudal de 0,1 ml/min en ácido fórmico al 0,1 % a 10°C (Houde D. et al., 2010 Post-Translational Modifications Differentially Affect IgG1 conformation and receptor binding. Mol. Cell. Proteomics, 9 (8): p1716). Los péptidos pépticos se capturaron en una trampa de pre-columna de péptidos ACQUITY BEH C18 de 1,7 μm (Waters Corp. Milford, MA) mantenida a 0°C . El flujo se desvió mediante una válvula de conmutación y los péptidos capturados se descargaron de la trampa en una columna ACQUITY BEH C18 de 1,7 μm , 1 mm x 100 mm (Waters Corp. Milford, MA) para separar los péptidos a 0°C usando un gradiente de acetonitrilo lineal de 9 minutos. (2-55 %) con 0,1 % de ácido fórmico a un caudal de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Wales TE, Fadgen KE, Gerhardt GC, Engen JR. 2008. High-speed and high-resolution UPLC separation at zero degrees

Celsius. Anal. Chem. 80(17): p6815). El eluato de la columna C18 se dirigió a un espectrómetro de masas Waters Synapt HD con ionización por electropulverización y corrección de masa de bloqueo (usando péptido Glu-fibrinógeno). Se adquirieron los espectros de masas y se identificaron péptidos pépticos usando una combinación de masa exacta y MS, con la ayuda del software Waters Identity (Silva JC et al., 2006. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. Mol Cell Proteomics, 5(1): p144). Todos los datos fueron promediados a partir de inyecciones duplicadas. La cantidad de deuterio en cada péptido se determinó al sustraer la masa del péptido no deuterado de la masa del péptido deuterado, incubado en varios puntos temporales de HDX (que no se corrigieron por ningún intercambio posterior). Los datos de masa se representaron gráficamente en función del tiempo de exposición a deuterio.

Resultados:

Se identificaron 69 péptidos, que representan aproximadamente el 75 % de la secuencia de aminoácidos de hFIXa, que correspondió al 37 % de cobertura de la cadena ligera y al 99 % de cobertura de la cadena pesada. Los datos resultantes produjeron 69 gráficos de incorporación de deuterio (HDX) tanto para el control FIXa como para FIXa con compuesto 4.

La diferencia en el intercambio de deuterio entre FIXa y FIXa con el compuesto 4 se determinó restando la masa de cada péptido FIXa de la masa del FIXa correspondiente con el compuesto 4. Esta resta se realizó para cada punto temporal de intercambio H/D (0,17, 1, 10, 60 y 240 minutos). Se calculó la suma de estas diferencias, en todos los puntos temporales. Los valores para las diferencias de masa y la suma pueden ser positivos o negativos. Los valores positivos indican que FIXa se intercambia más rápidamente que FIXa con el compuesto 4, lo que puede indicar que FIXa tiene una estructura más abierta, flexible o débilmente unida en H. Los valores negativos significan lo contrario. Para que una muestra se considere no comparable, se deben cumplir los siguientes criterios: (1) Al menos un punto temporal debe estar fuera del umbral de $\pm 0,5$ Da; y (2) el valor de la suma de la diferencia correspondiente, para un péptido que contiene un valor de diferencia que excedió el umbral de $\pm 0,5$ Da (criterio 1), también debe exceder el umbral de $\pm 1,1$ Da. Estos criterios representan una medida rigurosa para evaluar la comparabilidad y se basan en incertidumbres experimentales puramente estadísticas asociadas con el procedimiento de H/DX-MS. El rigor de cuán grande debe ser una diferencia antes de establecer la no comparabilidad entre dos productos biofarmacéuticos casi idénticos es una variable que depende de la naturaleza del producto biofarmacéutico y donde se observa una diferencia en el producto biofarmacéutico.

Con el fin de evaluar más a fondo la presencia de no comparabilidad en los experimentos de H/DX-MS, se desarrollaron dos índices de diferencia cuantitativa, DI(1) y DI(2) y se notificaron como números enteros. El valor DI(1) se determina al sumar todos los valores absolutos para la suma de la diferencia que exceden el umbral (1,1) y cumplen con los criterios anteriores. Si un valor de suma de diferencia es negativo, al número se le asigna un valor de cero. Al expresar los valores de DI, un valor final > 0 indica que las muestras no son comparables. El valor DI(2) se determina de manera similar, pero para cada punto temporal individual. El valor para DI(1) y DI(2) para estos experimentos es 2 y 0, respectivamente. Hubo dos péptidos que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el intercambio H/D al comparar FIXa con FIXa con el compuesto 4: péptido de cadena ligera 85-97 (péptido número 4) y el péptido de cadena pesada más importante 177-185 (péptido número 57). La región de diferencia dentro del péptido 177-185 de la cadena pesada podría resolverse adicionalmente a partir de péptidos solapados. Se encontró el péptido de cadena pesada 169-180 y el intercambio H/D se mostró similar entre FIXa y FIXa con el compuesto 4. Los resultados se ilustran en la figura 4.

Como resultado, la diferencia observada en el péptido 177-185 de cadena pesada podría localizarse en los residuos 180-185. La diferencia detectada dentro de la cadena ligera de FIXa es muy pequeña, pero parece significativa en los últimos puntos temporales de intercambio H/D (60 y 240 minutos). La diferencia observada dentro de la cadena pesada de FIXa es significativa y es visible en casi todos los puntos temporales. Estos residuos se encuentran muy cerca de aquellas regiones en FIXa que se notifica que interactúan con el factor VIIIa (Bajaj SP et al. 2001. Factor IXa:factorVIIIa interaction: helix 330-338 of factor IXa interacts with residues 558-565 and spacially adjacent regions of the A2 subunit of factor VIIIa. J. Biol. Chem. 276(19): p16302).

Las alineaciones de secuencias de aminoácidos de FIXa humano, canino y de ratón sugieren que la selectividad medida de los compuestos de la presente invención para FIXa humano y canino en comparación con FIXa de ratón puede ser debida a F184Y y H185R.

Ejemplo 6

Estabilidad in vitro de los compuestos

Estabilidad en plasma

Ciertos compuestos de la presente divulgación tienen una estabilidad química limitada en plasma. Por ejemplo, el compuesto 1 muestra una degradación significativa después de 0,5 horas de incubación en plasma de ratón a 37 °C. Sin embargo, el compuesto 2 es estable en plasma de ratón durante al menos 3 h.

La estabilidad, por ejemplo, la estabilidad en plasma *in vitro* de los compuestos de la presente divulgación se puede aumentar incluyendo D-aminoácidos o residuos de aminoácidos N-metilados en la secuencia peptídica. Por ejemplo, la estabilidad de un compuesto se puede aumentar reemplazando la arginina (R) con D-arginina (r).

Las estabildades en plasma *in vitro* para los compuestos de la presente divulgación se determinaron usando un procedimiento de LC-MS. Los compuestos seleccionados se añadieron a 120 µl de plasma deficiente en FVIII humano (Siemens) para dar una concentración final de 50 µg/ml. Se tomó una parte alícuota de 20 µl de la muestra a tiempo 0 como control. La muestra restante se incubó a 37 °C durante 2 horas. Se tomaron partes alícuotas adicionales de 20 µl en los puntos temporales de 30 min, 1 h, 2 h. Todas las muestras (partes alícuotas de 20 µl) se trataron inmediatamente con 100 µl de acetonitrilo al 100 % frío, se agitaron durante 10 min y se centrifugaron a 13000 rpm durante 8 min. Los 100 µl de sobrenadante se transfirieron a un nuevo vial y se secaron mediante Speedvac y se reconstituyeron con 100 µl de acetonitrilo al 20 % y ácido fórmico al 0,1 %. Se inyectaron 90 µl de muestra reconstituida para análisis LC-UV-MS/MS. La MS se estableció en modo triple con barrido completo, barrido en zoom y barridos de MS/MS con los cinco iones principales usando exclusiones dinámicas. Se inyectaron 5 µl de péptido puro a 10 µg/ml en agua como control estándar. Condiciones de HPLC: A. 0,1 % de FA en agua; B. 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo, temperatura de la columna 50 °C; caudal de 0,4 ml/min; tiempo de ejecución de 8 minutos con gradiente rápido. Las muestras se analizaron mediante LC-MS, y los datos se revisaron para identificar cualquier producto descompuesto.

La estabilidad química de diversos compuestos de la presente divulgación en plasma humano se midió de acuerdo con el procedimiento anterior. Después de dos horas de incubación a 37 °C, los compuestos 5 y 6 no mostraron una degradación detectable, mientras que el compuesto 3 mostró una degradación de aproximadamente el 85 % después de 2 horas. Los resultados indican que los compuestos de la presente divulgación, que incorporan un D-aminoácido en el extremo N o cerca del extremo N (es decir, D-arginina), tales como los compuestos 5 y 6, son más estables en plasma (por ejemplo, plasma humano) que un compuesto correspondiente, que no incorpora dicho D-aminoácido (por ejemplo, compuesto 3). Los resultados se resumen en la Tabla 13 a continuación:

35

Tabla 13

Compuesto	Tiempo (min)	Degradación (%)
3	0	0,00
3	30	64,72
3	60	75,71
3	120	85,26
5	0	0,00
5	30	0,00
5	60	0,00
5	120	0,00
6	0	0,00
6	30	0,00
6	60	0,00
6	120	0,00

De manera similar, la estabilidad en plasma del compuesto 23 mejoró cuando se comparó con el compuesto 21, y la estabilidad química del compuesto 24 mejoró en comparación con la estabilidad del compuesto 22, mientras se mantuvo la actividad biológica en cada caso.

40

Productos de degradación en plasma de ratón

Las estabildades del compuesto 1 y 2 se pusieron a prueba en plasma de ratón. El compuesto 1 mostró una degradación significativa después de 0,5 h de incubación. Se encontraron dos productos de degradación para el compuesto 1, que se identificaron mediante espectroscopia de masas:

45

1. TCLASYCWLF (m/z teórico: 1204,50; encontrado 1204,44)
2. LTCLASYCWLF (m/z teórico: 1317,50; encontrado 1317,60).

Por el contrario, no se detectaron productos de degradación para el compuesto 2, incluso después de la incubación a 37 °C durante 3 horas en plasma de ratón.

Estabilidad en sangre completa

El compuesto 5 también fue estable en sangre completa durante al menos 120 minutos.

Ejemplo 7

Selección de bibliotecas de fagos para moléculas de unión a FIXa

- 15 Los péptidos seleccionados capaces de unirse a FIXa se identificaron seleccionando bibliotecas de presentación en fagos filamentosos con licencia de Dyax Corp. (Cambridge, MA). Más específicamente, las siguientes siete bibliotecas se usaron en combinación; TN6.VII, TN7.IV, TN8.IX, TN-9-IV, TN10-X, TN-11-I y TN-12-I se utilizaron en el cribado. El número total de fagos viables individuales contenidos en cada biblioteca se reflejó por el número de transformantes establecidos para cada biblioteca cuando las bibliotecas se expresaron en *E. coli* y se colocaron en placas a una dilución clonal como lo describe el protocolo Dyax. El número de transformantes para TN6.VII, TN7.IV, TN8.IX, TN-9-IV, TN10-X, TN-11-I y TN-12-I fue de $1,2 \times 10^9$, $2,3 \times 10^9$, $5,0 \times 10^9$, $3,2 \times 10^9$, 2×10^9 , $2,7 \times 10^9$ y $1,4 \times 10^9$, respectivamente. Otra forma de referirse al número absoluto de fagos viables en un volumen dado es establecer las unidades formadoras de placa (pfu) por unidad de volumen.

25 Reactivos

Los siguientes reactivos se usaron para el cribado de péptidos de unión a FIXa:

1. Ampicilina: 100 g de ampicilina en agua MQ 1L ; filtro esterilizado (0,22 μ m).
- 30 2. Medio NZCYM: 10 g de hidrolizado enzimático de caseína, 5 g de NaCl (cloruro de sodio), 5 g de extracto de levadura Bacto, 1 g de casaminoácidos Bacto (Casein Digest), 1 g de MgSO₄ anhidro en polvo (sulfato de magnesio). Los ingredientes se disolvieron en 800 ml de agua MQ y el pH se ajustó a 7,5 con NaOH 1 N (hidróxido de sodio), después se llevó a un volumen total de 1 l con agua MQ y se autoclavó a 120 °C durante 20 min.
3. Placas NZCYM-A50: medio NZCYM que contiene 15 g de Agar Bacto/1 l y 100 μ g de ampicilina/ml.
- 35 4. Medio NZCYM-T12.5: medio NZCYM que contiene tetraciclina a 12,5 μ g/ml placas NZCYM-T12.5: medio NZCYM que contiene 15 g de Bacto Agar/l y tetraciclina a 12,5 μ g/ml.
5. PBS: NaCl (cloruro de sodio) 150 mM, Na₂HPO₄ anhidro en polvo (fosfato de sodio, dibásico) 8 mM, KH₂PO₄ anhidro en polvo (fosfato de potasio, monobásico) 1,5 mM. Ajustar el pH a 7,4-7,6.
6. PEG/NaCl: 20 % de polietilenglicol 6000 (PEG), NaCl 2,5 M (cloruro de sodio). El tampón se esterilizó por filtración (0,22 μ m). Para preparar esta solución, se preparó un stock de solución de PEG al 40 % en agua MQ. Se añadió un volumen igual de NaCl 5 M mientras se agitaba para obtener la solución de reserva de PEG/NaCl 2,5 M al 20 %.
7. TBS: Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl (cloruro de sodio) 150 mM
8. TEA, 100 mM: trietilamina 100 mM (TEA). El tampón estaba recién preparado (pH).
9. Tetraciclina: 12,5 g de tetraciclina en etanol 1l. El tampón se almacenó en la oscuridad a -20 °C.
- 45 10. Tris-HCl, pH 7,4: Tris Base 1 M en agua MQ. Ajustar el pH con HCl a pH = 7,4. El tampón se esterilizó por filtración (0,22 μ m).

Protocolo de cribado: Ronda 1

- 50 Las placas Nunc se recubrieron con 5, 50 y 500 μ g/ml de Factor IXa humano (hFIXa, Hematologic Technologies) en TBS/CaCl₂ 5 mM/pH 7,4 durante una noche a 4 °C. La solución se retiró y la placa se bloqueó con leche al 2 % en TBS/CaCl₂ 5 mM/pH 7,4 durante 1-2 horas a temperatura ambiente.

- Se agruparon partes alícuotas (10 μ l para cada condición) de las 7 bibliotecas de Tn (Tn6~Tn12) y se mezclaron con un volumen igual de PBS/2 % de leche durante 1-2 horas a temperatura ambiente. A partir de esta solución, se añadieron 100 μ l a cada pocillo diana. Se dejó que los fagos se unieran a hFIXa durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución se retiró y los pocillos se lavaron 13 veces con leche al 2 % en TBS/CaCl₂ 5 mM/pH 7,4. A continuación, los fagos se eluyeron con 100 μ l de la solución de TEA por pocillo, la solución se retiró después de 2-5 minutos y se neutralizó con 50 μ l por pocillo de Tris-HCl 1 M a pH 7,4. Los fagos eluidos se usaron para transfectar *E. coli* XL1-Blue MRF' competente (Stratagene) y se amplificaron durante una noche a 37 °C como

se describe a continuación.

Infección por fagos

- 5 Una sola colonia de *E. Coli* XL1-Blue MRF' de una placa NZCYM-T12.5 se inoculó en 25 ml de caldo NZCYM-T12.5 (tetraciclina a 12,5 µg/ml). El cultivo se hizo crecer durante una noche a 37°C a 250 rpm. Al día siguiente, las células de *E. coli* XL1 blue MRF' se diluyeron 1:100 en 25 ml de NZCYM-T12.5 y se cultivaron durante aproximadamente 2 horas hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,5 a 600 nm. En esta etapa, se infectaron 10 ml del cultivo de XL1 blue MRF' con fagos a 37 °C durante 15 minutos.

10

Título de fagos

- Una parte alícuota de 20 µl del anterior cultivo XL1 blue MRF' infectado con fagos se diluyó con caldo NZCYM de manera sucesiva (10^4 , 10^5 y 10^6). Cada dilución se extendió sobre placas NZCYM-A50 que previamente se habían secado en una incubadora a 37°C durante 1 hora. Las placas se incubaron en una posición invertida durante una noche a 37°C. El título se calculó al día siguiente a partir de una placa que contenía de 30 a 300 placas. El título del fagos se derivó de la ecuación: Título de fagos = número de placa x 1/dilución x 1/fracción plateada.

15

Amplificación de fagos

20

- Las células infectadas se concentraron centrifugándolas a 3000 rpm, seguido de resuspensión en 10 ml de NZCYM durante una noche a 37°C sin agitación. A continuación, la suspensión se centrifugó a 10 K a 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante se precipitó con 0,5 ml de PEG al 30 % en hielo durante 1 hora. El fago precipitado se aisló por centrifugado y el sobrenadante se descartó. El sedimento de fagos se resuspendió en 100 µl por pocillo de PBS/2 % de leche.

25

Ronda 2 y 3

- La biblioteca de fagos amplificada se usó para una panorámica similar a la descrita anteriormente. Protocolo de cribado: Ronda 1. Al finalizar la ronda 3, los fagos en el eluyente se titularon y se ensayaron para determinar la unión de FIXa usando el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de fagos (ELISA).

30

ELISA de fagos

- 35 Las siguientes etapas se llevaron a cabo para identificar fagos que codifican péptidos que fueron capaces de unirse a hFIXa. Los tapones individuales de agar que contenían placas de fagos se recogieron con pipetas Pasteur esterilizadas en autoclave. Título de fagos. Los tapones se depositaron en placas de pocillos profundos estériles de 96 pocillos (Nunc), a los que se añadieron 400 µl por pocillo de medio NZCYM por pocillo. Los fagos se cultivaron durante una noche a 37°C. Además, se recubrieron 100 µl de 1 µg/ml de hFIXa en TBS/Ca en placas Nunc durante una noche a 4°C. La solución de hFIXa se retiró al día siguiente y la placa se lavó una vez con TBS/Ca/tween. Posteriormente, los pocillos se bloquearon con TBS/Ca/2 % de leche durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron de nuevo con TBS/Ca/tween antes de añadir 100 µl de fago. Se dejó que los fagos se unieran a hFIXa durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Después, los pocillos se lavaron tres veces con TBS/Ca/tween antes de añadir 100 µl de anticuerpo anti-M13 HRP (diluido a 1:5000 en TBS/Ca/2 % de leche) durante 1 hora. Nuevamente, los pocillos se lavaron tres veces con TBS/Ca/tween, y la señal de ELISA se detectó añadiendo 100 µl de TMB y barriendo la placa a 650 nm. Aproximadamente el 5 % de los péptidos identificados como de unión a FIXa del ELISA de fagos poseían actividad en el ensayo de generación de FXa.

40

45

Secuenciación

50

Se recogió una parte alícuota (50 µl) del sobrenadante de los clones de fagos positivos (señal diana de ELISA/señal de fondo de la leche >2,0) y se secuenció usando un cebador diseñado por Dyax (3seq-80: 5'gataaacgcatacaattaaaggtcc 3'). Entre ellos se descubrió la secuencia del compuesto 1.

Aislamiento del compuesto 3

- Se construyó una biblioteca de fagos secundaria basada en la secuencia primaria del compuesto 1. La biblioteca contenía la secuencia del compuesto 1 diseñada con un 30 % de probabilidad de un cambio de aminoácidos dentro de la secuencia del compuesto 1, así como cinco residuos de aminoácidos aleatorios adicionales que flanquean ambos extremos de la secuencia central.

60

- Los fragmentos de ADN que codifican los péptidos dentro de la biblioteca secundaria de 22 aminoácidos se generaron de la siguiente manera: se sintetizó un oligonucleótido de 105 bases para contener la secuencia (NNB)₅ compuesto 1 secuencia (NNB)₅, donde N = A, C, T o G y B = C, G o T. Este oligonucleótido se usó como plantilla (0,5 nM, 1 µl) en la amplificación por PCR junto con dos cebadores oligonucleotídicos más cortos (10 µM, 1 µl), los cuales complementan el 5' y el 3' extremo del oligo (oligos A y B, respectivamente). El producto de PCR resultante se purificó y se concentró con columnas de centrifugado QIAquick (Qiagen), después se digirió con NcoI y NotI. El fagémido pSYNPHE
- 10 (Syntonix) también se digirió con NcoI y NotI, seguido de un tratamiento con fosfatasa. Los ADN digeridos se resolvieron utilizando un gel de agarosa al 1 %, se escindieron y se purificaron mediante tratamiento con QIAEX II (Qiagen). El vector y el inserto se ligaron durante una noche a 15°C. El producto de ligamiento se purificó utilizando columnas de centrifugado QIAquick y la electroporación se realizó en una cubeta de electroporación (espacio de 0,1 mm; volumen de 0,5 ml) que contenía 12,5 µg de ADN y 500 µl de células electrocompetentes TG1 (Stratagene).
- 15 Inmediatamente después del pulso, se añadieron 12,5 ml de medio 2YT precalentado (37°C) que contenía un 2 % de glucosa y los transformantes se cultivaron a 37°C durante 1 hora. Los transformantes celulares se agruparon, se midió el volumen y se colocó una parte alícuota sobre 2YT que contenía 100 µg/ml de placas de amp para determinar el número total de transformantes.
- 20 Las células se cultivaron a 0,5 (A₆₀₀) en 2YT-amp/2 % de glucosa a 30°C a 250 rpm (agitador). Después se añadió el fago auxiliar M13K07 (Biolab) (moi = 10) y las células se incubaron durante 1 hora en las condiciones descritas anteriormente. Las células se sedimentaron a 2500 x g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en el volumen de cultivo inicial del medio, que contenía 100 mg/ml de amp y 50 mg/ml de kanamicina y se cultivó durante una noche a 30°C a 250 rpm. Después, las células se sedimentaron a 2500 x g durante
- 25 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a otro recipiente y se precipitó ajustando la solución al 4 % de PEG, NaCl 500 mM, y se enfrió a 4°C durante 1 hora antes del centrifugado a 10.000 g durante 10 min. El sedimento se resuspendió en TBS (1:100 del volumen de cultivo inicial). El fago se tituló infectando células TG1.

5'ATGGGCCCAGCCGGCCATGGCA(NNB)₅AAGCTGACGTGTCTGGCCAGTTATTGTTG
GCTGTTC(NNB)₃GCGGCCGCAGGTAGCTA3'

30

oligo A:	5'ATGGGCCCAGCCGGCCATG 3'
oligo B:	5'TAGCTACCTGCGGCCGC 3'
Condiciones de PCR:	95°C 5 min
95°C 30 s	
65°C 30 s	7-11x
72°C 30 s	
72°C 5 min	
4°C ∞	

La inmunoadsorción y el posterior ELISA se realizaron como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 8

35

Unión de hFIXa o hFVIIa a través de compuestos biotinilados capturados de la divulgación mediante sondas de estreptavidina inmovilizadas

- La afinidad de FIXa humano soluble o FVIIa soluble por péptidos biotinilados capturados de la divulgación se midió usando sondas de estreptavidina (SA). Las mediciones basadas en la interferometría de biocapa (BLI) se obtuvieron a 25°C con un instrumento ForteBio Octet 384 usando un tampón HBS-P (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, CaCl 5 mM y tensioactivo P20 al 0,05 %). En resumen, una capa de moléculas unidas a la punta de una fibra óptica crea un patrón de interferencia sobre la luz blanca incidente. La combinación de la fibra óptica y la superficie biocompatible crea las condiciones físicas necesarias para la BLI, permitiendo la detección de cambios en la acumulación de masa en la punta de la sonda. Esto se mide por alteraciones en el desplazamiento espectral (nm). Estos cambios se registran como un perfil de unión, una monitorización continua en tiempo real de la asociación y disociación de las moléculas que interactúan.
- 45

Todos os péptidos biotinilados (20 µg/ml) se diluyeron en cloruro de guanidinio 4 M y se cargaron a través de

biosensores de estreptavidina (SA) durante 120 segundos, produciendo una unión de aproximadamente 0,5 a 1,0 nm en las sondas de reacción. Las sondas de SA de control se cargaron con cloruro de guanidinio 4 M en ausencia de péptido biotinilado para la sustracción de referencia. Después de la carga, las sondas se incubaron en HBS-P durante 300 segundos para establecer un nuevo valor inicial. Posteriormente, las sondas biosensoras se incubaron en soluciones de FIXa o FVIIa humano (a 0, 2, 6, 20, 60, 200, 600, 2000 nM) durante 1 hora a temperatura ambiente para establecer un estado de equilibrio conocido como la fase de asociación. Las sondas se incubaron después en tampón HBS-P, permitiendo que FIXa o FVIIa humano se disocien de la sonda. Esto se describe como la fase de disociación. La KD en equilibrio se derivó del análisis de regresión no lineal de los datos sustraídos (sonda de reacción menos sonda de referencia) utilizando un modelo de unión 1:1 con el software ForteBio (versión 7.0).

Se midió la unión de hFIXa al compuesto 19 inmovilizado (compuesto 4 biotinilado en K18), RRAPGKLTCLASYCWLFK(PEG₂-Biotina)TGIA (análisis en estado de equilibrio). También se registraron las curvas de tiempo de asociación y disociación usando diversas concentraciones de hFIXa. En este experimento, se descubrió que la R_{máx} para la unión del compuesto 19 a FIXa humano era de 1,65 ± 0,116, y se descubrió que la constante de disociación (K_D) era de 120 nM ± 33 nM.

De manera similar, se evaluó la unión a FVIIa humano (hFVIIa). Por ejemplo, se midió la unión de hFVIIa al compuesto 25 y se descubrió que la K_D era 250 nM ± 36 nM.

20 Ejemplo 9

Ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT)

Para el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), los péptidos que se analizaron se diluyeron primero en 10 % de plasma humano deficiente en FVIII. Para el aPTT*, los péptidos se diluyeron en plasma humano deficiente en FVIII al 10 % que contenía trazas de hFIXa (en cualquier lugar entre 0 y 8,8 nM hFIXa dependiendo del ensayo) en tampón Tris/NaCl/BSA. Los péptidos se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se analizaron para determinar la coagulación en un instrumento Sysmex que registró el tiempo de coagulación observado para cada muestra. Los tiempos se compararon con los de una curva estándar derivada de estándares con actividad conocida de FVIII (U/ml) con el fin de determinar el resultado de la coagulación.

Los tiempos de coagulación para el compuesto 1, el compuesto 2 y el compuesto A (control desordenado) se midieron usando el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada modificado descrito anteriormente (aPTT*). Los compuestos se pusieron a prueba a 5, 10 y 20 µM. Los resultados resumidos en la tabla 14, a continuación, indican que la disminución del tiempo de coagulación observada para los compuestos de la presente divulgación es dependiente de FIXa.

Tabla 14

	Compuesto 1			Compuesto 2			Compuesto A		Blanco + FIXa
Conc. (µM)	20	10	5	20	10	5	20	10	-
Tiempo de coagulación, (s)	43,5;4	44,2;	47,3;	42,4;	42,9;	51,1;	122,0;	120,6;	120,2;
	3,8	43,3	47,9	42,3	42,2	50,3	123,2	123,2	120,2

Los tiempos de coagulación para el compuesto 1 y el compuesto 2 se midieron adicionalmente en presencia de diversas concentraciones de FIXa, y las actividades se compararon con una muestra en blanco (que no contenía péptido). Los resultados se resumen en la tabla 15 a continuación.

Tabla 15

	Compuesto 1				Compuesto 2				Blanco			
FIXa (nM)	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8
Tiempo de coagulación (s)	105,8;	84,4;	50,9;	40,1;	86,8;	51,3;	46,0;	34,4;	119,8;	119;	114,6;	107,8;
	107,4	82,8	50,6	40,6	91,4	49,6	42,7	37,1	120,6	120,4	115,4	108,4

Los tiempos de coagulación se midieron en un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada modificado (aPTT*) para los D-aminoácidos mutantes del compuesto 1 y se compararon con los valores de CE₅₀ obtenidos usando un ensayo de generación de FXa (compare con la tabla 1). Los resultados resumidos en la tabla 16 a continuación indican una fuerte correlación entre la actividad de generación de FXa y los valores de tiempo de coagulación medidos para la familia del compuesto 1 de mutantes de D-aminoácido. Estos resultados confirman además que la sustitución

de D-aminoácido de los aminoácidos del bucle (posiciones 5 a 9), y ciertos aminoácidos C-terminales dentro del compuesto 1 dan como resultado una actividad biológica reducida en comparación con el péptido nativo.

Tabla 16

Barrido de D-aminoácidos	Mutaciones de D-aminoácidos del compuesto 1, por posición													Blanco
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	TS	
CE ₅₀ , µM	(++ +)	(++ +)	(++)	(++)	>5	>5	(+)	>5	(+)	(++)	(+)	(+)	(++ +)	-
Tiempo de coagulación, s	60,6 ;	69,2 ;	79, 4;	60, 8;	115, 6;	117, 2;	117 ;	113, 8;	115;	63, 1;	96;	87, 6;	47,9 ;	116;
	61,8	69,8	80, 6	61, 8	115, 4	117, 8	118	115	113, 8	68, 8	98, 4	87, 8	47,8	117

5

Los tiempos de coagulación se midieron para el compuesto 3 en un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada modificado (aPTT*) en ausencia y presencia de diversas concentraciones de hFIXa exógeno como se indica. En este ensayo, el compuesto 3 reduce el tiempo de coagulación de una manera dependiente de FIXa. Los resultados se resumen en la tabla 17, a continuación:

10

Tabla 17

	Compuesto 3			Blanco		
FIXa, nM	0,5	2,2	8,8	0,5	2,2	8,8
Tiempo de coagulación, s	115,6;	90,8;	45,4;	122,6;	119,8;	106,8;
	115,2	89	41,9	124	119,8	106,8

Ejemplo 10

15 Dependencia de fosfolípidos

(a) Los valores de CE₅₀ y V_{máx} se midieron para diversos compuestos de la presente divulgación en un ensayo de generación de FXa (ejemplo 2) en ausencia y presencia de fosfolípidos (PL). Los resultados indican una dependencia limitada de fosfolípidos para los valores de CE₅₀ y V_{máx}. Los resultados se muestran en la tabla 18.

20

Tabla 18

Compuesto	PL	CE ₅₀ (µM)	V _{máx} (DOM/min min)
1	Sí	0,49	3,98
1	No	0,40	2,60
2	Sí	0,23	4,22
2	No	0,20	3,05
3	Sí	0,125	3,90
3	no	0,115	2,77

(b) En otro experimento, se puso a prueba el impacto de los fosfolípidos sobre hFIXa en presencia de FVIIIa en el ensayo de generación de FXa. Los componentes del ensayo del control fueron FVIIIa, FIXa, PL, FX y sustrato de FXa. 25 FIXa (100 nM) se preincubó con anticuerpos anti-FIX (1000 nM) específicos para el dominio Gla de FIX o control de IgG durante 20 minutos en hielo. Después de esta incubación, la actividad de FIXa se ensayó usando un ensayo de generación de FXa en presencia de FVIIIa.

(B.1.) FVIII (4 nM) se activó con trombina (0,5 nM) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió 30 hirudina (5 nM) a la reacción para inhibir la actividad de la trombina. FVIIIa (2 nM) y FIXa o FIXa tratados previamente con anticuerpos (4 nM) se incubaron después a temperatura ambiente durante 10 minutos en ausencia o presencia de vesículas de fosfolípido (PL) 200 µM para formar el complejo Xasa. Después de esto, 50 µl de la reacción se mezclaron con FX (100 nM) y un sustrato cromógeno específico de FXa (0,5 mM) y la absorbancia se monitorizó a 405 nm. Se midieron las tasas de generación de FXa (nM/min). Los resultados relativos al control (100 %) se resumen 35 en la tabla 19, a continuación:

Tabla 19

Experimento	Porcentaje de control
Control	100
Sin FIXa	0,0
Sin PL	0,01
IgG Anti-FIX (Gla)	12,5
IgG de control	98,6

En este experimento, la generación de FXa depende de la presencia de fosfolípidos. La eliminación de las vesículas de fosfolípidos reduce la tasa de generación de FXa en 10.000 veces. La generación de FXa depende, además, de FIXa. En presencia de anticuerpos anti-FIXa, la tasa de generación de FXa se reduce en 8 veces.

- 5 (b.2.) En otro experimento, se midió el impacto de los fosfolípidos sobre hFIXa en presencia del compuesto 3 en el ensayo de generación de FXa.

Para el ensayo que involucra un compuesto de la invención, FIXa (100 nM) se preincubó con anticuerpos anti-FIX (1000 nM) específicos para el dominio Gla de FIX. Después de esta incubación, FIXa (10 nM) se mezcló con el
 10 compuesto 3 (1 µM) en presencia de FX (100 nM), calcio y fosfolípidos del kit de ensayo cromógeno Coatest SP FVIII. La formación de FXa se monitorizó usando un sustrato cromógeno como se describe en el ensayo de generación de FXa directamente anteriormente (véase b.1.). Los resultados relativos al control (presencia de PL, 100 %) se resumen en la tabla 20, a continuación:

15

Tabla 20

	Experimento	Porcentaje de control
compuesto 3	+ PL	100
compuesto 3	- PL	90
compuesto 3	+ PL + IgG anti-FIX (Gla)	58,0
agua	+ PL	0,62
agua	-PL	1,85
agua	+ PL + IgG anti-FIX (Gla)	1,48

En este experimento, la generación de FXa no depende de la presencia de fosfolípidos y es significativamente menos dependiente de un dominio Gla funcional de FIXa que en el experimento de FVIIIa anterior (el dominio Gla de FIXa es responsable de la unión a fosfolípidos). El tratamiento con anticuerpo anti-Gla de FIX reduce la tasa de generación de
 20 FXa en menos de 2 veces. En este experimento, se usó agua como control, que esencialmente no generó ningún FXa.

Los resultados anteriores indican que el compuesto 3 aumenta la actividad catalítica de FIXa con una dependencia limitada de fosfolípidos (es decir, la ausencia de fosfolípidos en el sistema de ensayo anterior no disminuye sustancialmente la mejora de la actividad de FIXa por los compuestos de la presente divulgación (por ejemplo, el
 25 compuesto 3).

En experimentos similares, se evaluó el impacto de los fosfolípidos sobre hFVIIa en el ensayo de generación de FXa en ausencia y en presencia del compuesto 5. Los resultados indican que mientras que el aumento de la actividad catalítica de FIXa por el compuesto 5 es marginalmente dependiente de los fosfolípidos (aproximadamente el 80 %
 30 del control en ausencia de PL), el aumento de la actividad de FVIIa por el compuesto 5 es significativamente dependiente de fosfolípidos; es decir, significativamente reducido en ausencia de PL (aproximadamente el 10 % del control). Estos resultados indican que los compuestos de la presente divulgación (por ejemplo, el compuesto 5) mejoran la actividad de FVIIa de una manera dependiente de fosfolípidos.

35 **Ejemplo 11**

Un sitio de unión a FIXa compartido para los compuestos procoagulantes y heparina

Los péptidos procoagulantes mejoran la actividad de hFIXa al interactuar cerca del sitio de unión a FVIIIa en el dominio
 40 de proteasa.

La interacción entre ciertos péptidos procoagulantes y FIXa se estudió mediante espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (H/DX-MS). Los datos revelaron que los péptidos procoagulantes interactúan cerca del bucle 330 (numeración FIX) en FIXa, que está cerca del sitio de unión a FVIIIa postulado, así como del sitio de
 45 unión a heparina.

Se cree que la heparina tiene dos funciones en la inactivación de FIXa: la inhibición catalizada por heparina de FIXa por antitrombina (la heparina causa un cambio conformacional de la antitrombina), y la formación de puentes mediada por heparina de FIXa y antitrombina (PNAS 2010, 107, 645-650; J. Biol. Chem. 2002, 277, 50756-50760; J. Biol. Chem. 2003, 278, 35767-35774; J. Biol. Chem. 1998, 273, 120).

5

Ensayo de formación del complejo FIXa-AT acelerado por heparina

Estudios de competencia entre los péptidos procoagulantes y la heparina: los compuestos de la presente divulgación se pusieron a prueba en un ensayo de competencia con heparina en un esfuerzo por mapear adicionalmente el sitio de unión del péptido en FIXa. La inactivación de FIXa por antitrombina (AT) se evaluó mediante electroforesis en gel en presencia de heparina y concentraciones variables de péptidos procoagulantes. La velocidad de formación del complejo FIXa-AT se cuantificó durante un lapso de tiempo de 15 minutos. Las muestras de ensayo contenían FIXa humano 2 μ M (Haemotologic Technologies Inc.); Antitrombina 20 μ M (Haemotologic Technologies Inc.); Heparina 0, 1, 10 o 100 nM (Inyección de heparina sódica USP APPP Pharmaceuticals LLC) y 0, 0,1, 1 o 10 μ M del compuesto 5 en tampón Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 0,1 M, CaCl_2 10 mM. Las muestras se incubaron a 37°C en un baño de agua y se retiraron partes alícuotas de 12,5 μ l en cada punto temporal (0,5, 2, 5, 10, 15 min) y se mezclaron inmediatamente con 12,5 μ l de tampón de muestra no reductor SDS 2x. Las muestras se calentaron a 90°C durante 3 minutos y se cargaron en un gel BioRad al 4-20 % (20 μ l/carril). El gel se hizo desplazarse a 300 V durante 25 min, y las bandas se cuantificaron usando el software Quantity One de BioRad.

20

Se midió la velocidad de formación del complejo FIXa-antitrombina (AT) catalizada por heparina en ausencia o presencia del compuesto 5. En ausencia de heparina, la inactivación de FIXa por AT no se vio afectada por el compuesto 5. A concentraciones de heparina que aceleraron significativamente la inactivación por AT de FIXa (por ejemplo, aproximadamente 100 nM), ciertos compuestos de la presente divulgación (por ejemplo, compuesto 5) inhibieron la formación del complejo FIXa-AT catalizada por heparina (por ejemplo, de una manera dependiente de la concentración). Los resultados muestran que, en ausencia de heparina, la inactivación de FIXa por AT no se vio afectada por la presencia del compuesto 5. Sin embargo, a concentraciones de heparina (100 nM) que aceleraron significativamente la inactivación de FIXa por AT, el compuesto 5 inhibió la formación del complejo FIXa-AT de forma dependiente de la concentración. Los resultados sugieren un sitio de unión a FIXa compartido para los compuestos de la presente divulgación (por ejemplo, el compuesto 5) y la heparina. Los resultados se resumen en la tabla 21, a continuación:

30

Tabla 21

	% de formación de complejo FIXa-AT en presencia de compuesto 5			
Compuesto 5	0 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
0 min	0 %	0 %	0 %	0 %
0,5 min	52 %	57 %	30 %	18 %
2 min	71 %	72 %	45 %	28 %
5 min	79 %	82 %	55 %	41 %
10 min	81 %	82 %	70 %	54 %
15 min	83 %	83 %	74 %	62 %

Ejemplo 12

Efecto aditivo entre compuestos de la presente divulgación

y FIX-Fc o FVIIa-Fc

40

El efecto aditivo entre los compuestos de la presente divulgación y FVIIa-Fc o FIX-Fc se evaluó mediante un ensayo de tromboelastometría rotacional (ROTEM®) como se describe en el ejemplo 4 usando plasma deficiente en FIX o plasma deficiente en FVIII.

Efecto aditivo entre el compuesto 5 y FVIIa-Fc

El efecto de 5, 10 y 20 UI/ml de FVIIa-Fc se puso a prueba en ausencia o presencia de 2,5 o 5 μ M de compuesto 5 en plasma deficiente en FVIII.

En ausencia del compuesto 5, FVIIa-Fc (10 o 20 UI/ml) redujo el tiempo de coagulación a 1058 y 581 segundos y mejoró el ángulo alfa a 12 y 21 grados, respectivamente. El tiempo de coagulación inicial fue de 2439 segundos y el ángulo α de 9 grados con el desencadenante solo. En presencia del compuesto 5 (2,5 μ M), el tiempo de coagulación

se redujo aún más a 303,5 y 115 segundos y el ángulo α se incrementó aún más a 38,5 y 63 grados, respectivamente. Se observaron tendencias similares para 5 UI/ml de FVIIa-Fc y 5 μ M de compuesto 5.

Efecto aditivo entre el compuesto 5 y FIX-Fc

5 El efecto aditivo entre FIX-Fc y el compuesto 5 también se evaluó en plasma deficiente en FIX. FIX-Fc a 0,25 UI/ml redujo el tiempo de coagulación a 1173 segundos y el ángulo α a 26 grados en comparación con el tiempo de coagulación inicial de 3204 segundos y el ángulo α de 10 grados con desencadenante solo. En presencia de 2,5 μ M del compuesto 5, el tiempo de coagulación se redujo aún más a 876,5 segundos y el ángulo α se mejoró aún más a 10 39,5 grados. Todos los valores enumerados en este ejemplo son promedios de duplicados.

Los resultados anteriores muestran que los compuestos de la presente divulgación mejoran el efecto procoagulante de FVIIa-Fc y FIX-Fc en plasma deficiente en FVIII y FIX, respectivamente.

- 15 Debido a que una combinación de FVIIa-Fc y un compuesto de la presente divulgación reduce el tiempo de coagulación y aumenta el ángulo α más que cualquiera de los componentes solos, FVIIa-Fc y los compuestos de la presente divulgación son adecuados para usarse en conjunto (es decir, en una terapia de combinación, por ejemplo, para tratar la hemofilia, tal como hemofilia A).
- 20 Del mismo modo, debido a que una combinación de FIX-Fc y un compuesto de la presente divulgación reduce el tiempo de coagulación y aumenta el ángulo α más que cualquiera de los componentes solos, FIX-Fc y los compuestos de la presente divulgación son adecuados para usarse en conjunto (es decir, en una terapia de combinación, por ejemplo, para tratar la hemofilia, tal como hemofilia A).
- 25 Los resultados anteriores también indican que los conjugados entre FVIIa, FVIIa-Fc, FIX o FIX-Fc con los compuestos de la presente divulgación (por ejemplo, conjugados escindibles) son útiles en la terapia de la hemofilia (por ejemplo, hemofilia A). Los conjugados ejemplares se divulgan en el presente documento.

Ejemplo 13

30 **Los compuestos de la presente divulgación no tienen ningún efecto sobre la agregación plaquetaria**

Con el fin de determinar si los compuestos de la presente divulgación causan la agregación plaquetaria directamente, el compuesto 5 y el compuesto 22 se pusieron a prueba usando un agregómetro (Analizador de agregación de 35 plaquetas PAP8 v.2.0 de BIO/DATA Corporation). Se usó ADP como control positivo para la agregación plaquetaria.

Por ejemplo, el compuesto 5 no mostró un efecto significativo sobre las plaquetas activadas con adenosina 5'-difosfato (activadas con ADP) cuando se usó a una concentración de hasta 10 μ M, y mostró solo un efecto moderado sobre las plaquetas activadas con ADP cuando se usó a una concentración muy alta de 30 μ M. Además, el compuesto 5 no 40 indujo la agregación plaquetaria incluso a una alta concentración de aproximadamente 30 μ M. El compuesto 22 tampoco indujo la agregación plaquetaria a 10 μ M y 30 μ M.

Ejemplo 14

45 **Preparación de conjugados de FVIIa**

La clonación se realizó con el kit Rapid DNA Ligation de Roche Diagnostics (N.º de cat. 11635379001) siguiendo las indicaciones del fabricante. En resumen, se añadieron 10-50 ng de ADN de vector o fragmento a un volumen final de 10 μ l de mezcla de ligamiento que contiene 1 x tampón de ligamiento de ADN rápido y 1 μ l de ADN ligasa rápida. La 50 reacción se dejó proceder durante 5-30 minutos a temperatura ambiente y se colocó en hielo. Se transformaron 2 μ l de reacción de ligamiento en 50 μ l de células competentes de E. coli Mach1 de Invitrogen (n.º de cat. C869601) y se colocaron en placas con un antibiótico apropiado para la selección.

El fragmento de ADN de 3,1 kb que comprendía la región de HindIII a EcoRI de pSYN-FVII-171 se sintetizó y se 55 subclonó en los sitios HindIII/EcoRI del vector pcDNA4 (Invitrogen) para generar pSYN-FVII-171.

Para la expresión de FVII-171, se cultivaron células HEK-293-F en suspensión en medio de Freestyle (Invitrogen) suplementado con vitamina K3 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a 2 μ g/litro (medio de cultivo) como células en suspensión a 37°C/CO₂ al 10 %. Las células se subcultivaron cada tres o cuatro días sembrando a una densidad 60 celular de 5x10⁵ células/ml.

Veinticuatro horas antes de la transfección, las células se sembraron a una densidad de 7×10^5 células/ml en medio de cultivo. El día de la transfección, se realizó una solución de transfección con un volumen igual al 5 % del volumen total del cultivo celular a transfectar. En la solución de transfección, se añadió ADN (concentración final 20 mg/l) a una
5 solución recién preparada de PEI (60 mg/l) en medio de cultivo. La solución se agitó durante 30 segundos y se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente antes de añadirla directamente al cultivo celular. Cuatro horas más tarde, se añadió a las células un volumen igual al volumen de cultivo celular de OptiCHO (Invitrogen) suplementado con vitamina K3 y L-glutamina 200 mM. Se dejó crecer el cultivo celular como se ha mostrado anteriormente y se tomaron muestras diarias de los medios para evaluar la expresión de la proteína. El día de la recolección, las células
10 se sometieron a un centrifugado y los medios se filtraron en preparación para la purificación de proteínas o el análisis de proteínas mediante la precipitación de proteína A. Para la expresión de FVII-171, se contranfectó un plásmido que codifica FVII-171 con un plásmido que codifica la endopeptidasa propeptídica PC5 o PACE para garantizar la escisión de los sitios de endopeptidasa propeptídica en el enlazador que conecta el Fc al compuesto y entre la HC y la LC de FVII (figura 9).

15

Secuencia de ADN de FVII-171 (SEQ ID NO: 830):

```

1   ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
61  GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCCAC GCGCTCCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
121 GCGTTCCTGG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
301 GACCAGCTCC AGTCCTATAT CTGCTTCTGC CTCCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
361 ACGCACAAAG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
421 AGTGACCACA CGGGCACCAA GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGTGGCA
481 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
541 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA AGGAAGAGGA GGAAGAGGAT TGTGGGGGGC
601 AAGGTGTGCC CCAAAGGGGA GTGTCCATGG CAGGTCCTGT TGTGTGTGAA TGGAGCTCAG
661 TTGTGTGGGG GGACCCTGAT CAACACCATC TGGGTGGTCT CCGCGGCCCA CTGTTTCGAC
721 AAAATCAAGA ACTGAGAGAA CCTGATCGCG GTGCTGGGCG AGCACGACCT CAGCGAGCAC
781 GACGGGGATG AGCAGAGCCG GCGGGTGGCG CAGGTCATCA TCCCAGCAC GTACGTCCCG
841 GGCACCACCA ACCACGACAT CGCGCTGCTC CGCCTGCACC AGCCCGTGGT CCTCACTGAC
901 CATGTGGTGC CCCTCTGCCT GCCCGAACGG ACGTTCTCTG AGAGGACGCT GGCCTTCGTG
961 CGCTTCTCAT TGGTCAGCGG CTGGGGCCAG CTGCTGGACC GTGGCGCCAC GGCCCTGGAG
1021 CTCATGGTCC TCAACGTGCC CCGGCTGATG ACCCAGGACT GCCTGCAGCA GTCACGGAAG
1081 GTGGGAGACT CCCCAAATAT CACGGAGTAC ATGTTCTGTG CCGGCTACTC GGATGGCAGC
1141 AAGGACTCCT GCAAGGGGGA CAGTGGAGGC CCACATGCCA CCCACTACCG GGGCAGCTGG
1201 TACCTGACGG GCATCGTCAG CTGGGGCCAG GGCTGCGCAA CCGTGGGCCA CTTTGGGGTG
1261 TACACCAGGG TCTCCCAGTA CATCGAGTGG CTGCAAAAGC TCATGCGCTC AGAGCCACGC
1321 CCAGGAGTCC TCCTGCGAGC CCCATTTCCT GGTGGCGGTG GCTCCGGCGG AGGTGGGTCC
1381 GGTGGCGGCG GATCAGGTGG GGGTGGATCA GGCGGTGGAG GTTCCGGTGG CGGGGCTCC
1441 GACAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GTCGCGAAC TCCTGGGAGG ACCGTCAGTC
1501 TTCCTCTTCC CCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA
1561 TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
1621 GCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
1681 CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG
1741 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA
1801 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA GCTGACCAAG
1861 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
1921 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCG GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GTTGGACTCC
1981 GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTCGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
2041 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
2101 CTCTCCCTGT CTCGGGTAA ACGGCGCCGC CGGAGCGGTG GCGGCGGATC AGGTGGGGGT
2161 GGATCAGGCG GTGGAGGTTT CCGTGGCGGG GGATCTGGCG GTGGAGGTTT CCGTGGGGGT
2221 GGATCCAGGA AGAGGAGGAA GAGGGGCCCC CGGATCCGGA CAGTGGGCCC CGGCAGCCGG

```

2281 AGCGCCAGCG GCAAGCTGAC CTGCCTGGCC AGCTACTGCT GGCTGTTCTG GACCGGCATC
 2341 GCCGGTGGCG GTGGATCCGG CGGAGGTGGG TCCGGTGGCG GCGGATCAGG TGGGGGTGGA
 2401 TCAGGCGGTG GAGGTTCGGG TGGCGGGGGA TCAGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 2461 CCAGCACCGG AACTCCTGGG CGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA ACCCAAGGAC
 2521 ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA
 2581 GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA
 2641 AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG
 2701 CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
 2761 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC
 2821 ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC
 2881 AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC
 2941 AACTACAAGA CCAGCCTCC CGTGTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCT CTACAGCAAG
 3001 CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
 3061 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGA

Secuencia de aminoácidos de FVII-171 (SEQ ID NO: 831)

- 5 La secuencia señal está subrayada, el propéptido está doblemente subrayado, el sitio de escisión de furina que separa la cadena ligera y la cadena pesada está subrayado mediante puntos, la región enlazadora que conecta la cadena pesada a la región Fc está subrayada mediante líneas discontinuas, el sitio de escisión de furina que separa Fc y el enlazador está subrayado con trazo grueso, el sitio de escisión de furina que separa el enlazador y el compuesto 21 está subrayado mediante ondas y la región enlazadora que separa el compuesto 21 y Fc está subrayada mediante
 10 punto-punto-guión.

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 61 SFEEAREIFK DAERTKLEWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 121 THKDDQLICV NENGGCEQYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSCTPTVE YPCGKIPILE
 181 KRNASKPQGR RKRRKRIVGG KVC PKGEC PW QVLLLVNGAQ LCGGTINTI WVVSAAHCFD
 241 KIKNWRNLIA VLGEHDLSEH DGDEQSRRVA QVIIPSTYVP GTTNHDIALL RLHQPVVLT
 301 HVVPLCLPER TFSERTLAFV RFSLVSGWGQ LLDRGATALE LMVLNVPRLM TQDCLQQRK
 361 VGDSFNITEY MFCAGYSDGS KDSCKGDSGG PHATHYRG TW YLTGIVSWGQ GCATVGHFV
 421 YTRVSQYIEW LQKLMRSEPR PGVLLRAPFP GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS
 481 DKHTHTCPPC APELLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 541 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
 601 GQPREPQVYT LPPSRDELT NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLD
 661 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPGKRRR RSGGGSGGG
 721 GSGGGSGGGG GSGGGSGGGG GSRKRKRGP RIRTVGPGSR SASGKLTCLA SYCWLFWTGI
 781 AGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SDKHTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPKPKD
 841 TLMISRTPEV TCVVVDVSH E DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL
 901 HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPFSRDELT KNQVSLTCLV
 961 KGFYPSDIAV EWESNGQ PEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSV M
 1021 EALHNHYTQK SLSLSPGK

15

Ejemplo 15

Preparación de conjugados de FIX

Construcción FIX-124

La clonación y la expresión se realizaron como se describe en el ejemplo 14.

5

El fragmento de ADN de 3,4 kb que comprendía la región de HindIII a EcoRI de pSYN-FIX-124 se sintetizó y se subclonó en los sitios HindIII/EcoRI del vector pcDNA4 (Invitrogen) para generar pSYN-FIX-124 (conjugado de FIX-Fc-compuesto 21).

10 Secuencia de ADN de FIX-124 (SEQ ID NO: 832)

```

1   ATGCAGCGCG TGAACATGAT CATGGCAGAA TCACCAGGCC TCATCACCAT CTGCCTTTTA
61  GGATATCTAC TCAGTGCTGA ATGTACAGTT TTTCTTGATC ATGAAAACGC CAACAAAATT
121 CTGAATCGGC CAAAGAGGTA TAATTCAGGT AAATTGGAAG AGTTTGTTC AAGGAATCTA
181 GAGAGAGAAT GTATGGAAGA AAAGTGTAGT TTTGAAGAAG CACGAGAAGT TTTTGAAAAC
241 ACTGAAAGAA CAACTGAATT TTGGAAGCAG TATGTTGATG GAGATCAGTG TGAGTCCAAT
301 CCATGTTTAA ATGGCGGCAG TTGCAAGGAT GACATTAATT CCTATGAATG TTGGTGTCCC
361 TTTGGATTTG AAGGAAAGAA CTGTGAATTA GATGTAACAT GTAACATTAA GAATGGCAGA
421 TGCGAGCAGT TTTGTAAAAA TAGTGCTGAT AACAAGGTGG TTTGCTCCTG TACTGAGGGA
481 TATCGACTTG CAGAAAACCA GAAGTCCTGT GAACCAGCAG TGCCATTTCC ATGTGGAAGA
541 GTTTCTGTTT CACAAACTTC TAAGCTCACC CGTGCTGAGA CTGTTTTTCC TGATGTGGAC
601 TATGTAAATT CTAAGAAGC TGAAACCATT TTGGATAACA TCACTCAAAG CACCCAATCA
661 TTTAATGACT TCACTCGGGT TGTTGGTGGA GAAGATGCCA AACCAGGTCA ATTCCCTTGG
721 CAGGTTGTTT TGAATGGTAA AGTTGATGCA TTCTGTGGAG GCTCTATCGT TAATGAAAAA
781 TGGATTGTAA CTGCTGCCCC CTGTGTTGAA ACTGGTGTTA AAATTACAGT TGTCGCAGGT
841 GAACATAATA TTGAGGAGAC AGAACATACA GAGCAAAAGC GAAATGTGAT TCGAATTATT
901 CCTCACCACA ACTACAATGC AGCTATTAAT AAGTACAACC ATGACATTGC CCTTCGGAA
961 CTGGACGAAC CCTTAGTGCT AAACAGCTAC GTTACACCTA TTTGCATTGC TGACAAGGAA
1021 TACACGAACA TCTTCCTCAA ATTTGGATCT GGCTATGTAA GTGGCTGGGG AAGAGTCTTC
1081 CACAAAGGGA GATCAGCTTT AGTTCTTCAG TACCTTAGAG TTCCACTTGT TGACCGAGCC
1141 ACATGTCTTC GATCTACAAA GTTCACCATC TATAACAACA TGTTCGTGTC TGGCTTCCAT
1201 GAAGGAGGTA GAGATTATG TCAAGGAGAT AGTGGGGGAC CCCATGTTAC TGAAGTGGAA
1261 GGGACCAGTT TCTTAACTGG AATTATTAGC TGGGGTGAAG AGTGTGCAAT GAAAGGCAAA
1321 TATGGAATAT ATACCAAGGT GTCCCGGTAT GTCAACTGGA TTAAGGAAAA AACAAAGCTC
1381 ACTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCTCCGG AACTCCTGGG AGGACCGTCA
1441 GTCTTCCTCT TCCCCCAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC

```

1501 ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 1561 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG
 1621 TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC
 1681 AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC
 1741 AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC
 1801 AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 1861 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGTGGAC
 1921 TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAAG CTCACCGTCG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG
 1981 GGGAACTGCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG
 2041 AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAACGGCGC CGCCGGAGCG GTGGCGGCGG ATCAGGTGGG
 2101 GGTGGATCAG GCGGTGGAGG TTCCGGTGGC GGGGGATCTG GCGGTGGAGG TTCCGGTGGG
 2161 GGTGGATCCA GGAAGAGGAG GAAGAGGGGC CCCCAGGATCC GGACAGTGGG CCCCAGCAGC
 2221 CGGAGCGCCA GCGGCAAGCT GACCTGCCTG GCCAGCTACT GCTGGCTGTT CTGGACCGGC
 2281 ATCGCCGGTG GCGGTGGATC CGGCGGAGGT GGGTCCGGTG GCGGCGGATC AGGTGGGGGT
 2341 GGATCAGGCG GTGGAGGTTT CCGTGGCGGG GGATCAGACA AAACCTCACAC ATGCCACCG
 2401 TGCCAGCAC CGGAACCTCT GGGCGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCCAAG
 2461 GACACCCTCA TGATCTCCCC GACCCCTGAG GTCACATGCG TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC
 2521 GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG
 2581 ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA GTACAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC
 2641 CTGCACCAGG ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC
 2701 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA ACCACAGGTG
 2761 TACACCCTGC CCCCATCCCG GGATGAGCTG ACCAAGAACC AGGTCAGCCT GACCTGCCTG
 2821 GTCAAAGGCT TCTATCCAG CGACATCGCC GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG
 2881 AACAACTACA AGACCACGCC TCCCGTGTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC
 2941 AAGCTCACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
 3001 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC GGGTAAATGA

Secuencia de aminoácidos de FIX-124 (SEQ ID NO: 833)

- 5 La secuencia señal está subrayada, el propéptido está doblemente subrayado, el Fc que separa el Factor IX y el sitio de escisión de furina está subrayado mediante puntos, el enlazador que separa 2 sitios de escisión de furina está subrayado mediante ondas, el compuesto 21 que separa el sitio de escisión de furina y el enlazador está subrayado mediante líneas discontinuas, Fc está subrayado mediante punto-punto-guión.

1 MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG KLEEFVQGNL
 61 ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN PCLNGGCKD DINSYECWCP
 121 FGFEGKNCEL DVTCNIKNGR CEQFCKNSAD NKVVCSTEG YRLAENQKSC EPAVPFPCGR
 181 VVSQTSKLT RAETVFPDVD YVNSTEAETI LDNITQSTQS FNDFTRVVGG EDAKPGQFPW
 241 QVVLNGKQDA FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVG EHNIEETEHT EQQRNVIRII
 301 PHHNYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLSY VTPICIADKE YTNIFLKFGS GYVSGWGRVF

361 HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE
 421 GTSFLTGIIS WGEECAMKKG YGIYTKVSRY VNWIKEKTKL TDKTHTCPPC PAPELLGGPS
 481 VFLEPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
 541 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPSPRDEL
 601 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGOPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQO
 661 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKRR RRSGGGGSGG GSGGGGGSGG GSGGGGGSGG
 721 GGSRRKRKRG PRIRTVGPGS RSASGKLTCL ASYCWLFWTG IAGGGGSGGG GSGGGGGSGG
 781 GSGGGGGSGG GSDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH
 841 EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL
 901 PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
 961 NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

La actividad TGA de FIX-124 se comparó con FIX-Fc (sin péptido).

- 5 La actividad TGA de FIX-124 se midió en plasma HRF deficiente en FIX agrupado con los resultados resumidos en la tabla 22, a continuación:

Tabla 22

	Actividad TGA de FIX-124 y FIXFc en plasma deficiente en FIX				
Conc. (nM)	0	6,7	33,5	67	134
FIX-124, nM altura máxima de trombina	32,48; 29,88	97,98; 96,48	111,59; 102,01	106,71; 106,15	103,19; 101,87
FIXFc, nM altura máxima de trombina		35,11; 35,42	40,42; 40,93	46,45; 48,00	75,08; 80,78

- 10 La actividad TGA de FIX-124 se midió en plasma de Precision Biologics deficiente en FVIII con los resultados resumidos en la tabla 23, a continuación:

Tabla 23

	Actividad TGA de FIX-124 y FIXFc en plasma deficiente en FVIII			
Conc. (nM)	0	6,7	33,5	134
FIX-124, nM altura máxima de trombina	18,24; 14,64	32,09; 29,17	39,72; 38,02	40,79; 36,89
FIXFc, nM altura máxima de trombina		21,06; 20,56	18,54; 18,4	22,23; 21,83

15 Ejemplo 16

Preparación de conjugados de resto de direccionamiento a plaquetas

Construcción pSYN-Fc-046

20

La clonación y la expresión se realizaron como se describe en el ejemplo 14.

- 25 El fragmento de ADN de 2,6 kb que comprendía la región de HindIII a EcoRI de pSYN-Fc-046 se sintetizó y se subclonó en los sitios HindIII/EcoRI del vector pcDNA4 (Invitrogen) para generar pSYN-Fc-046 (conjugado de PDG13-Fc-compuesto 21).

Secuencia de ADN de Fc-046 (SEQ ID NO: 834)

ES 2 724 778 T3

```

1   ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTA CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACTGGT
61  GGCCCCCGGA TTCGGACAGT GGGCCCCGGC AGCCGGAGCG CCAGCGGCAA GCTGACCTGC
121 CTGGCCAGCT ACTGCTGGCT GTTCTGGACC GGCATCGCCG GTGGCGGTGG ATCCGGCGGA
181 GGTGGGTCCG GTGGCGGCGG ATCAGGTGGG GGTGGATCAG GCGGTGGAGG TTCCGGTGGC
241 GGGGGATCAG AAAAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CTCCGGAAC TCTGGGAGGA
301 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT
361 GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
421 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC
481 AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG
541 GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
601 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG
661 CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
721 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG
781 TTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTTAC AGCAAGCTCA CCGTCGACAA GAGCAGGTGG
841 CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
901 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA CGGCGCCGCC GGAGCGGTGG CGGCGGATCA
961 GGTGGGGGTG GATCAGGCGG TGGAGGTTC GGTGGCGGGG GATCCGGCGG TGGAGGTTC
1021 GGTGGGGGTG GATCAAGGAA GAGGAGGAAG AGGCAGGTGA AACTGCTCGA GTCTGGGGGA
1081 GGCCTGGTCC AGCCTGGGAG GTCCCTGAGA CTCTCCTGTG CAGCCTCTGG ATTACCTTC
1141 AGTAGCTATG CTATGCACTG GGTCCGCCAG GCTCCAGGCA AGGGGCTGGA GTGGGTGGCA
1201 GTTATATCAT ATGATGGAAG CAATAAATAC TACGCAGACT CCGTGAAGGG CCGATTGCCC
1261 ATCTCCAGAG ACAATTCCAA GAACACGCTG TATCTGCAA TGAACAGCCT GAGAGCTGAG
1321 GACACGGCTG TGTATTACTG TGCGAGAGCG CTGGGGAGCT GGGGGGGTTG GGACCACTAC
1381 ATGGACGTCT GGGGCAAAGG GACCACGCTC ACCGTCTCCT CAGGTGGCGG CGGATCAGGT
1441 GGGGGTGGAT CAGGTGGCGG TGGCTCCGGT GGCGGGGGAT CAGTGGTGAC TCAGCCACCC
1501 TCAGCGTCTG GGACCCCCGG GCAGAGGGTC ACCATCTCTT GTTCTGGAAG CAGCTCCAAC
1561 ATCGGAAGTA ATACTGTAAA CTGGTACCAG CAGCTCCCAG GAACGGCCCC CAAATCCTC
1621 ATCTATAGTA ATAATCAGCG GCCCTCAGGG GTCCCTGACC GATTCTCTGG CTCCAAGTCT
1681 GGCACCTCAG CTTCCCTGGC CATCAGTGGG CTCCAGTCTG AGGATGAGGC TGATTATTAC

```

```

1741   TGTGCAGCAT GGGATGACAG CCTGAATGGT TGGGTGTTTCG GCGGAGGGAC CAAGCTGACC
1801   GTCCTAGGTC AGCCCGGTGG CGGTGGCTCC GGCGGAGGTG GGTCCGGTGG CGGCGGATCA
1861   GGTGGGGGTG GATCAGGCGG TGGAGGTTCC GGTGGCGGGG GATCAGACAA AACTCACACA
1921   TGCCACCGT GCCCAGCACC GGAAGTACTG GGCGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA
1981   AAACCCAAGG ACACCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
2041   GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT
2101   AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTACGCGTC
2161   CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
2221   AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
2281   CCACAGGTGT ACACCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTACGCGTC
2341   ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG
2401   CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC
2461   CTCTACAGCA AGCTACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC
2521   TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
2581   GGTAAATGA

```

Secuencia de aminoácidos de Fc-046 (SEQ ID NO: 835):

- 5 La secuencia de señal está subrayada, el enlazador que conecta el compuesto 21 a Fc está subrayado mediante puntos, el sitio de escisión de furina que separa Fc y la región enlazadora está subrayado mediante trazo grueso, el sitio de escisión de furina que separa la región enlazadora y PDG13 scFv está subrayado mediante ondas, y el enlazador se conecta PDG13 y Fc está subrayado mediante líneas discontinuas.

```

1   METDTLLLWV LLLWVPGSTG GPRIRTVGPG SRSASGKLTG LASYCWLFWT GIAGGGGSGG
61  GSGGGGSGG GSGGGGSGG GGS.DKHTTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTF
121 EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
181 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
241 AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDS---DGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
301 QKSLSLSPGK RRRRS---GGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGS---RKRRK--- RQVKLLESGG
361 GVVQPG---SLR LSCAASGFTF SSYAMHWVRQ APGKGLEWVA VISYDGSNKY YADSVKGRFA
421 ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARA LGSWGGWDHY MDVWGKGT---TV TVSSGGGSGG
481 GGGSGGGSGG GGS---VVTQPP SASGTPGQRV TISCSGSSSN IGSNTVNWYQ QLPGTAPKLL
541 IYSNNQRPSG VPDRFSGSKS GTSASLAISG LQSEDEADYY CAAWDDSLNG WVFGGGTKLT
601 VLGPQGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS
661 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
721 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL
781 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
841 SVMHEALHNH YTKSLSLSP GK

```

Ejemplo 17

Preparación de conjugados de Fc

15

Construcción pSYN-Fc-045

La clonación y la expresión se realizaron como se describe en el ejemplo 14.

- 20 El fragmento de ADN de 1,8 kb que comprendía la región de HindIII a EcoRI de pSYN-Fc-045 se sintetizó y se subclonó

en los sitios HindIII/EcoRI del vector pcDNA4 (Invitrogen) para generar pSYN-Fc-045 (conjugado de Fc-compuesto 21).

Secuencia de ADN de Fc-045 (SEQ ID NO: 836)

```

1      ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTA CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACTGGT
61     GACAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCC GCTCCGGAAC TCCTGGGAGG ACCGTGAGTC
121    TTCCTCTTCC CCCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA
181    TGGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
241    GGGTGGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCAGGTAC
301    CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAA
361    TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA
421    GGGCAGCCCC GAGAACACACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA GCTGACCAAG
481    AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
541    TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GTTGGACTCC
601    GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTCGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
661    AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
721    CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ACGGCGCCGC CGGAGCGGTG GCGGCGGATC AGGTGGGGGT
781    GGATCAGGCG GTGGAGGTTC CGGTGGCGGG GGATCTGGCG GTGGAGGTTC CGGTGGGGGT
841    GGATCCAGGA AGAGGAGGAA GAGGGGCCCC CGGATCCGGA CAGTGGGCCC CGGCAGCCGG
901    AGCGCCAGCG GCAAGCTGAC CTGCCTGGCC AGCTACTGCT GGCTGTTCTG GACCGGCATC
961    GCCGGTGGCG GTGGATCCGG CGGAGGTGGG TCCGGTGGCG GCGGATCAGG TGGGGGTGGA
1021   TCAGGCGGTG GAGGTTCGGG TGGCGGGGGA TCAGACAAA CTCACACATG CCCACCGTGC
1081   CCAGCACCGG AACTCCTGGG CGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA ACCCAAGGAC
1141   ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA
1201   GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA
1261   AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG
1321   CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
1381   GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC
1441   ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC
1501   AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC
1561   AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGTGGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAAG
1621   CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
5      1681   GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGA

```

Secuencia de aminoácidos de Fc-045 (SEQ ID NO: 837)

La secuencia señal está subrayada, el sitio de escisión de furina que separa Fc y el enlazador está subrayado mediante
10 puntos, el sitio de escisión de furina que separa el enlazador y el compuesto 21 está subrayado mediante trazo grueso,
la región enlazadora que conecta el compuesto 21 a la región Fc está subrayado mediante ondas.

```

1    METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT
61   CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
121  CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
181  WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMH EALHNHYTQKS
241  LSLSPGKRRR RSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSRKRRKRG RIRTVGPGSR
301  SASGKLTCLA SYCWLFWTGI AGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SDKTHTCPPC
361  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT
421  KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
481  TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVL DSGSFFLYSK
541  LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

```

Ejemplo 18

5 Preparación de conjugados útiles para el posterior ligamiento químico a compuestos

Construcción pSYN-CysFc-044

La clonación se realizó como se describe en el ejemplo 14.

10

El fragmento de ADN de 3,2 kb que comprendía la región de HindIII a EcoRI de pSYN-CysFc-044 se sintetizó y se subclonó en los sitios HindIII/EcoRI del vector pcDNA4 (Invitrogen) para generar pSYN-CysFc-044 (PDG13-CysFc).

Secuencia de ADN de CysFc-044 (SEQ ID NO: 838)

15

```

1    ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTA CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACTGGT
61   TGCCCGCCGT GCCCGGCTCC GGAACCTCTG GGAGGACCGT CAGTCTTCCT CTCCCCCA
121  AAACCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
181  GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT
241  AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCTCAGTC
301  CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
361  AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
421  CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTCTCAGCTG
481  ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG

```

541 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC
601 CTCTACAGCA AGCTCACCCT CGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC
661 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
721 GGTAAACGGC GCCGCCGGAG CGGTGGCGGC GGATCAGGTG GGGGTGGATC AGGCGGTGGA
781 GGTTCGGGTG GCGGGGGATC CGGCGGTGGA GGTTCGGGTG GGGGTGGATC AAGGAAGAGG
841 AGGAAGAGGC AGGTGAAACT GCTCGAGTCT GGGGGAGGCG TGGTCCAGCC TGGGAGGTCC
901 CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTC ACCTTCAGTA GCTATGCTAT GCACTGGGTC
961 CGCCAGGCTC CAGGCAAGGG GCTGGAGTGG GTGGCAGTTA TATCATATGA TGGAAGCAAT
1021 AAATACTACG CAGACTCCGT GAAGGGCCGA TTCGCCATCT CCAGAGACAA TTCCAAGAAC
1081 ACGCTGTATC TGCAAATGAA CAGCCTGAGA GCTGAGGACA CGGCTGTGTA TTACTGTGCG
1141 AGAGCGCTGG GGAGCTGGGG GGGTTGGGAC CACTACATGG ACGTCTGGGG CAAAGGGACC
1201 ACGGTCACCG TCTCCTCAGG TGGCGGCGGA TCAGGTGGGG GTGGATCAGG TGGCGGTGGC
1261 TCCGGTGGCG GGGGATCAGT GGTGACTCAG CCACCCTCAG CGTCTGGGAC CCCCAGGACG
1321 AGGGTCACCA TCTCTGTTC TGGAAGCAGC TCCAACATCG GAAGTAATAC TGTAAGTGG
1381 TACCAGCAGC TCCCAGGAAC GGCCCCAAA CTCCTCATCT ATAGTAATAA TCAGCGGCCC
1441 TCAGGGGTCC CTGACCGATT CTCTGGCTCC AAGTCTGGCA CCTCAGCCTC CCTGGCCATC
1501 AGTGGGCTCC AGTCTGAGGA TGAGGCTGAT TATTACTGTG CAGCATGGGA TGACAGCCTG
1561 AATGGTTGGG TGTTCCGCGG AGGGACCAAG CTGACCGTCC TAGGTACAGC CCGTGGCGGT
1621 GGCTCCGCGG GAGGTGGGTC CGGTGGCGGC GGATCAGGTG GGGGTGGATC AGGCGGTGGA
1681 GGTTCGGGTG GCGGGGGATC AGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCAGAA
1741 CTACTGGGCG GACCGTCAGT CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
1801 TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC
1861 AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCCGGGAG
1921 GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG
1981 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCAGC CCCCATCGAG
2041 AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA
2101 TCCCGGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT
2161 CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC
2221 ACGCCTCCCG TGTTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC
2281 AAGAGCAGGT GGCAGCAGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
2341 AACCCTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGTA AATGA

Secuencia de aminoácidos de CysFc-044 (SEQ ID NO: 839):

- 5 La secuencia señal está subrayada, el sitio de escisión de furina que separa Fc truncado y el enlazador está subrayado mediante trazo grueso, el sitio de escisión de furina que separa el enlazador y el PDG13 scFv está subrayado mediante puntos y la región enlazadora que conecta el PDG-13 scFv con la región Fc está subrayada mediante líneas discontinuas.

10

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD

61 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 121 KALPAPIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
 181 QPENNYKTPP FVLDSGSEFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP
 241 GKRRRRSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSRKR_RKRQVKLLES GGGVVQPGRS
 301 LRLSCAASGF TFSSYAMHWV RQAPGKGLEW VAVISYDGSN KYYADSVKGR FAISRDN SKN
 361 TLYLQMNSLR AEDTAVYYCA RALGSWGGWD HYMDVWGKGT TTVTVSSGGGG GSGGGGSGGG
 421 SGGGGSVVTQ PPSASGTPGQ RVTISCSGSS SNIGSNTVNW YQQLPGTAPK LLIYSNNQRP
 481 SGVPDRFSGS KSGTSASLAI SGLQSEDEAD YYCAAWDDSL NGWVFGGGTK LTVLGQPGGG
 541 GSGGGGSGGG_GSGGGGSGGG_GSGGGGSDKT HTCPCPCAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
 601 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 661 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY
 721 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
 781 NHYTQKSLSL SPGK

Ejemplo 19

5 Preparación de compuestos con un enlazador escindible

(a) Síntesis de compuestos que incorporan un enlazador autodestructivo

- 10 A continuación, se perfila la preparación para un conjugado (conjugado A) en el que el compuesto 5 está conectado covalentemente a un enlazador que comprende el radical autodestructivo carbamato de p-anilina bencilo (PABC) y un resto de sustrato de trombina. De manera similar, se prepararon conjugados que incorporan otros restos de sustrato de trombina y se pusieron a prueba para determinar la escisión en presencia de trombina.

Fmoc-Cys(Acm)-Gly-Gly-Gly-Gly-Dphe-Pip-Arg(Pbf)

- 15 El péptido completamente protegido se escindió de la resina TGT de NovaPEG en un 30 % de HFIP/DCM y se filtró en un matraz de reacción de fondo redondo. Los disolventes se eliminaron al vacío y el concentrado que contenía el péptido se precipitó y se trituroó adicionalmente con éter dietílico (Et₂O) enfriado con hielo. Este material se usó directamente sin purificación adicional. ESI-MS m/z: 1309,51 (MH)⁺.

Fmoc-Cys(Acm)-Gly-Gly-Gly-Gly-Dphe-Pip-Arg(Pbf)-PABOH (alcohol p-anilina bencílico)

- 25 Una solución agitada de Fmoc-Cys(Acm)-Gly-Gly-Gly-Gly-Dphe-Pip-Arg(Pbf) (268 mg, 0,2 mmol) y alcohol p-anilina bencílico (28 mg, 1,1 equiv) en THF (2 ml) a temperatura ambiente se trató con EEDQ (55,6 mg, 1,1 equiv). Después de 16 h, la mezcla se evaporó a sequedad y el residuo se trituroó con éter. El producto sólido blanco resultante se recogió por centrifugado y se secó al vacío (200 mg, 70 %). ESI-MS m/z: 1414,61 (MH)⁺.

Fmoc-Cys(Acm)-Gly-Gly-Gly-Gly-Dphe-Pip-Arg(Pbf)-PABC-PNP

- 30 Una solución agitada de Fmoc-Cys(Acm)-Gly-Gly-Gly-Gly-Dphe-Pip-Arg(Pbf)-PABOH (180 mg, 0,127 mmol) en THF seco (4 ml) y DCM (4 ml) a temperatura ambiente se trató con cloroformiato de PNP (38,5 mg, 1,5 equiv) y piridina seca (15 mg, 1,5 equiv). Después de 16 h, la mezcla se concentró hasta 1 ml y el producto se precipitó y se trituroó con éter frío. El producto sólido blanco resultante se recogió por centrifugado y se secó al vacío (150 mg, 75 %). ESI-MS m/z: 1579,61 (MH)⁺.

rRAPGK(Alloc)LTCLASYCWLFWTGIA-NH₂(disulfuro)

- 40 El compuesto 5 protegido con alloc fue sintetizado en resina Rink Amide de NovaPEG (0,2 mmol) como se describe en el procedimiento general. El enlace disulfídico Cys-Cys se formó agitando el péptido en bruto en DMSO al 50 %/H₂O durante una noche a 37°C. Se obtuvieron 35 mg de péptido después de la purificación por HPLC preparativa. ESI-MS m/z: 1298,17 (MH₂)²⁺, 865,78 (MH₃)³⁺.

Fmoc-Cys(Acm)-Gly-Gly-Gly-Gly-Dphe-Pip-Arg(Pbf)-PABC-rRAPGK (Alloc)LTCLA SYCWLFWTGIA-NH₂

(disulfuro)

Fmoc-Cys(Acm)-Gly-Gly-Gly-Gly-Dphe-Pip-Arg(Pbf)-PABC-PNP (12,5 mg, 0,008 mmol) y rRAPGK(Alloc)LTCLASYCWLFWTGIA (30 mg, 0,011 mmol) en DMF (1 ml) a temperatura ambiente se trataron con DIPEA (6,5 μ l, 5 equiv). La mezcla se dejó reposar en la oscuridad durante la noche. El producto en bruto se precipitó y se trituró con éter frío. El producto en bruto resultante se recogió por centrifugado, se secó al vacío y se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. ESI-MS m/z : 2018,32 (MH_2)²⁺, 1345,86 (MH_3)³⁺.

Fmoc-Cys(Acm)-Gly-Gly-Gly-Gly-Dphe-Pip-Ars-PABC-rRAPGK(Alloc)LTCLA SYCWLFWTGIA-NH₂ (disulfuro)

La desprotección con Pbf de Fmoc-Cys(Acm)-Gly-Gly-Gly-Gly-Dphe-Pip-Arg(Pbf)-PABC-rRAPGK(Alloc)LTCLA SYCWLFWTGIA de la etapa anterior se llevó a cabo en 1 ml de mezcla de disolventes (72 % de TFA, 5 % de DMF, 5 % de H₂O, 18 % de DCM) durante 75 min. Dado que el enlazador PABC era inestable en esta condición, se tomaron partes alícuotas en diversos puntos temporales para monitorizar el progreso de la reacción. A los 75 minutos, se añadió éter frío (50 ml) para detener la reacción. El sólido resultante se purificó por HPLC preparativa, para dar un polvo blanco (8 mg, 25 % para 2 etapas). ESI-MS m/z : 1261,83 (MH_3)³⁺.

Fmoc-Cys(Acm)-Gly-Gly-Gly-Gly-Dphe-Pip-Arg-PABC-rRAPGKLTCLA SYCWLFWTGIA-NH₂ (disulfuro)

Fmoc-Cys(Acm)-Gly-Gly-Gly-Gly-Dphe-Pip-Arg-PABC-rRAPGK(Alloc)LTCLASYCWLFWTGIA (8 mg, 0,002 mmol) en MeOH/dioxano (1: 1, 180 μ l) bajo N₂ a temperatura ambiente se trató con Pd(PPh₃)₄ (0,0002 mmol, 0,1 equiv, 20 μ l de una solución en THF de Pd(PPh₃)₄ (23 mg/ml), seguido de PhSiH₃ (0,01 mmol, 5 equiv). Después de 20 min, la mezcla en bruto se precipitó y se trituró con éter frío. El producto en bruto resultante se usó para la siguiente etapa sin purificación. ESI-MS m/z : 1233,82 (MH_3)³⁺.

Cys(Acm)-Gly-Gly-Gly-Gly-Dphe-Pip-Arg-PABC-rRAPGKLTCLASYCWLFWTGIA-NH₂ (disulfuro)

La desprotección con Fmoc de Fmoc-Cys(Acm)-Gly-Gly-Gly-Gly-Dphe-Pip-Arg-PABC-rRAPGKLTCLA SYCWLFWTGIA de la etapa anterior se llevó a cabo en DMSO (200 μ l) con Et₃NH (50 μ l, exceso). Después de 20 minutos, la reacción se completó y la mezcla se purificó por HPLC preparativa, para dar al conjugado A como un polvo blanco (0,83 mg, 12 % en 2 etapas). ESI-MS m/z : 1159,80 (MH_3)³⁺, 1159,80 (MH_4)⁴⁺.

Los procedimientos anteriores se pueden usar para sintetizar conjugados que comprenden otros compuestos de la presente divulgación.

(b) Escisión por trombina del conjugado A

El conjugado A (21 μ l, 0,24 mM) en agua se añadió a 476,5 μ l de PBS. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos, seguido de 2,5 μ l de trombina (278 nM, 10 μ g/ml), dando las siguientes concentraciones iniciales aproximadas: trombina (1,4 nM, concentración fisiológica), conjugado A (10 μ M). La mezcla se incubó a 37°C. Partes alícuotas (60 μ l) en diversos puntos temporales se inactivaron con 1 μ l de hirudina (10 uM) y se inyectaron en la HPLC (columna C-18, CH₃CN/H₂O, del 0 al 70 % durante 12 minutos, 60°C, 0,5 ml/min,

λ

= 280 nm). En estas condiciones, el conjugado A se escindió rápidamente mediante trombina 1,4 nM para liberar el compuesto procoagulante activo 5 (es decir, el conjugado se escindió completamente después de aproximadamente 60 minutos de incubación).

Ejemplo 20**Preparación de conjugados de Fc-compuesto por ciclación de azida-alquino catalizada por cobre**

A continuación se perfila un procedimiento semisintético para preparar conjugados en el que un compuesto de la presente divulgación está unido a Fc. Este procedimiento permite el enlace de Fc con un compuesto que contiene un aminoácido no natural. La incorporación de aminoácidos no naturales puede aumentar la actividad biológica y/o la estabilidad. Este procedimiento es un enfoque alternativo al ligamiento químico nativa con una Cys N-terminal en Fc y un péptido-tioéster directamente.

NH₂-PEG₂₇-COSBn

Una solución agitada de Boc-NH-PEG₂₇-COOH (500 mg, 0,35 mmol) y bencilmercaptano (174 mg, 4 equiv) en DMF

(2 ml) a temperatura ambiente se trató con DIC (53 mg, 1,2 equiv) y DMAP (4,3 mg, 0,1 equiv). Después de 16 h, el producto en bruto se precipitó, se trituró con éter frío y se recogió por centrifugado. El grupo Boc se escindió mediante la adición de 10 ml de TFA al 95 %/TIPS en el sedimento blanco resultante. Después de 30 minutos, la mezcla se concentró hasta 1 ml y el producto se precipitó y se trituró con éter frío. El producto de aceite blanquecino resultante se recogió por centrifugado, se secó al vacío y se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional (550 mg). ESI-MS m/z : 1428,83 (MH)⁺.

N₃-PEG₂₇-COSBn:

10 Una solución agitada de NH₂-PEG₂₇-COSBn (300 mg, 0,21 mmol) y ácido 5-azidopentanoico (60 mg, 2 equiv) en DMF (1 ml) a temperatura ambiente se trató con PyBOP (164 mg, 1,5 equiv) y DIEA (136 mg, 5 equiv). Después de 16 h, el producto en bruto se precipitó, se trituró con éter frío y se recogió por centrifugado. El sólido resultante se purificó por HPLC preparativa, para dar un polvo blanco (120 mg, 37 %). ESI-MS m/z : 1553,77 (MH)⁺.

15 Conjugado dimérico de Fc-PEG₂₇-N₃

Cys-Fc (2580 µl, 8 mg/ml en PBS, pH 7,4) se trató con sal sódica del ácido 2-mercaptoetanosulfónico (MESNA) (300 µl, 100 mM en PBS) y N₃-PEG₂₇-COSBn (120 µl, 50 mM en agua) de manera que la concentración final de Cys-Fc, MESNA y N₃-PEG₂₇-COSBn fue de 6,9 mg/ml, 10 mM y 2 mM respectivamente. La mezcla de reacción se dejó reposar 20 h. La mezcla de reacción en bruto se dializó exhaustivamente contra PBS (pH 7,4) (7 cambios en 24 horas). El gel de SDS-PAGE y la LC/MS mostraron una conversión superior al 90 %. Peso molecular observado (reducido): 27707,02.

Conjugado de Fc-PEG₂₇-péptido procoagulante (ciclación de azida-alquino catalizada por cobre)

25 El conjugado dimérico de Fc-PEG₂₇-N₃ (20 µl, 13 mg/ml en PBS, pH 7,4) se trató con una solución premezclada de CuSO₄ y Tris(3-hidroxipropil)triazolilmetil)amina (THPTA) (10 µl, relación 1:1, 10 mM en agua) y Pra-PEG4-PRIRTVGPGSRASGKLTCLASYCWLFWTGIA-NH₂ (30 µl, 2,15 mM) (Pra = L-propargilglicina). El pH se ajustó a 5,5 mediante la adición de un tampón MES (40 µl, 1M pH 5,5) y agua (90 µl). Se añadió ascorbato de sodio, agente reductor (10 µl, 100 mM) para iniciar la reacción. Las concentraciones finales del conjugado dimérico de Fc-PEG₂₇-N₃, CuSO₄, THPTA y SYN4002 fueron 49 µM, 500 µM, 500 µM y 322,5 µM, respectivamente. Después de 2 h, la LC/MS 30 mostró más del 90 % de conversión. Peso molecular observado (reducido): 31501,96.

Ejemplo A

35 Estudios in vivo de Hemofilia A/B

Los compuestos y conjugados procoagulantes de la presente divulgación se pueden poner a prueba usando animales hemofilia A y/o B. En un ejemplo, el animal es un ratón con hemofilia A. En otro ejemplo, el animal de ensayo es un 40 perro con hemofilia A (por ejemplo, una colonia criada mantenida en el Francis Owen Blood Research Laboratory at the University of North Carolina, Chapel Hill). Estos perros tienen un fenotipo hemofílico grave comparable a la forma grave de la enfermedad humana (Graham, JB, et al., J. Exp. Med. 1949;90:97-111; Lozier, JN, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 2002;99:12991-12996).

45 En un ejemplo, se inyectan compuestos y/o conjugados procoagulantes de la presente divulgación, por ejemplo, IV o SC, en ratones con hemofilia A. La sangre se recoge mediante punción de la vena cava en diferentes puntos temporales, por ejemplo, 2, 15, 30, 60, 120, 240 y 480 min (3-5 ratones por punto temporal) y se citrataron inmediatamente. En otro ejemplo, la sangre se recoge a los 2 min, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h y 96 h. La actividad se mide mediante Rotem ex vivo, y la sangre restante se centrifuga a 5000 rpm durante 2x10 min para generar plasma 50 para el análisis PK.

En un ejemplo, se inyectan compuestos y/o conjugados procoagulantes de la presente divulgación, por ejemplo IV o SC, en perros con hemofilia A. Las muestras de sangre se extraen en diferentes puntos temporales, por ejemplo 2, 15, 30, 60, 120, 240 y 480 min. En otro ejemplo, se extrae sangre a los 2 min, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h y 96 h. La 55 actividad se mide mediante el tiempo de coagulación de sangre completa (WBCT) ex vivo, y la sangre restante se centrifuga a 5000 rpm durante 2x10 min para generar plasma para el análisis PK (Dumont, JA, et al. Blood 2012, 119, 3024-3030).

En un ejemplo, se inyectan compuestos y/o conjugados procoagulantes de la presente divulgación, por ejemplo IV o 60 SC, en ratones con hemofilia A y la eficacia aguda se pone a prueba mediante un modelo de corte en la punta de la

cola. Poco después de la inyección, por ejemplo 5 min, los ratones se lesionan con un corte en la punta de la cola y la pérdida de sangre se mide durante 30 min (10-15 ratones por dosis) y se compara con los ratones tratados con vehículo y con FVIII (Dumont, JA, et al. Blood 2012, 119, 3024-3030).

- 5 En un ejemplo, se inyectan compuestos y/o conjugados procoagulantes de la presente divulgación, por ejemplo IV o SC, en ratones con hemofilia A y la eficacia profiláctica se pone a prueba mediante un modelo de transección de la vena caudal (TVT). Después de la inyección, por ejemplo, después de 24 horas, los ratones se lesionan con TVT y la tasa de supervivencia se mide en diferentes puntos temporales, por ejemplo, cada hora hasta 24 horas (10-15 ratones por dosis) y en comparación con los ratones tratados con vehículo y FVIII. (Dumont, JA, et al. Blood 2012, 119, 3024-3030).

Se pueden usar modelos adicionales de sangrado y trombogenicidad, como se describe en Tranholm, M, et al, Blood 2003, 102, 3615-3620; Tranholm, M, et al, Thrombosis Research 2003, 109, 217-223; Lauritzen, B, et al, Journal of Thrombosis and Hemostasis 2009, 7, 651-657.

- 15 Habiendo descrito completamente esta invención, los expertos en la materia entenderán que la misma se puede realizar dentro de un amplio y equivalente intervalo de condiciones, formulaciones y otros parámetros sin afectar el alcance de la invención o cualquiera de sus realizaciones.
- 20 Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la consideración de la memoria descriptiva y de la práctica de la invención divulgada en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren meramente ilustrativos, y el alcance verdadero de la invención está indicado por las siguientes reivindicaciones.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BIOGEN IDEC MA INC. THORN,
KARINA
TOBY, GARABET G.

30 MEZO, ADAM R.

<120> COMPUESTOS PROCOAGULANTES Y PROCEDIMIENTOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> 2159.338PC07

- 35 <140> A conceder
<141> con la presente

<150> US 61/495.818

40 <151> 10/06/2011

<150> US 61/600.237

<151> 17/02/2012

45 <150> US 61/605.540

<151> 01/03/2012

<150> US 61/496.540

<151> 13/06/2011

- 50 <150> US 61/496.543
<151> 13/06/2011

<150> US 61/496.541

55 <151> 13/06/2011

<150> US 61/496.542

<151> 13/06/2011

60 <160> 16

<170> Patentin versión 3.5

<210> 700

5 <211> 5052

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ADN de cadena FVIII-Fc con dominio B eliminado

<220>

<221> péptido señal

<222> (1)..(57)

15 <223> péptido señal de FVIII

<220>

<221> característica_diversa

<222> (4372)..(5052)

20 <223> Región Fc

<400> 700

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180

acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat	300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtc tcatgctgtt	360
ggtgtatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg	420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg	480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat	540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa	600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta	660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggctc	780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct	900
cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gaccttgac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaactga tggcatggaa	1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat	1140
gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact	1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
ccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320
aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct	1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg	1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
gatgtccgtc ctttgatttc aaggagatta caaaagggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
actaaatcag atcctcggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgttaa tatggagaga	1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa	1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag	1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttcc tccccaatcc agctggagtg	1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt	1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgttg catgaggtgg catactggta cattctaagc	1980
attggagcac agactgactt ctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa	2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc	2160

atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac	2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc	2280
ttctctcaaa acccaccagt cttgaaacgc catcaacggg aaataactcg tactactctt	2340
cagtcagatc aagaggaaat tgactatgat gataccatat cagttgaaat gaagaaggaa	2400
gattttgaca tttatgatga ggatgaaaat cagagccccc gcagctttca aaagaaaaca	2460
cgacactatt ttattgctgc agtggagagg ctctgggatt atgggatgag tagctcccca	2520
catgttctaa gaaacagggc tcagagtggc agtgtccctc agttcaagaa agttgttttc	2580
caggaattta ctgatggctc ctttactcag cccttatacc gtggagaact aaatgaacat	2640
ttgggactcc tggggccata tataagagca gaagttgaag ataatatcat ggtaactttc	2700
agaaatcagg cctctcgtcc ctattccttc tattctagcc ttatttctta tgaggaagat	2760
cagaggcaag gagcagaacc tagaaaaaac tttgtcaagc ctaatgaaac caaaacttac	2820
ttttggaaag tgcaacatca tatggcacc ctaaaagatg agtttgactg caaagcctgg	2880
gcttatttct ctgatgttga cctggaaaaa gatgtgcact caggcctgat tggaccctt	2940
ctggtctgcc aactaacac actgaaccct gctcatggga gacaagtgc agtacaggaa	3000
tttgcctgt ttttcacat ctttgatgag accaaaagct ggtacttcac tgaaaatatg	3060
gaaagaaact gcagggtcc ctgcaatac cagatggaag atcccacttt taaagagaat	3120
tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct	3180
caggatcaaa ggattcgatg gtatctgctc agcatgggca gcaatgaaaa catccattct	3240
attcatttca gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaaag aggagtataa aatggcactg	3300
tacaatctct atccaggtgt ttttgagaca gtggaaatgt taccatcaa agctggaatt	3360
tggcgggtgg aatgccttat tggcgagcat ctacatgctg ggatgagcac actttttctg	3420
gtgtacagca ataagtgtca gactcccctg ggaatggctt ctggacacat tagagatttt	3480
cagattacag cttcaggaca atatggacag tgggccccaa agctggccag acttcattat	3540
tccggatcaa tcaatgcctg gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg	3600
ttggcaccaa tgattattca cggcatcaag acccaggtg cccgtcagaa gttctccagc	3660
ctctacatct ctcagtttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtg gcagacttat	3720
cgaggaaatt cactggaac cttaatggtc ttctttggca atgtggattc atctgggata	3780
aaacacaata tttttaaccc tccaattatt gctcgatata tccgtttgca cccaactcat	3840
tatagcattc gcagactct tcgcatggag ttgatgggct gtgatttaa tagttgcagc	3900
atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcacctac	3960
tttaccaata tgtttgccac ctggtctcct tcaaaagctc gacttcacct ccaagggagg	4020
agtaatgcct ggagacctca ggtgaataat ccaaaagagt ggctgcaagt ggacttcag	4080

```

aagacaatga aagtcacagc agtaactact cagggagtaa aatctctgct taccagcatg 4140
tatgtgaagg agttcctcat ctccagcagt caagatggcc atcagtggac tctctttttt 4200
cagaatggca aagtaaaggt ttttcagggc aatcaagact ccttcacacc tgtggtgaac 4260
tctctagacc caccgttact gactcgtac ctctgaattc acccccagag ttgggtgcac 4320
cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac aggacctcta cgacaaaact 4380
cacacatgcc caccgtgccc agctccagaa ctctggggc gaccgtcagt cttcctcttc 4440
ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccgagccc ctgaggtcac atgctgtgtg 4500
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 4560
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta cctgtgtgtc 4620
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggctc 4680
tccaacaaag ccctccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 4740
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccggtatg agctgaccaa gaaccaggctc 4800
agcctgacct gcctggtcaa aggtctctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 4860
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgttggactc cgacggtcc 4920
ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 4980
tcatgtcccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 5040
tctccgggta aa 5052

```

<210> 701

<211> 1684

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de cadena FVIII-Fc con dominio B eliminado

<220>

10 <221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

<222> (20)..(759)

15 <223> Secuencia HC

<220>

<221> DOMINIO

<222> (760)..(772)

<223> Secuencia de dominio B

20 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

<222> (1458)..(1684)

<223> Secuencia Fe

<400> 701

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

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

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

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

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

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val

ES 2 724 778 T3

260	265	270
Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile		
275	280	285
Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser		
290	295	300
Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met		
305	310	315
Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His		
325	330	335
Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro		
340	345	350
Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp		
355	360	365
Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser		
370	375	380
Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr		
385	390	395
Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro		
405	410	415
Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn		
420	425	430
Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met		
435	440	445
Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu		
450	455	460
Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu		
465	470	475
Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro		
485	490	495
His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys		
500	505	510
Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe		
515	520	525

ES 2 724 778 T3

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

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

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

ES 2 724 778 T3

1280		1285		1290
Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser	Met Pro Leu Gly Met	Glu Ser Lys		
1295	1300	1305		
Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile	Thr Ala Ser Ser Tyr	Phe Thr Asn		
1310	1315	1320		
Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro	Ser Lys Ala Arg Leu	His Leu Gln		
1325	1330	1335		
Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg	Pro Gln Val Asn Asn	Pro Lys Glu		
1340	1345	1350		
Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln	Lys Thr Met Lys Val	Thr Gly Val		
1355	1360	1365		
Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser	Leu Leu Thr Ser Met	Tyr Val Lys		
1370	1375	1380		
Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser	Gln Asp Gly His Gln	Trp Thr Leu		
1385	1390	1395		
Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val	Lys Val Phe Gln Gly	Asn Gln Asp		
1400	1405	1410		
Ser Phe Thr Pro Val Val Asn	Ser Leu Asp Pro Pro	Leu Leu Thr		
1415	1420	1425		
Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro	Gln Ser Trp Val His	Gln Ile Ala		
1430	1435	1440		
Leu Arg Met Glu Val Leu Gly	Cys Glu Ala Gln Asp	Leu Tyr Asp		
1445	1450	1455		
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro	Cys Pro Ala Pro Glu	Leu Leu Gly		
1460	1465	1470		
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu		
1475	1480	1485		
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu	Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val		
1490	1495	1500		
Ser His Glu Asp Pro Glu Val	Lys Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly		
1505	1510	1515		
Val Glu Val His Asn Ala Lys	Thr Lys Pro Arg Glu	Glu Gln Tyr		
1520	1525	1530		

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

Lys

<210> 702

<211> 741

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN Fe

10 <220>

<221> péptido_ señal

<222> (1)..(60)

<223> péptido señal de Igk de ratón

15 <400> 702

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc 120

```

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca      180
tgcggtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac      240
ggcggtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac      300
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag      360
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      420
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgcgatga gctgaccaag      480
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcggtggag      540
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc      600
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg      660
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      720
ctctccctgt ctccgggtaa a                                              741

```

<210> 703

<211> 247

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido de cadena Fc

10 <220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(20)

<223> péptido señal de Igk de ratón

15 <400> 703

```

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

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

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

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

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
    65                               70                               75                               80

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
                85                               90                               95

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
    100                               105                               110

```

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
115 120 125

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
130 135 140

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
145 150 155 160

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
165 170 175

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
180 185 190

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
195 200 205

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
210 215 220

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
225 230 235 240

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 704

<211> 7734

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

10 <220>

<221> péptido_síñal

<222> (1)..(57)

<223> péptido síñal de FVIII

15 <220>

<221> característica_diversa

<222> (7054)..(7734)

<223> Región Fc

20 <400> 704

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaatcttt tccattcaac	180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240

gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgagggttat	300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctgtt	360
gggtgatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg	420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggctctg	480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat	540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa	600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta	660
tttgatgaag ggaaaagtgg gcaactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct	780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacctat	900
cgccaggcgt ccttggaat ctgcgaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gaccttgac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaactga tggcatggaa	1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggg caggtttgat	1140
gatgacaact ctcttcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact	1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320
aagtacaaaa aagtcgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct	1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaaagttg agacacactg	1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta caaaagggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
actaaatcag atcctcggtg cctgacccgc tattactcta gtttcgttaa tatggagaga	1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa	1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag	1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg	1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt	1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc	1980
attggagcac agactgactt ctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa	2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc	2160

atgaccgcct tactgaaggt ttctagtgtg gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac	2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc	2280
ttctcccaga attcaagaca ccctagcact aggcaaaagc aattttaatgc caccacaatt	2340
ccagaaaatg acatagagaa gactgaccct tggtttgac acagaacacc tatgcctaaa	2400
atacaaaatg tctcctctag tgatttggtg atgctcttgc gacagagtcc tactccacat	2460
gggctatcct tatctgatct ccaagaagcc aaatatgaga ctttttctga tgatccatca	2520
cctggagcaa tagacagtaa taacagcctg tctgaaatga cacacttcag gccacagctc	2580
catcacagtg gggacatggt atttaccctt gagtcaggcc tccaattaag attaaatgag	2640
aaactgggga caactgcagc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttctagtaca	2700
tcaaataatc tgatttcaac aattccatca gacaatttgg cagcaggtag tgataatata	2760
agttccttag gacccccaag tatgccagtt cattatgata gtcaattaga taccactcta	2820
tttggcaaaa agtcatctcc ccttactgag tctggtggac ctctgagctt gagtgaagaa	2880
aataatgatt caaagttgtt agaatcaggt ttaatgaata gccaaagaaag ttcattgggga	2940
aaaaatgtat cgtcaacaga gagtggtagg ttattttaaag ggaaaagagc tcatggacct	3000
gctttgttga ctaaagataa tgccttattc aaagtttagca tctctttgtt aaagacaaac	3060
aaaacttcca ataattcagc aactaataga aagactcaca ttgatggccc atcattatta	3120
attgagaata gtccatcagt ctggcaaaat atattagaaa gtgacactga gtttaaaaaa	3180
gtgacacctt tgattcatga cagaatgctt atggacaaaa atgctacagc tttgaggcta	3240
aatcatatgt caaataaaaac tacttcatca aaaaacatgg aaatggtcca acagaaaaaa	3300
gagggcccca ttccaccaga tgcacaaaat ccagatatgt cgttctttta gatgctattc	3360
ttgccagaat cagcaagggtg gatacaaagg actcatggaa agaactctct gaactctggg	3420
caaggcccca gtccaaagca attagtatcc ttaggaccag aaaaatctgt ggaaggctcag	3480
aatttcttgt ctgagaaaaa caaagtggta gtaggaaagg gtgaatttac aaaggacgta	3540
ggactcaaag agatgggttt tccaagcagc agaaacctat ttcttactaa cttggataat	3600
ttacatgaaa ataatacaca caatcaagaa aaaaaattc aggaagaaat agaaaagaag	3660
gaaacattaa tccaagagaa tgtagttttg cctcagatac atacagtgcac tggcactaag	3720
aatttcatga agaacctttt cttactgagc actaggcaaa atgtagaagg ttcatatgac	3780
ggggcatatg ctccagtact tcaagatttt aggtcattaa atgattcaac aaatagaaca	3840
aagaaacaca cagctcattt ctcaaaaaa ggggaggaag aaaacttgga aggcttggga	3900
aatcaaacca agcaaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatatc tcctaataca	3960
agccagcaga attttgtcac gcaacgtagt aagagagctt tgaacaatt cagactccca	4020
ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acacctcaac ccagtgggcc	4080
aaaaacatga aacatttgac cccgagcacc ctcacacaga tagactacaa tgagaaggag	4140

aaaggggcca ttactcagtc tcccttatca gattgcctta cgaggagtca tagcatccct	4200
caagcaaata gatctccatt acccattgca aaggtatcat catttccatc tattagacct	4260
atatatctga ccagggtcct attccaagac aactcttctc atcttccagc agcatcttat	4320
agaaagaaag attctggggt ccaagaaagc agtcatttct tacaaggagc caaaaaaat	4380
aacctttctt tagccattct aaccttggag atgactggtg atcaaagaga ggttggctcc	4440
ctggggacaa gtgccacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctcccg	4500
aaaccagact tgcccaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaaagt tcacatttat	4560
cagaaggacc tattccctac ggaaactagc aatgggtctc ctggccatct ggatctcgtg	4620
gaagggagcc ttcttcaggg aacagaggga gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct	4680
ggaaaagttc cctttctgag agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta	4740
ttggatctc ttgcttgga taaccactat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa	4800
tcccaagaga agtcaccaga aaaaacagct tttaagaaaa aggataccat tttgtccctg	4860
aacgcttgtg aaagcaatca tgcaatagca gcaataaatg agggacaaaa taagcccgaa	4920
atagaagtca cctgggcaaa gcaaggtagg actgaaaggc tgtgctctca aaaccacca	4980
gtcttgaaac gccatcaacg ggaaataact cgtactactc ttcagtcaga tcaagaggaa	5040
attgactatg atgataccat atcagttgaa atgaagaagg aagattttga catttatgat	5100
gaggatgaaa atcagagccc ccgcagcttt caaaagaaaa cacgacacta ttttattgct	5160
gcagtggaga ggctctggga ttatgggatg agtagctccc cacatgttct aagaaacagg	5220
gctcagagtg gcagtgtccc tcagttcaag aaagttgttt tccaggaatt tactgatggc	5280
tcctttactc agcccttata ccgtggagaa ctaaataaac atttgggact cctggggcca	5340
tatataagag cagaagttga agataatatc atggtaactt tcagaaatca ggcctctcgt	5400
ccctattcct tctattctag ccttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa	5460
cctagaaaaa actttgtcaa gcctaataaa accaaaactt acttttggaa agtgcaacat	5520
catatggcac ccactaaaga tgagtttgac tgcaaagcct gggcttattt ctctgatgtt	5580
gacctgaaa aagatgtgca ctcaggcctg attggacccc ttctggtctg ccacactaac	5640
acactgaacc ctgctcatgg gagacaagtg acagtacagg aatttgctct gtttttcacc	5700
atctttgatg agacaaaag ctggtacttc actgaaaata tggaagaaa ctgcagggt	5760
ccctgcaata tccagatgga agatcccact tttaaagaga attatcgctt ccatgcaatc	5820
aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctcaggatca aaggattcga	5880
tggtatctgc tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat	5940
gtgttcactg tacgaaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccagg	6000
gtttttgaga cagtggaaat gttaccatcc aaagctggaa tttggcgggt ggaatgcctt	6060

```

attggcgagc atctacatgc tgggatgagc acactttttc tgggtgtacag caataagtgt 6120
cagactcccc tgggaatggc ttctggacac attagagatt ttcagattac agcttcagga 6180
caatatggac agtgggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc 6240
tggagcacca aggagccctt ttcttgatc aaggtggatc tgttggcacc aatgattatt 6300
cacggcatca agaccaggc tggcgtcag aagttctcca gcctctacat ctctcagttt 6360
atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt atcgaggaaa ttccactgga 6420
acottaatgg tcttcttttg caatgtggat tcatctggga taaaacacaa tatttttaac 6480
cctccaatta ttgctcgata catccgtttg caccctaactc attatagcat tcgcagcact 6540
cttcgcatgg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaatggag 6600
agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcacct actttacca tatgtttgcc 6660
acctggcttc cttcaaaagc tcgacttcac ctccaaggga ggagtaatgc ctggagacct 6720
caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca 6780
ggagtaacta ctacgggagt aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttcctc 6840
atctccagca gtcaagatgg ccatcagtgg actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag 6900
gtttttcagg gaaatcaaga ctccctcaca cctgtgtgta actctctaga cccaccgtta 6960
ctgactcgct accttogaat tcaccccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg 7020
gaggttcttg gctgcgaggc acaggacctc tacgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 7080
ccagctccag aactcctggg cggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac 7140
accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 7200
gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 7260
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 7320
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 7380
gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 7440
accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 7500
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC 7560
aactacaaga ccacgcctcc cgtgttgagc tcgcagcgtc cttctctcct ctacagcaag 7620
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 7680
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 7734

```

<210> 705

<211> 2578

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de cadena de FVIII-Fc de longitud completa

10 <220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

<223> péptido señal de FVIII

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

5 <222> (20)..(759)

<223> Secuencia HC

<220>

<221> DOMINIO

10 <222> (760)..(1167)

<223> Secuencia de dominio B

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

15 <222> (2352)..(2578)

<223> Secuencia FC

<400> 705

```

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
 1                               5                               10                               15

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

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

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

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

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
                85                               90                               95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
    100                               105                               110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
    115                               120                               125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
    130                               135                               140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145                               150                               155                               160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser

```

					165					170						175
Tyr	Leu	Ser	His	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Ile	
			180					185					190			
Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Cys	Arg	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	
		195					200					205				
Gln	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Gly	
	210					215					220					
Lys	Ser	Trp	His	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser	Leu	Met	Gln	Asp	Arg	Asp	
225					230					235					240	
Ala	Ala	Ser	Ala	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys	Met	His	Thr	Val	Asn	Gly	Tyr	
				245					250					255		
Val	Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Cys	His	Arg	Lys	Ser	Val	
			260					265					270			
Tyr	Trp	His	Val	Ile	Gly	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	Val	His	Ser	Ile	
		275					280					285				
Phe	Leu	Glu	Gly	His	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Asn	His	Arg	Gln	Ala	Ser	
	290					295					300					
Leu	Glu	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu	Met	
305					310					315					320	
Asp	Leu	Gly	Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His	
				325					330					335		
Asp	Gly	Met	Glu	Ala	Tyr	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro	
			340					345					350			
Gln	Leu	Arg	Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp	
		355					360					365				
Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser	
	370					375					380					
Pro	Ser	Phe	Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	
385					390					395					400	
Trp	Val	His	Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	
				405					410					415		
Leu	Val	Leu	Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	
			420					425					430			

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685

ES 2 724 778 T3

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750
 Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro
 755 760 765
 Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp
 770 775 780
 Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
 785 790 795 800
 Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
 805 810 815
 Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
 820 825 830
 Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
 835 840 845
 Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
 850 855 860
 Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
 865 870 875 880
 Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
 885 890 895
 Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
 900 905 910
 Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
 915 920 925
 Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
 930 935 940

ES 2 724 778 T3

Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu
 945 950 955 960
 Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu
 965 970 975
 Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe
 980 985 990
 Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala
 995 1000 1005
 Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser
 1010 1015 1020
 Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser
 1025 1030 1035
 Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu
 1040 1045 1050
 Ser Asp Thr Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg
 1055 1060 1065
 Met Leu Met Asp Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met
 1070 1075 1080
 Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln
 1085 1090 1095
 Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met
 1100 1105 1110
 Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile
 1115 1120 1125
 Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro
 1130 1135 1140
 Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu
 1145 1150 1155
 Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys
 1160 1165 1170
 Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro
 1175 1180 1185
 Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu

ES 2 724 778 T3

1190	1195	1200
Asn Asn Thr His Asn Gln Glu	Lys Lys Ile Gln Glu	Glu Ile Glu
1205	1210	1215
Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln	Glu Asn Val Val Leu	Pro Gln Ile
1220	1225	1230
His Thr Val Thr Gly Thr Lys	Asn Phe Met Lys Asn	Leu Phe Leu
1235	1240	1245
Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val	Glu Gly Ser Tyr Asp	Gly Ala Tyr
1250	1255	1260
Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe	Arg Ser Leu Asn Asp	Ser Thr Asn
1265	1270	1275
Arg Thr Lys Lys His Thr Ala	His Phe Ser Lys Lys	Gly Glu Glu
1280	1285	1290
Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly	Asn Gln Thr Lys Gln	Ile Val Glu
1295	1300	1305
Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg	Ile Ser Pro Asn Thr	Ser Gln Gln
1310	1315	1320
Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser	Lys Arg Ala Leu Lys	Gln Phe Arg
1325	1330	1335
Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu	Leu Glu Lys Arg Ile	Ile Val Asp
1340	1345	1350
Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser	Lys Asn Met Lys His	Leu Thr Pro
1355	1360	1365
Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp	Tyr Asn Glu Lys Glu	Lys Gly Ala
1370	1375	1380
Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser	Asp Cys Leu Thr Arg	Ser His Ser
1385	1390	1395
Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser	Pro Leu Pro Ile Ala	Lys Val Ser
1400	1405	1410
Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro	Ile Tyr Leu Thr Arg	Val Leu Phe
1415	1420	1425
Gln Asp Asn Ser Ser His Leu	Pro Ala Ala Ser Tyr	Arg Lys Lys
1430	1435	1440

ES 2 724 778 T3

Asp Ser 1445	Gly Val Gln Glu Ser 1450	Ser His Phe Leu Gln 1455	Gly Ala Lys
Lys Asn 1460	Asn Leu Ser Leu Ala 1465	Ile Leu Thr Leu Glu 1470	Met Thr Gly
Asp Gln 1475	Arg Glu Val Gly Ser 1480	Leu Gly Thr Ser Ala 1485	Thr Asn Ser
Val Thr 1490	Tyr Lys Lys Val Glu 1495	Asn Thr Val Leu Pro 1500	Lys Pro Asp
Leu Pro 1505	Lys Thr Ser Gly Lys 1510	Val Glu Leu Leu Pro 1515	Lys Val His
Ile Tyr 1520	Gln Lys Asp Leu Phe 1525	Pro Thr Glu Thr Ser 1530	Asn Gly Ser
Pro Gly 1535	His Leu Asp Leu Val 1540	Glu Gly Ser Leu Leu 1545	Gln Gly Thr
Glu Gly 1550	Ala Ile Lys Trp Asn 1555	Glu Ala Asn Arg Pro 1560	Gly Lys Val
Pro Phe 1565	Leu Arg Val Ala Thr 1570	Glu Ser Ser Ala Lys 1575	Thr Pro Ser
Lys Leu 1580	Leu Asp Pro Leu Ala 1585	Trp Asp Asn His Tyr 1590	Gly Thr Gln
Ile Pro 1595	Lys Glu Glu Trp Lys 1600	Ser Gln Glu Lys Ser 1605	Pro Glu Lys
Thr Ala 1610	Phe Lys Lys Lys Asp 1615	Thr Ile Leu Ser Leu 1620	Asn Ala Cys
Glu Ser 1625	Asn His Ala Ile Ala 1630	Ala Ile Asn Glu Gly 1635	Gln Asn Lys
Pro Glu 1640	Ile Glu Val Thr Trp 1645	Ala Lys Gln Gly Arg 1650	Thr Glu Arg
Leu Cys 1655	Ser Gln Asn Pro Pro 1660	Val Leu Lys Arg His 1665	Gln Arg Glu
Ile Thr 1670	Arg Thr Thr Leu Gln 1675	Ser Asp Gln Glu Glu 1680	Ile Asp Tyr

ES 2 724 778 T3

Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile
1685						1690					1695			
Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys
1700						1705					1710			
Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr
1715						1720					1725			
Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser
1730						1735					1740			
Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr
1745						1750					1755			
Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu
1760						1765					1770			
His	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp
1775						1780					1785			
Asn	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser
1790						1795					1800			
Phe	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly
1805						1810					1815			
Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr
1820						1825					1830			
Tyr	Phe	Trp	Lys	Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu
1835						1840					1845			
Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu
1850						1855					1860			
Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His
1865						1870					1875			
Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln
1880						1885					1890			
Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp
1895						1900					1905			
Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn
1910						1915					1920			

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

2165	2170	2175
Ser Thr Leu Arg Met Glu 2180	Leu Met Gly Cys Asp 2185	Leu Asn Ser Cys 2190
Ser Met Pro Leu Gly Met 2195	Glu Ser Lys Ala Ile 2200	Ser Asp Ala Gln 2205
Ile Thr Ala Ser Ser Tyr 2210	Phe Thr Asn Met Phe 2215	Ala Thr Trp Ser 2220
Pro Ser Lys Ala Arg Leu 2225	His Leu Gln Gly Arg 2230	Ser Asn Ala Trp 2235
Arg Pro Gln Val Asn Asn 2240	Pro Lys Glu Trp Leu 2245	Gln Val Asp Phe 2250
Gln Lys Thr Met Lys Val 2255	Thr Gly Val Thr Thr 2260	Gln Gly Val Lys 2265
Ser Leu Leu Thr Ser Met 2270	Tyr Val Lys Glu Phe 2275	Leu Ile Ser Ser 2280
Ser Gln Asp Gly His Gln 2285	Trp Thr Leu Phe Phe 2290	Gln Asn Gly Lys 2295
Val Lys Val Phe Gln Gly 2300	Asn Gln Asp Ser Phe 2305	Thr Pro Val Val 2310
Asn Ser Leu Asp Pro Pro 2315	Leu Leu Thr Arg Tyr 2320	Leu Arg Ile His 2325
Pro Gln Ser Trp Val His 2330	Gln Ile Ala Leu Arg 2335	Met Glu Val Leu 2340
Gly Cys Glu Ala Gln Asp 2345	Leu Tyr Asp Lys Thr 2350	His Thr Cys Pro 2355
Pro Cys Pro Ala Pro Glu 2360	Leu Leu Gly Gly Pro 2365	Ser Val Phe Leu 2370
Phe Pro Pro Lys Pro Lys 2375	Asp Thr Leu Met Ile 2380	Ser Arg Thr Pro 2385
Glu Val Thr Cys Val Val 2390	Val Asp Val Ser His 2395	Glu Asp Pro Glu 2400
Val Lys Phe Asn Trp Tyr 2405	Val Asp Gly Val Glu 2410	Val His Asn Ala 2415

Lys Thr 2420	Lys Pro Arg Glu Glu 2425	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val 2430
Val Ser 2435	Val Leu Thr Val Leu 2440	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 2445
Glu Tyr 2450	Lys Cys Lys Val Ser 2455	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile 2460
Glu Lys 2465	Thr Ile Ser Lys Ala 2470	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 2475
Val Tyr 2480	Thr Leu Pro Pro Ser 2485	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln 2490
Val Ser 2495	Leu Thr Cys Leu Val 2500	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 2505
Ala Val 2510	Glu Trp Glu Ser Asn 2515	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 2520
Thr Thr 2525	Pro Pro Val Leu Asp 2530	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr 2535
Ser Lys 2540	Leu Thr Val Asp Lys 2545	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val 2550
Phe Ser 2555	Cys Ser Val Met His 2560	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 2565
Gln Lys 2570	Ser Leu Ser Leu Ser 2575	Pro Gly Lys

<210> 706
 <211> 2958
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de cadena pesada (HC) de FVIII-Fc (sin enlazador entre HC y Fc)

10 <220>
 <221> péptido_ señal
 <222> (1)..(57)

<220>
 15 <221> característica_diversa
 <222> (2278)..(2958)
 <223> Región Fc

<400> 706

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat	300
gatacagtggt tcattacact taagaacatg gcttcccata ctgtcagtct tcatgctggt	360
ggtgtatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg	420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggctctg	480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat	540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa	600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta	660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atgggttatgt aaacaggctct	780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgtgat tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct	900
cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gaccttggaac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa	1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
gaagcgggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat	1140
gatgacaact ctccttcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact	1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320
aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatc acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct	1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg	1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaagggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
actaaatcag atcctcggtg cctgacccgc tattactcta gtttcgtaa tatggagaga	1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa	1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag	1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg	1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt	1920

```

tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980
attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac 2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagagac 2280
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagct ccagaactcc tgggcggacc gtcagtcttc 2340
ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 2400
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtg cgtggacggc 2460
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 2520
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 2580
aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 2640
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 2700
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatcca gcgacatcg cgtggagtgg 2760
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgtt ggactccgac 2820
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 2880
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 2940
tccctgtctc cgggtaaa 2958

```

<210> 707

<211> 986

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

10 <220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

<223> péptido señal de FVIII

15 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

<222> (760)..(986)

<223> Secuencia Fc

20 <400> 707

```

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1           5           10           15

```

ES 2 724 778 T3

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
 20 25 30
 Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
 35 40 45
 Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
 50 55 60
 Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
 65 70 75 80
 Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
 85 90 95
 Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
 100 105 110
 His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
 115 120 125
 Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
 130 135 140
 Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
 145 150 155 160
 Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
 180 185 190
 Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
 195 200 205
 Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
 210 215 220
 Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 225 230 235 240
 Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255
 Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270
 Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile

275		280		285
Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser				
290		295		300
Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met				
305		310		315
Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His				
		325		330
Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro				
		340		345
Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp				
		355		360
Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser				
		370		375
Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr				
		385		390
Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro				
		405		410
Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn				
		420		425
Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met				
		435		440
Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu				
		450		455
Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu				
		465		470
Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro				
		485		490
His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys				
		500		505
Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe				
		515		520
Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp				
		530		535
				540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750
 Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 755 760 765
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 770 775 780
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 785 790 795 800

```

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      805                      810                      815

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      820                      825                      830

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      835                      840                      845

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      850                      855                      860

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

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 708

<211> 2973

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

10 <220>

<221> péptido_señal

<222> (1)..(58)

<220>

15 <221> característica_diversa

<222> (2278)..(2292)

<223> enlazador de 5 aminoácidos

<220>

<221> característica_diversa

<222> (2293)..(2973)

<223> Región Fc

5 <400> 708

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat	300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccata ctgtcagtct tcatgctggt	360
ggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgacagac cagtcaaagg	420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggctctg	480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat	540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa	600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttctgta	660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggctc	780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcagtgat tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct	900
cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gaccttgac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa	1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggg caggtttgat	1140
gatgacaact ctcttcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact	1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320
aagtacaaaa aagtcggatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct	1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg	1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta caaaagggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
actaaatcag atcctcggtg cctgacccgc tattactcta gtttcgttaa tatggagaga	1680

```

gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa      1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag      1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg      1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt      1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc      1980
attggagcac agactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa      2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg      2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc      2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac      2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc      2280
ttctcccaga atgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagctccaga actcctgggc      2340
ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc      2400
cctgagggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac      2460
tgggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac      2520
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc      2580
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc      2640
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccggtat      2700
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac      2760
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc      2820
gtgttggaact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg      2880
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac      2940
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa                                  2973

```

<210> 709

<211> 991

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de cadena pesada (HC)de FVIII-Fc (enlazador de 5 aminoácidos entre HC y Fc)

10 <220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

<223> péptido señal de FVIII

15 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

<222> (760)..(764)

<223> secuencia de enlazador de aminoácidos

20 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

<222> (765)..(991)

<223> Región Fc

<400> 709

ES 2 724 778 T3

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

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495

ES 2 724 778 T3

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750

ES 2 724 778 T3

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Asp Lys Thr His
 755 760 765
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 770 775 780
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 785 790 795 800
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 805 810 815
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 820 825 830
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 835 840 845
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 850 855 860
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 865 870 875 880
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 885 890 895
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 900 905 910
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 915 920 925
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 930 935 940
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 945 950 955 960
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 965 970 975
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 980 985 990

<210> 710

<211> 2793

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<220>

5 <221> péptido_señal

<222> (1)..(60)

<220>

<221> característica_diversa

10 <222> (2113)..(2793)

<223> Región Fc

<400> 710

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt	60
gaaataactc gtactactct tcagtcagat caagaggaaa ttgactatga tgataccata	120
tcagttgaaa tgaagaagga agattttgac atttatgatg aggatgaaaa tcagagcccc	180
cgcagctttc aaaagaaaac acgacactat tttattgctg cagtggagag gctctgggat	240
tatgggatga gtagctcccc acatgttcta agaaacaggg ctcaagatgg cagtgtccct	300
cagttcaaga aagttgtttt ccaggaatth actgatggct cctttactca gcccttatac	360
cgtggagaac taaatgaaca tttgggactc ctggggccat atataagagc agaagttgaa	420
gataatatca tggttaacttt cagaaatcag gcctctcgtc cctattcctt ctattctagc	480
cttatttctt atgaggaaga tcagaggcaa ggagcagaac ctagaaaaaa ctttgtcaag	540
cctaataaaa ccaaaactta cttttggaaa gtgcaacatc atatggcacc cactaaagat	600
gagtttgact gcaaagcctg ggcttatttc tctgatgttg acctggaaaa agatgtgcac	660
tcaggcctga ttggaccctt tctggtctgc cacactaaca cactgaacct tgctcatggg	720
agacaagtga cagtacagga atttgctctg tttttacca tctttgatga gaccaaagc	780
tggtacttca ctgaaaatat ggaaagaaac tgcagggtc cctgcaatat ccagatggaa	840
gatccactt ttaaagagaa ttatcgcttc catgcaatca atggctacat aatggataca	900
ctacctggct tagtaatggc tcaggatcaa aggattcgat ggtatctgct cagcatgggc	960
agcaatgaaa acatccattc tattcatttc agtggacatg tgttcactgt acgaaaaaaa	1020
gaggagtata aaatggcact gtacaatctc tatccagggtg tttttgagac agtggaaatg	1080
ttaccatcca aagctggaat ttggcgggtg gaatgcctta ttggcgagca tctacatgct	1140
gggatgagca cactttttct ggtgtacagc aataagtgtc agactcccct gggaaatggct	1200
tctggacaca ttagagattt tcagattaca gcttcaggac aatatggaca gtgggcccc	1260
aagctggcca gacttcatta ttccggatca atcaatgcct ggagcaccaa ggagcccttt	1320
tcttgatca aggtggatct gttggacca atgattattc acggcatcaa gaccagggt	1380
gcccgtcaga agttctccag cctctacatc tctcagttta tcatcatgta tagtcttgat	1440
gggaagaagt ggcagactta tcgaggaaat tccactggaa ccttaatggt cttctttggc	1500
aatgtggatt catctgggat aaaacacaat atttttaacc ctccaattat tgctcgatac	1560

```

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

```

<210> 711

<211> 931

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de cadena ligera (LC) de FVIII-Fc

10 <220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(20)

<223> señal de Igk de ratón

15 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

<222> (705)..(931)

<223> Región Fc

20 <400> 711

ES 2 724 778 T3

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

Gly Ser Thr Gly Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu
20 25 30

Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp
35 40 45

Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln
50 55 60

Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp
65 70 75 80

Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser
85 90 95

Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp
100 105 110

Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu
115 120 125

Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met
130 135 140

Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
145 150 155 160

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys
165 170 175

Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln
180 185 190

His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala
195 200 205

Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile
210 215 220

Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly
225 230 235 240

Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp
245 250 255

Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg

260	265	270
Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr		
275	280	285
Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu		
290	295	300
Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly		
305	310	315
Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr		
	325	330
		335
Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro		
	340	345
		350
Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp		
	355	360
		365
Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr		
	370	375
		380
Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala		
385	390	395
		400
Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly		
	405	410
		415
Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn		
	420	425
		430
Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu		
	435	440
		445
Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys		
	450	455
		460
Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp		
465	470	475
		480
Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met		
	485	490
		495
Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe		
	500	505
		510
Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr		
	515	520
		525

ES 2 724 778 T3

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

```

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
785                               790                               795                               800

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
                               805                               810                               815

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
                               820                               825                               830

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
                               835                               840                               845

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
                               850                               855                               860

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
865                               870                               875                               880

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
                               885                               890                               895

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
                               900                               905                               910

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
                               915                               920                               925

Pro Gly Lys
                               930

```

<210> 712

<211> 7583

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de cadena FIX-Fc

10 <220>

<221> péptido_ señal

<222> (690)..(777)

<223> péptido señal de FIX

15 <220>

<221> característica_diversa

<222> (1077)..(2371)

<223> Secuencia FIX

20 <220>

<221> característica_diversa

<222> (2372)..(3052)

<223> Región Fc

25 <400> 712

gcgcgcgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag 60
 ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaattggc ccgcctggct 120
 gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc 180
 caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccaacttg 240
 cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgtcccttat tgacgtcaat gacggtaaatt 300
 ggcccgctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca 360
 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtac atcaatgggc 420
 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga 480
 gtttgttttg gcacccaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat 540
 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtcta tataagcaga gctctctggc 600
 taactagaga acccactgct tactggctta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga 660
 cccaagcttc gcgacgtacg gccgccacca tgcagcgcgt gaacatgatc atggcagaat 720
 caccaggcct catcaccatc tgccttttag gatattctact cagtgtctgaa tgtacagggt 780
 tgtttccttt tttaaaatac attgagtatg cttgcctttt agatatagaa atatctgatg 840
 ctgtcttctt cactaaattt tgattacatg atttgacagc aatattgaag agtctaacag 900
 ccagcacgca ggttggttaag tactgtggga acatcacaga ttttggtctc atgccctaaa 960
 gagaaattgg ctttcagatt atttggatta aaaacaaaga ctttcttaag agatgtaaaa 1020
 ttttcatgat gttttctttt ttgctaaaac taaagaatta ttcttttaca tttcagtttt 1080
 tcttgatcat gaaaaacgca acaaaattct gaatcggcca aagaggata attcaggtaa 1140
 attggaagag tttgttcaag ggaatctaga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt 1200
 tgaagaagca cgagaagttt ttgaaaacac tgaaagaaca actgaatttt ggaagcagta 1260
 tgttgatgga gatcagtgtg agtccaatcc atgtttaaat ggcggcagtt gcaaggatga 1320
 cattaattcc tatgaatgtt ggtgtccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga 1380
 tgtaacatgt aacattaaga atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa 1440
 caagggtggt tgctcctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga 1500
 accagcagtg ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agctcaccg 1560
 tgctgagact gtttttcctg atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccatttt 1620
 ggataacatc actcaaagca cccaatcatt taatgacttc actcgggttg ttggtggaga 1680
 agatgccaaa ccaggtcaat tcccttgga ggttgttttg aatggttaaag ttgatgcatt 1740
 ctgtggaggc tctatcgta atgaaaaatg gattgtaact gctgccact gtgttgaaac 1800
 tgggtgttaa attacagttg tcgcaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga 1860
 gcaaaagcga aatgtgatcc gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa 1920

gtacaacccat gacattgccc ttctggaact ggacgaacccc ttagtgctaa acagctacgt 1980
 tacacctatt tgcattgctg acaaggaata cacgaacatc ttctctaaat ttggatctgg 2040
 ctatgtaagt ggctggggaa gagtcttcca caaagggaga tcagctttag ttcttcagta 2100
 ccttagagtt ccacttggtg accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta 2160
 taacaacatg ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag 2220
 tgggggaccc catgttactg aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg 2280
 ggggtgaagag tgtgcaatga aagcaataa tggaatatat accaaggtgt cccggtatgt 2340
 caactggatt aaggaaaaaa caaagctcac tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc 2400
 agctccggaa ctctgggag gaccgtcagt ctctctctc ccccaaaaac ccaaggacac 2460
 cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga 2520
 ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa 2580
 gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca 2640
 ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc 2700
 ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac 2760
 cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa 2820
 aggtctctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa 2880
 ctacaagacc acgcctcccg tgttggaact cgacggctcc ttcttctct acagcaagct 2940
 caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga 3000
 ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgagaatt 3060
 cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 3120
 aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 3180
 ataaacaagt tgggggtggc gaagaactcc agcatgagat ccccgcgctg gaggatcatc 3240
 cagccggcgt cccggaaaaa gattccgaag cccaacctt catagaaggc ggcggtggaa 3300
 tcgaaatctc gtagcacgtg tcagtcctgc tctcggcca cgaagtgcac gcagttgccg 3360
 gccgggtcgc gcagggcgaa ctcccgcctc cagggtgct cgccgatctc ggtcatggcc 3420
 gggccggagg cgtcccggaa gttcgtggac acgacctccg accactcggc gtacagctcg 3480
 tccaggccgc gcacccacac ccaggccagg gtgttgctcg gcacccactg gtcttgacc 3540
 gcgctgatga acagggtcac gtcgtcccgg accacaccgg cgaagtcgtc ctccacgaag 3600
 tcccgggaga acccgagccg gtcggtccag aactcgaccg ctccggcgac gtcgcgcgcg 3660
 gtgagcaccg gaacggcact ggtcaacttg gccatggttt agttcctcac cttgtcgtat 3720
 tatactatgc cgatatacta tgccgatgat taattgtcaa cacgtgctga tcagatccga 3780
 aaatggatat acaagctccc gggagctttt tgcaaaagcc taggcctcca aaaaagcctc 3840
 ctactactt ctggaatagc tcagaggcag aggcggcctc ggcctctgca taaataaaaa 3900

aaattagtcg gccatggggc ggagaatggg cggaactggg cggagttagg ggcgggatgg 3960
 gcggagttag gggcgggact atggttgctg actaattgag atgcatgctt tgcatacttc 4020
 tgcctgctgg ggagcctggg gactttccac acctgggtgc tgactaattg agatgcatgc 4080
 tttgcatact tctgcctgct ggggagcctg gggactttcc acaccctcgt cgagctagct 4140
 tcgtgaggct ccggtgcccg tcagtgggca gagcgacat cggccacagt ccccgagaag 4200
 ttggggggag gggtcggcaa ttgaaccggg gcctagagaa ggtggcgcgg ggtaaaactgg 4260
 gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccgagg gtgggggaga accgtatata 4320
 agtgacagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaacgggt ttgccgccag aacacaggta 4380
 agtgccgtgt gtggttcccg cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc ttgcgtgcct 4440
 tgaattactt ccacctggct ccagtacgtg attcttgatc ccgagctgga gccaggggag 4500
 ggccttgccg tttaggagcc ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg cctgggagct 4560
 ggggccgccg cgtgcgaatc tgggtggcacc ttccgcctg tctcgctgct ttcgataagt 4620
 ctctagccat ttaaaatfff tgatgacctg ctgcgacgct ttttttctgg caagatagtc 4680
 ttgtaaatgc gggccaggat ctgcacactg gtatttcggg ttttggggcc gcgggcggcg 4740
 acggggcccg tgcgtcccag cgcacatggt cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac 4800
 cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct ggcctcgccg 4860
 cgccgtgtat cggcccgccc tgggcggcaa ggctggcccg gtcggcacca gttgcgtgag 4920
 cggaagatg gccgcttccc ggccctgctc caggggggctc aaaatggagg acgcggcgct 4980
 cgggagagcg ggcgggtgag tcacccacac aaaggaaagg ggcctttccg tctcagccg 5040
 tcgcttcagtg tgactccacg gagtaccggg cgccgtccag gcacctcgat tagttctgga 5100
 gcttttgagg tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg gagtttcccc 5160
 aactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttgga cttgatgtaa ttctccttgg 5220
 aatttgccct ttttgagttt ggatcttggg tcattctcaa gcctcagaca gtggttcaaa 5280
 gtttttttct tccatttcag gtgtcgtgaa cacgtggtcg cggccgcgcc gccaccatgg 5340
 agacagacac actcctgcta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc actggtgaca 5400
 aaactcacac atgccaccg tgccagcac ctgaactcct gggaggaccg tcagtcttcc 5460
 tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgag 5520
 tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg 5580
 tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg 5640
 tggtcagcgt cctcaccgct ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca 5700
 aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc 5760
 agccccgaga accacagggtg tacaccctgc ccccatcccg cgatgagctg accaagaacc 5820

aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg	5880
agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgttg gactccgacg	5940
gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg	6000
tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct	6060
ccctgtctcc gggtaaata ga ctcgagagat ctggccggct gggcccgttt cgaaggtaag	6120
cctatcccta accctctcct cggctctgat tctacgcgta ccggtcatca tcaccatcac	6180
cattgagttt aaacccgctg atcagcctcg actgtgcctt ctagttagca gccatctgtt	6240
gtttgcccct ccccgctgcc ttccttgacc ctggaagggt ccaactccac tgtcctttcc	6300
taataaaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt	6360
ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat	6420
gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa agaaccagt gcggtataac gggtatccac	6480
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	6540
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca	6600
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	6660
gtttccccct agaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata	6720
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta	6780
tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca	6840
gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga	6900
cttatcgcca ctggcagcag ccaactgtaa caggattagc agagcgagggt atgtagcggt	6960
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg	7020
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	7080
caaacaaacc accgctggta gcggtggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag	7140
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg ggtctgacg ctcagtggaa	7200
cgaaaactca cgtaaggga ttttggcat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac	7260
gaggccctt cgtctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct	7320
cccgagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg	7380
cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat	7440
tgtagtgaga gtgcaccata tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa	7500
taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcgggtg	7560
cgggcctctt cgctattacg cca	7583

<210> 713

<211> 688
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> polipéptido de cadena FIX-Fc

<220>
 <221> SEÑAL

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

<400> 713

```

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

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

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

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

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

Thr  Glu  Arg  Thr  Thr  Glu  Phe  Trp  Lys  Gln  Tyr  Val  Asp  Gly  Asp  Gln
          85              90              95

Cys  Glu  Ser  Asn  Pro  Cys  Leu  Asn  Gly  Gly  Ser  Cys  Lys  Asp  Asp  Ile
          100             105             110

Asn  Ser  Tyr  Glu  Cys  Trp  Cys  Pro  Phe  Gly  Phe  Glu  Gly  Lys  Asn  Cys
          115             120             125

Glu  Leu  Asp  Val  Thr  Cys  Asn  Ile  Lys  Asn  Gly  Arg  Cys  Glu  Gln  Phe
          130             135             140

Cys  Lys  Asn  Ser  Ala  Asp  Asn  Lys  Val  Val  Cys  Ser  Cys  Thr  Glu  Gly
145             150             155             160

Tyr  Arg  Leu  Ala  Glu  Asn  Gln  Lys  Ser  Cys  Glu  Pro  Ala  Val  Pro  Phe
          165             170             175

Pro  Cys  Gly  Arg  Val  Ser  Val  Ser  Gln  Thr  Ser  Lys  Leu  Thr  Arg  Ala
          180             185             190
    
```

ES 2 724 778 T3

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
 195 200 205
 Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
 210 215 220
 Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
 225 230 235 240
 Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
 245 250 255
 Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
 260 265 270
 Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
 275 280 285
 His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
 305 310 315 320
 Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
 325 330 335
 Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
 340 345 350
 Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
 355 360 365
 Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
 370 375 380
 Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
 385 390 395 400
 Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
 405 410 415
 Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
 420 425 430
 Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
 435 440 445
 Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Asp Lys Thr

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

<210> 714

<211> 2082

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<220>

<221> péptido_senial

5 <222> (1)..(180)

<223> senial de FVII

<220>

<221> característica_diversa

10 <222> (1402)..(2082)

<223> Región Fc

<400> 714

atggtctccc aggcctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct	60
gcaggcgggg tcgctaaggc ctcaggagga gaaacacggg acatgccgtg gaagccgggg	120
cctcacagag tcttcgtaac ccaggaggaa gccacggcg tctgcaccg gcgccggcgc	180
gccaacgcgt tcctggagga gctgcccgg ggctccctgg agagggagtg caaggaggag	240
cagtgcctct tcgaggaggc ccgggagatc ttcaaggacg cggagaggac gaagctgttc	300
tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc	360
tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga ggcccggaac	420
tgtgagacgc acaaggatga ccagctgacg tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag	480
tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg	540
ctggcagacg ggggtgcctg cacaccaca gttgaatgc catgtggaaa aatacctatt	600
ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc	660
aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg	720
accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac	780
tggaggaacc tgatcgcggt gctgggcgag cagcacctca gcgagcacga cggggatgag	840
cagagccggc ggggtggcga ggtcatcgc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac	900
cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tctactacca tgtggtgccc	960
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg	1020
gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc	1080
aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc	1140
ccaaatatca cgagtagcat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc	1200
aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc	1260
atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttggggtgta caccagggtc	1320
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc	1380
ctgcgagccc catttcccta ggacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agctccagaa	1440
ctcctgggcg gaccgtcagt cttcctcttc ccccaaaac ccaaggacac cctcatgac	1500
tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtgggt gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc	1560

```

aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag      1620
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg      1680
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag      1740
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca      1800
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctat      1860
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc      1920
acgcctcccg tgttggaactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac      1980
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac      2040
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa                        2082

```

<210> 715

<211> 693

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de FVII-Fc de longitud completa

10 <220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(60)

<220>

15 <221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

<222> (467)..(693)

<223> Secuencia Fc

<400> 715

```

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

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

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

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

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

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

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

```

20

ES 2 724 778 T3

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

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

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

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

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

Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
195 200 205

Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
210 215 220

Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225 230 235 240

Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
245 250 255

Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
260 265 270

Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
275 280 285

Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
290 295 300

Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305 310 315 320

Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
325 330 335

Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
340 345 350

Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
355 360 365

ES 2 724 778 T3

Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
 370 375 380
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
 385 390 395 400
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
 405 410 415
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
 420 425 430
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
 435 440 445
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
 450 455 460
 Phe Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 465 470 475 480
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 485 490 495
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 500 505 510
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 515 520 525
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 530 535 540
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 545 550 555 560
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 565 570 575
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 580 585 590
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 595 600 605
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 610 615 620

ES 2 724 778 T3

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
625 630 635 640

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
660 665 670

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
675 680 685

Leu Ser Pro Gly Lys
690

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula (I):



donde

10 L es L-leucina;
A es L-alanina;
S es L-serina;
Y es L-tirosina;
C¹ y C² son cisteína;

15 donde la secuencia de aminoácidos comprende al menos una de:

SEQ ID NO: 4, 9-22, 24-38, 43-54, 61-64, 66-91, 93-97, 99, 104-146, 148-183, 200-202, 204-208, 214-216, 219-222, 226-233, 239-242, 244-246, 260, 265-267, 269-272, 282-293, 296, 307, 315, 337, 339, 346-348, 360, 362, 364, 367-
20 375, 380, 383-386, 389, 392, 400-402, 406, 409-415, 419-421, 424-463, 471-487, 492-495, 526-529, 531, 533, 536-537, 543, 545, 547, 550-555 y PRI RTVGPGSR SASGKLTCLASYCWLFWTGIA; o

(b) una retrovariante, una variante inversa o una variante retro-inversa de la secuencia de aminoácidos de (a); o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

25 2. El compuesto de la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos comprende al menos una de:
SEQ ID NO: 29, 48-54, 61-64, 66-86, 91, 93-97, 104-146, 148-183, 200-202, 204, 205, 214-216, 219-222, 226-233, 239-242, 244, 270-272, 282-293, 296, 307, 346, 360, 367, 369-370, 374-375, 383, 385, 389, 400-402, 406, 409-414, 419, 420, 424-440, 450-460, 462, 471-487, 492, 494, 526-529, 531, 533, 536-537, 543, 545, 547, 550-555 y
30 PRI RTVGPGSR SASGKLTCLASYCWLFWTGIA.

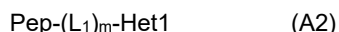
3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el compuesto está unido covalentemente a un resto que prolonga la semivida, opcionalmente donde el resto que prolonga la semivida se selecciona de entre Fc, ligando de unión a FcRn, albúmina, ligando de unión a albúmina, transferrina, un resto PEG, un resto PPG, un
35 resto PAS y un resto HES.

4. Un procedimiento *in vitro* para aumentar la actividad catalítica (k_{cat}) de un factor de coagulación sanguínea, que comprende poner en contacto el factor de coagulación sanguínea con el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Un procedimiento para preparar el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo el procedimiento formar un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos, o una retrovariante, variante inversa o variante retro-inversa de la misma, usando síntesis peptídica en fase sólida.

45 6. Un conjugado que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un primer resto heterólogo, donde el compuesto y el primer resto heterólogo están unidos entre sí a través de un primer enlazador opcional.

7. El conjugado de la reivindicación 6, que comprende una estructura de acuerdo con la Fórmula (A1) o
50 (A2):



donde

Het1 es el primer resto heterólogo;

m es un número entero seleccionado de entre 0 y 1;

60 L₁ está ausente (m=0) o presente (m=1), y cuando está presente es un enlazador;

Pep es un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y (-) es un enlace covalente.

8. Una molécula de ácido nucleico o un conjunto de moléculas de ácido nucleico que codifican el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el conjugado de la reivindicación 6 o 7 o un complemento del mismo.
9. Un vector o un conjunto de vectores que comprenden la molécula de ácido nucleico o el conjunto de las moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 8 o un complemento de la misma.
10. Una célula huésped que comprende el vector o el conjunto de vectores de la reivindicación 9.
11. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el conjugado de la reivindicación 6 o 7, la molécula de ácido nucleico o el conjunto de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, o el vector o el conjunto de vectores de la reivindicación 9 y un portador farmacéuticamente aceptable.
12. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el conjugado de la reivindicación 6 o 7, la molécula de ácido nucleico o el conjunto de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, el vector o el conjunto de vectores de la reivindicación 9, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, para uso en el tratamiento, la mejora o la prevención de una enfermedad o trastorno hemorrágico en un sujeto que lo necesita.
13. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el conjugado de la reivindicación 6 o 7, la molécula de ácido nucleico o el conjunto de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, el vector o el conjunto de vectores de la reivindicación 9, o la composición farmacéutica de la reivindicación 11, para uso en el tratamiento, la mejora o la prevención de la deficiencia del factor de coagulación en un sujeto mamífero, donde el factor de coagulación se selecciona de entre el grupo que consiste en FVII, FVIIa, FVIII, FIX y FXI.

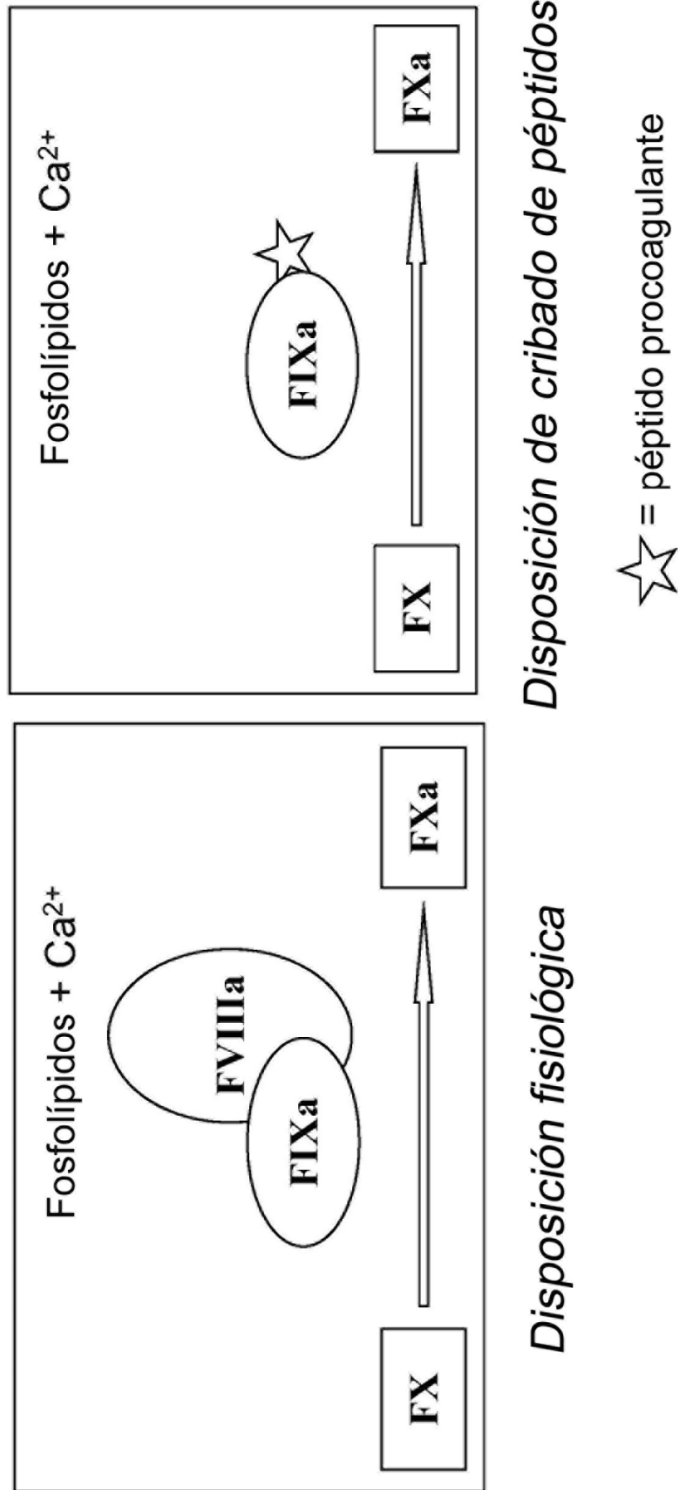


FIG. 1

TGA usando TF 0,1 pM como desencadenante

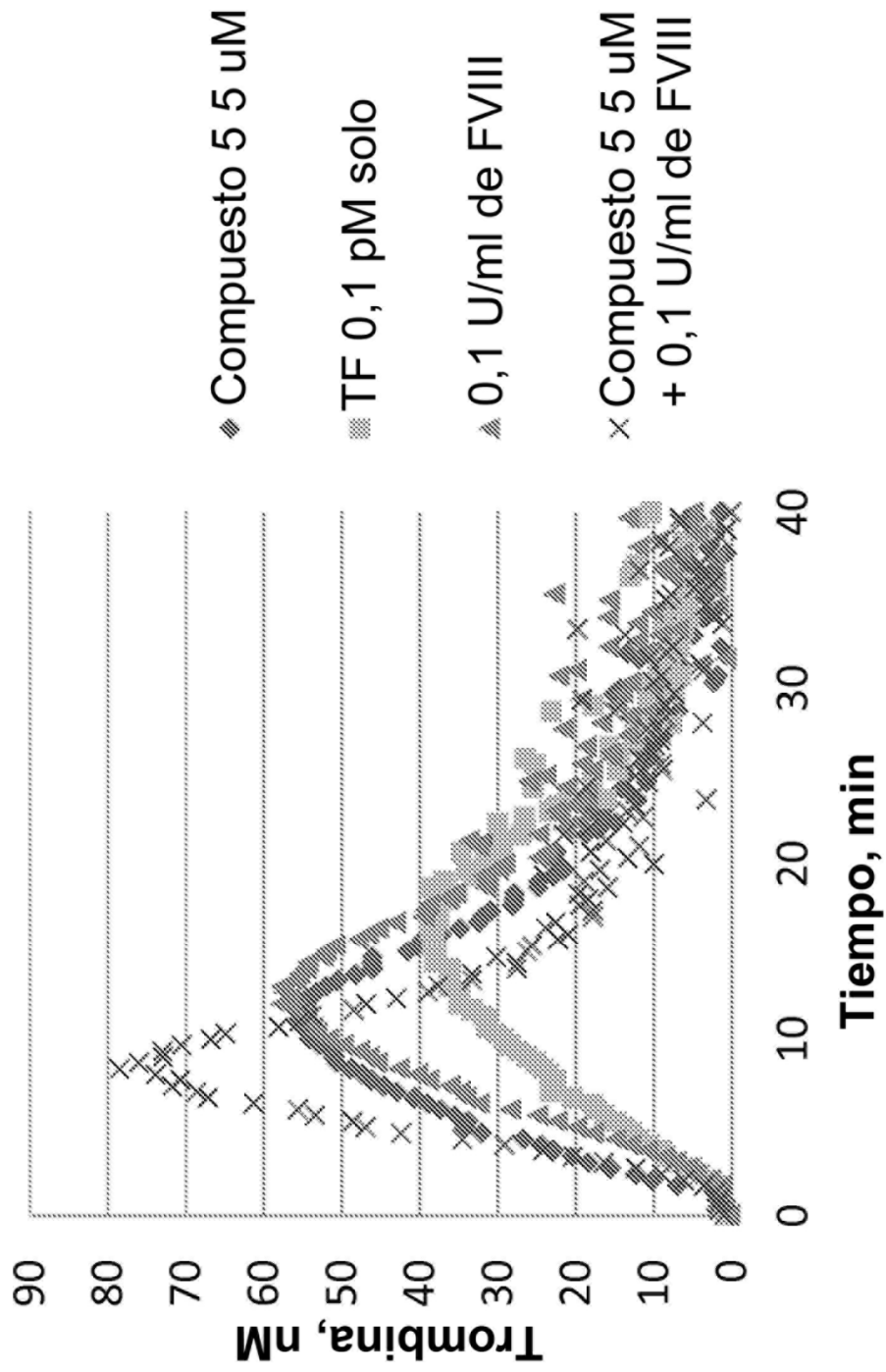
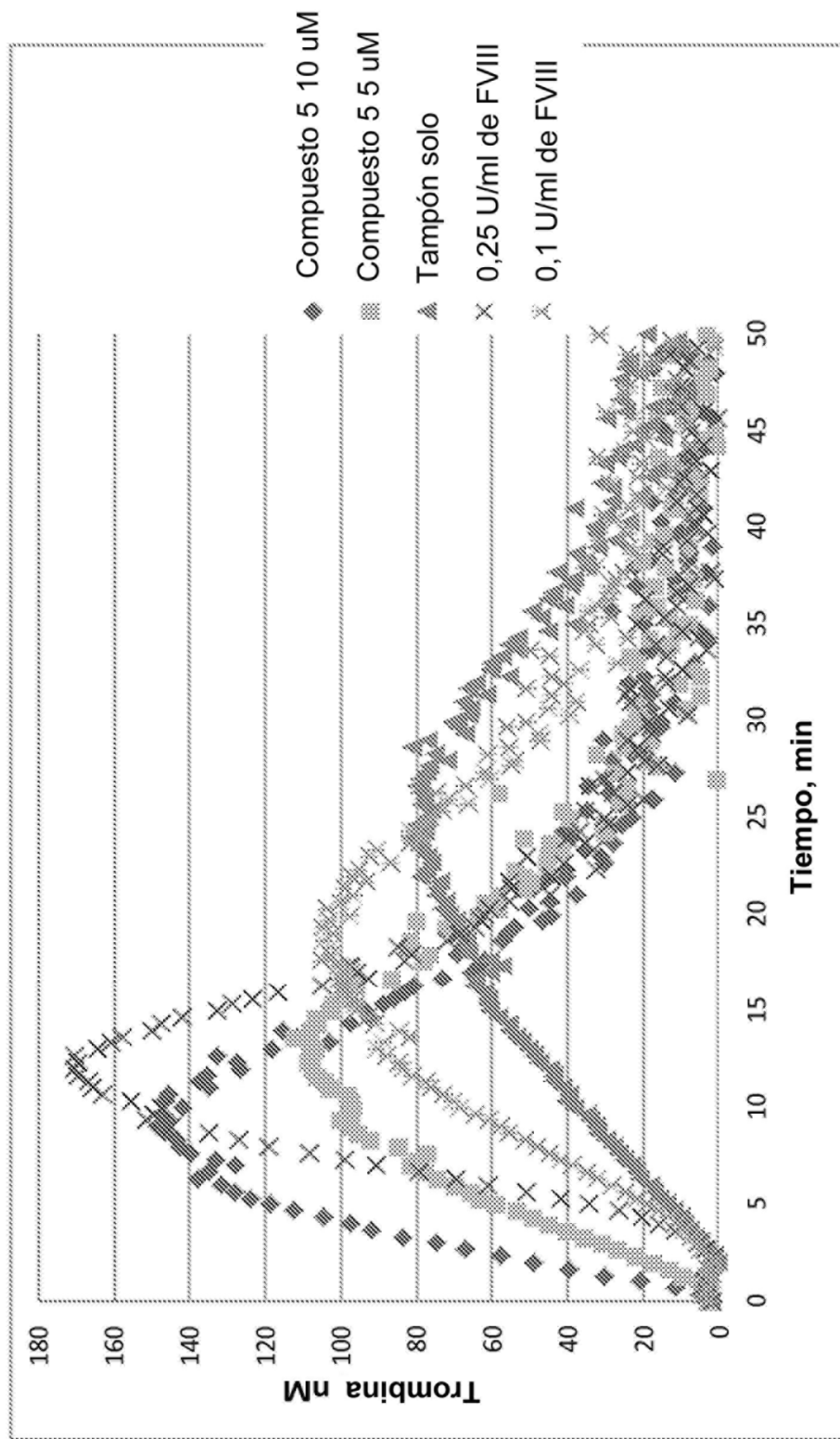


FIG. 2

**FIG. 3**

Nivel de deuterio, HC 177-185

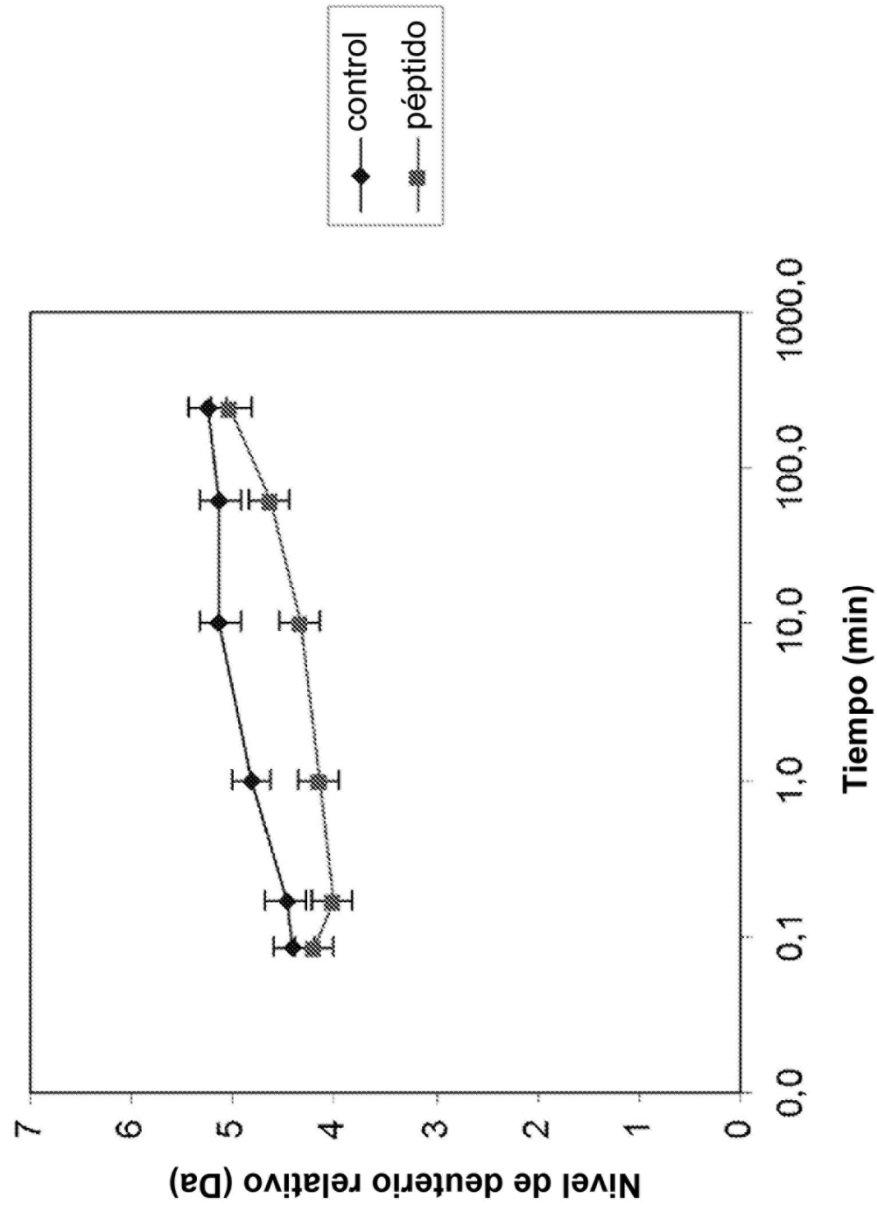
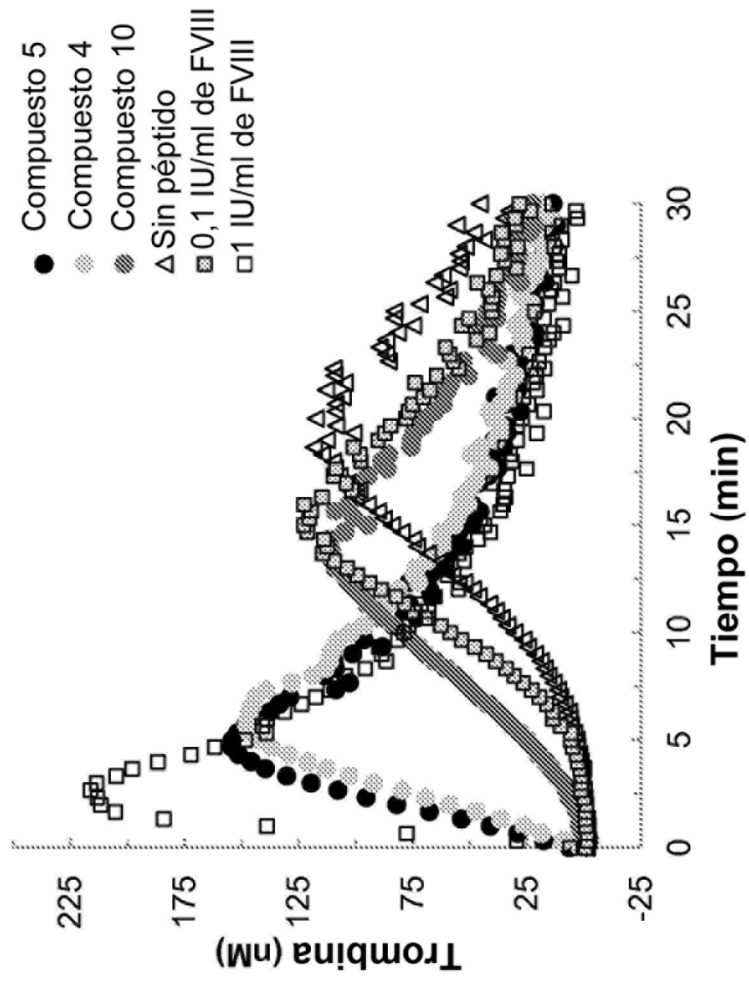
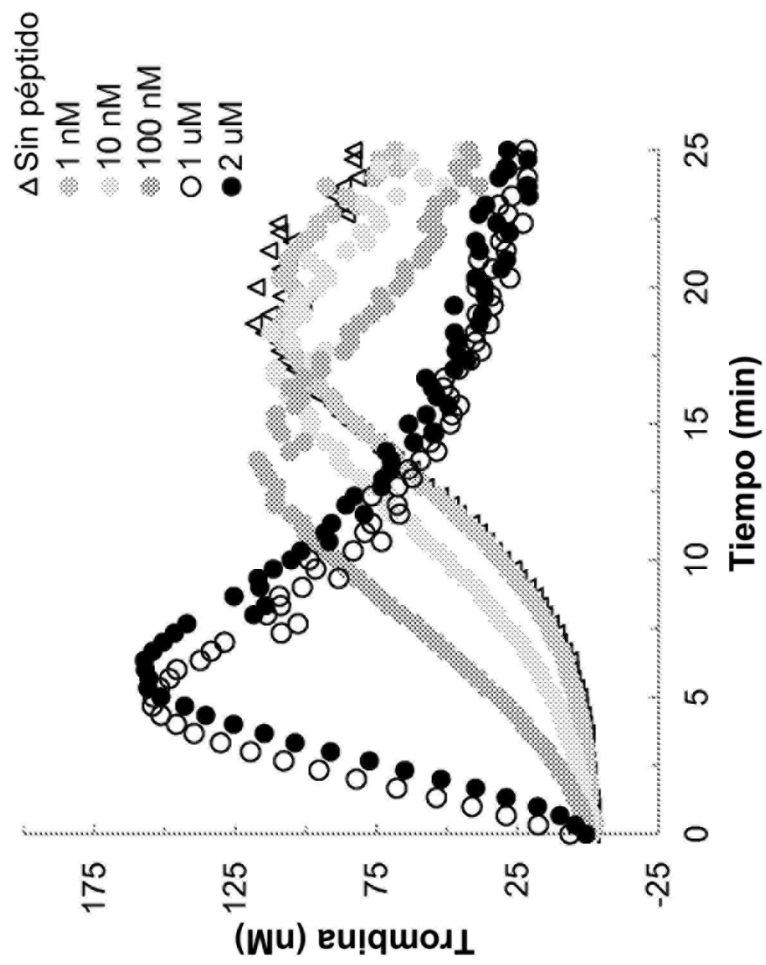


FIG. 4

**FIG. 5**

**FIG. 6**

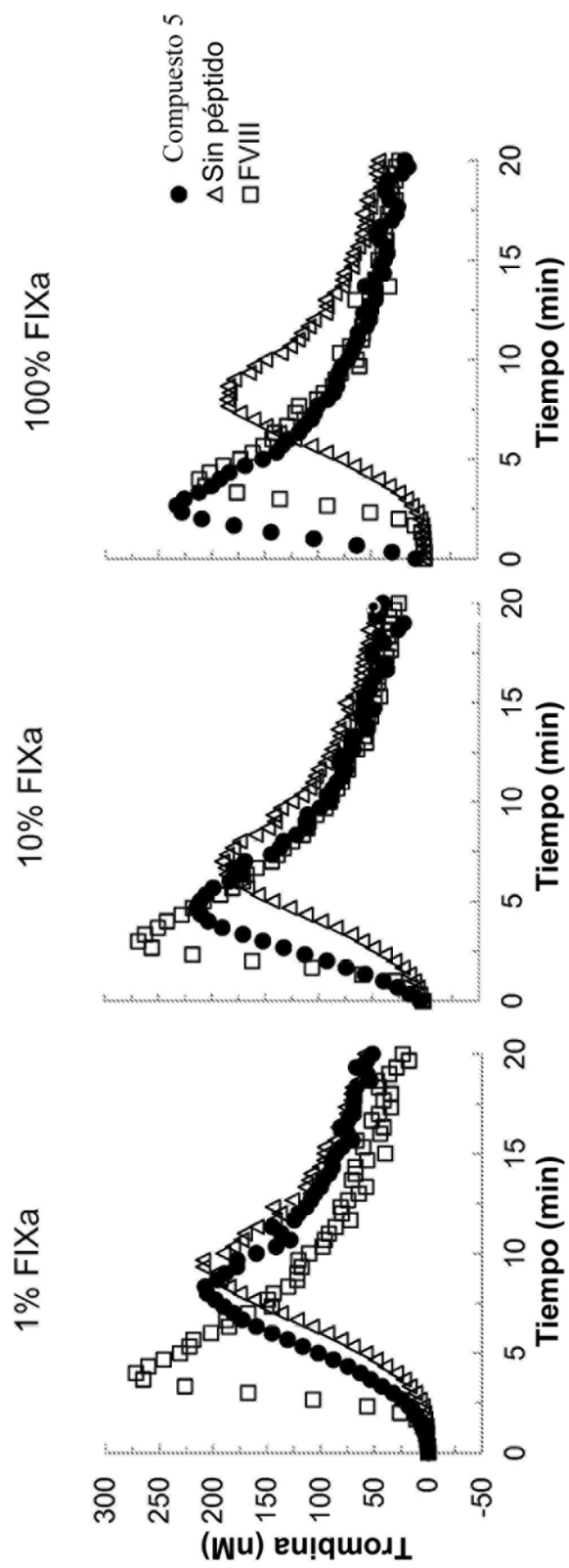


FIG. 7

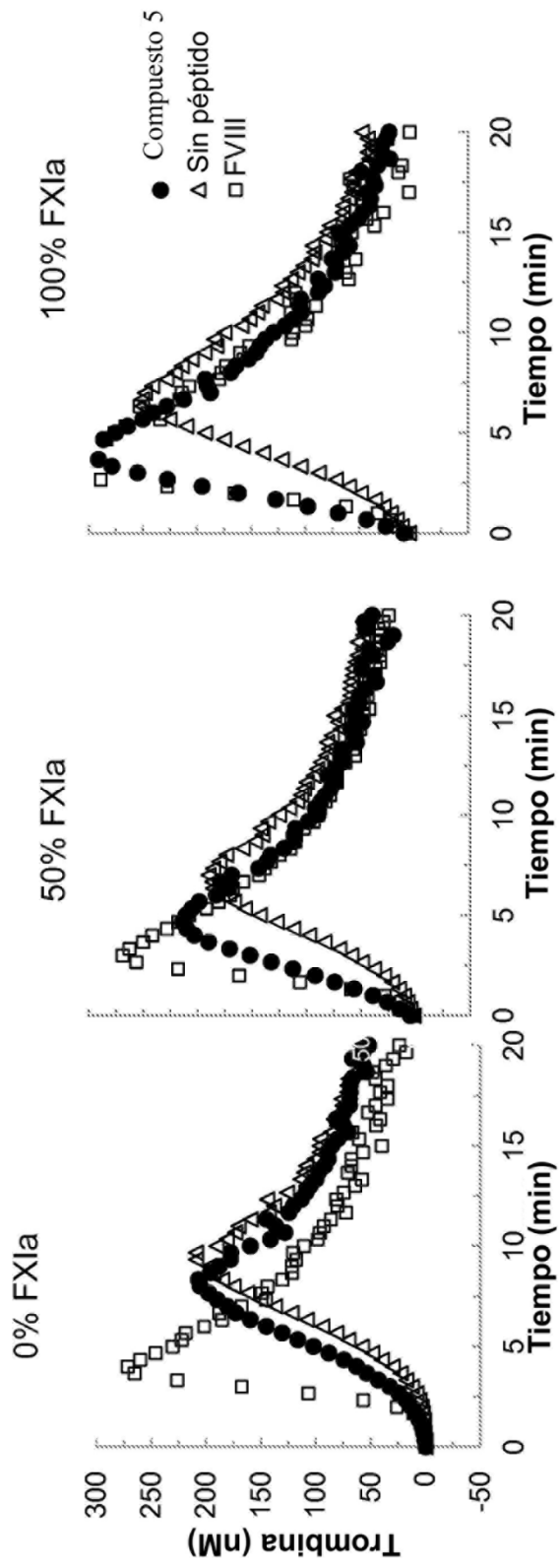


FIG. 8

Conjugado de FVIIa- Fc-compuesto

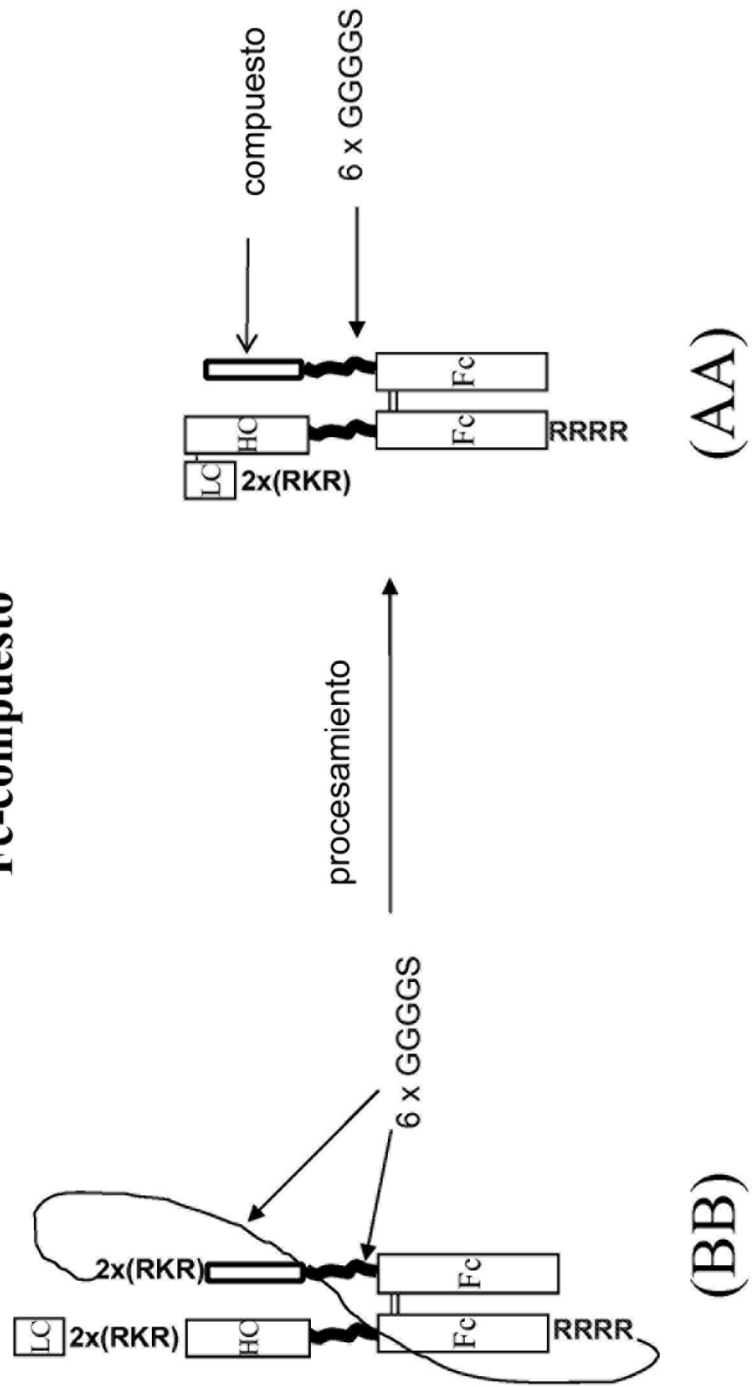


FIG. 9

Conjugado de FIX- Fc-compuesto

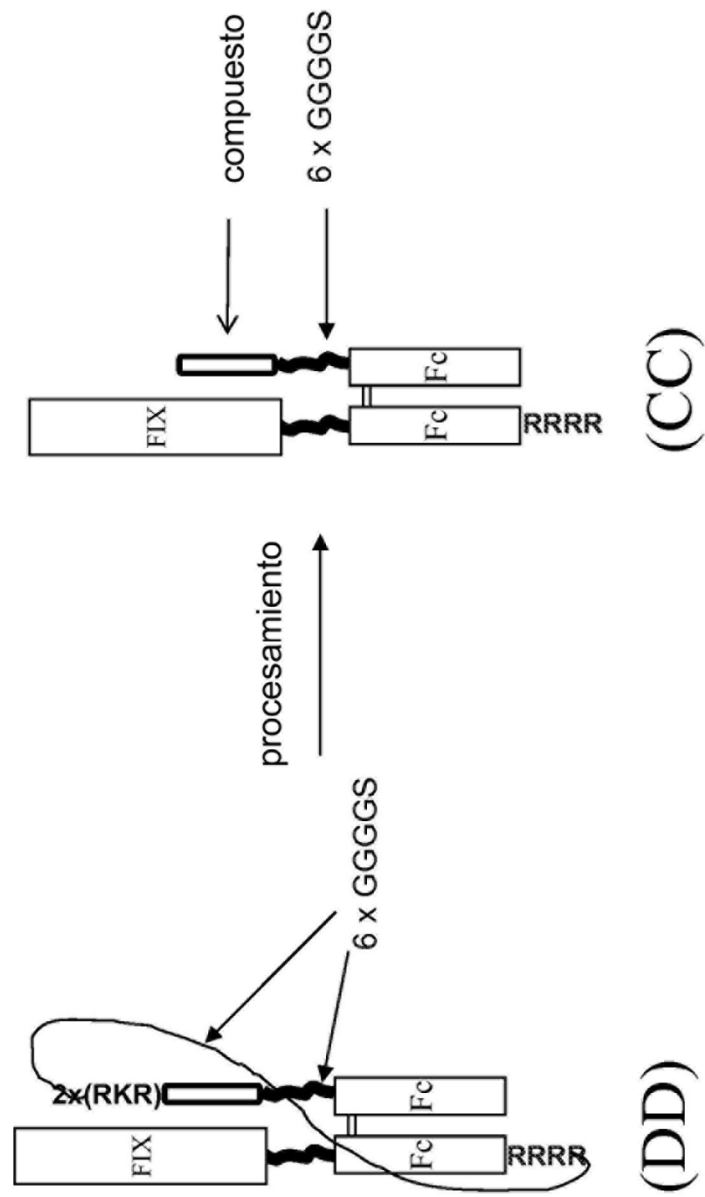


FIG. 10

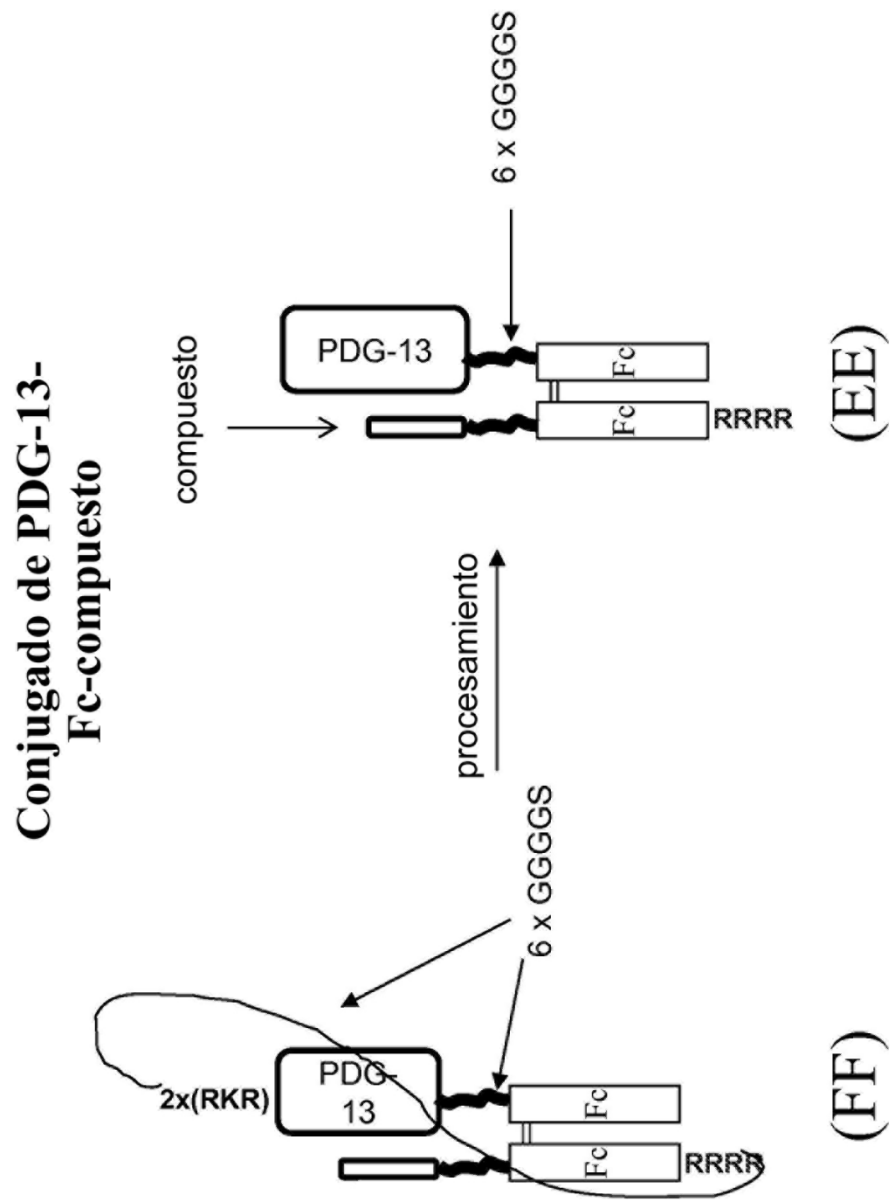


FIG. 11

Conjugado de Fc-compuesto

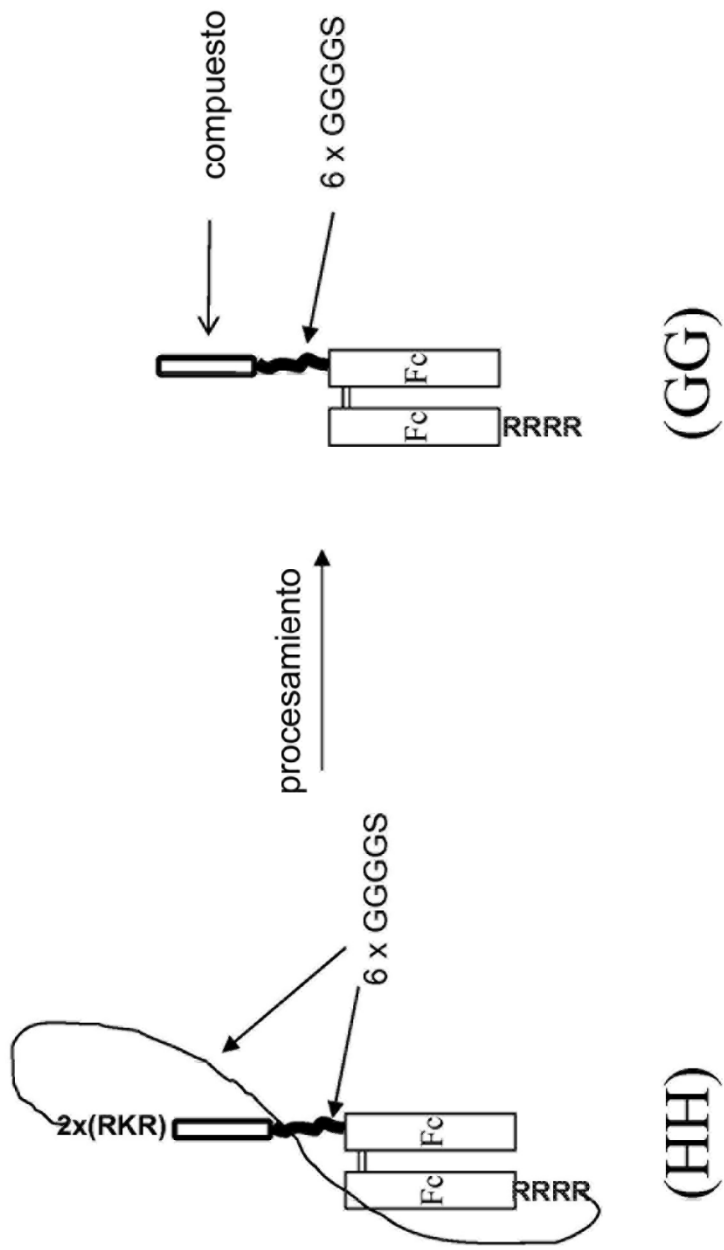


FIG. 12

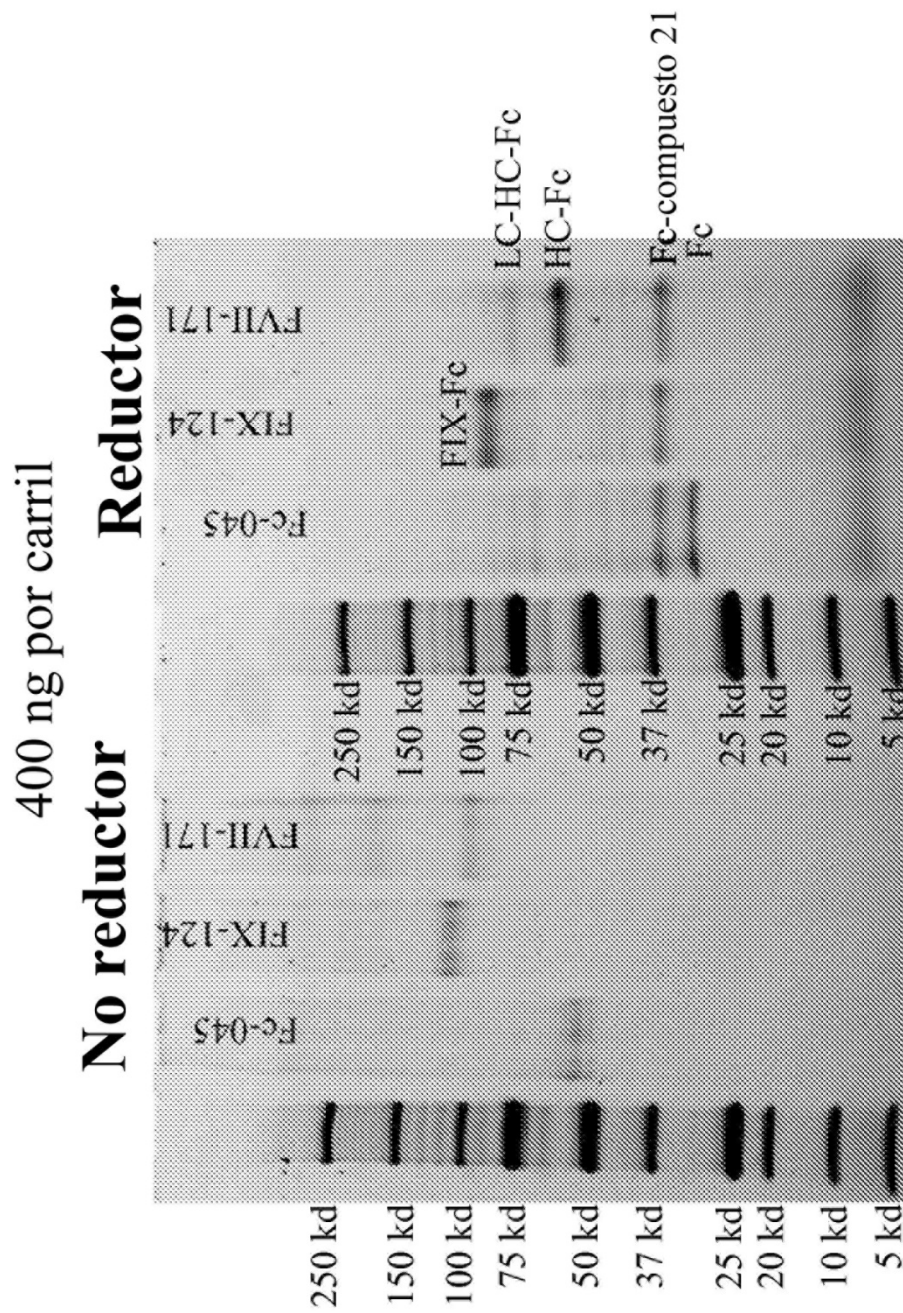


FIG. 13

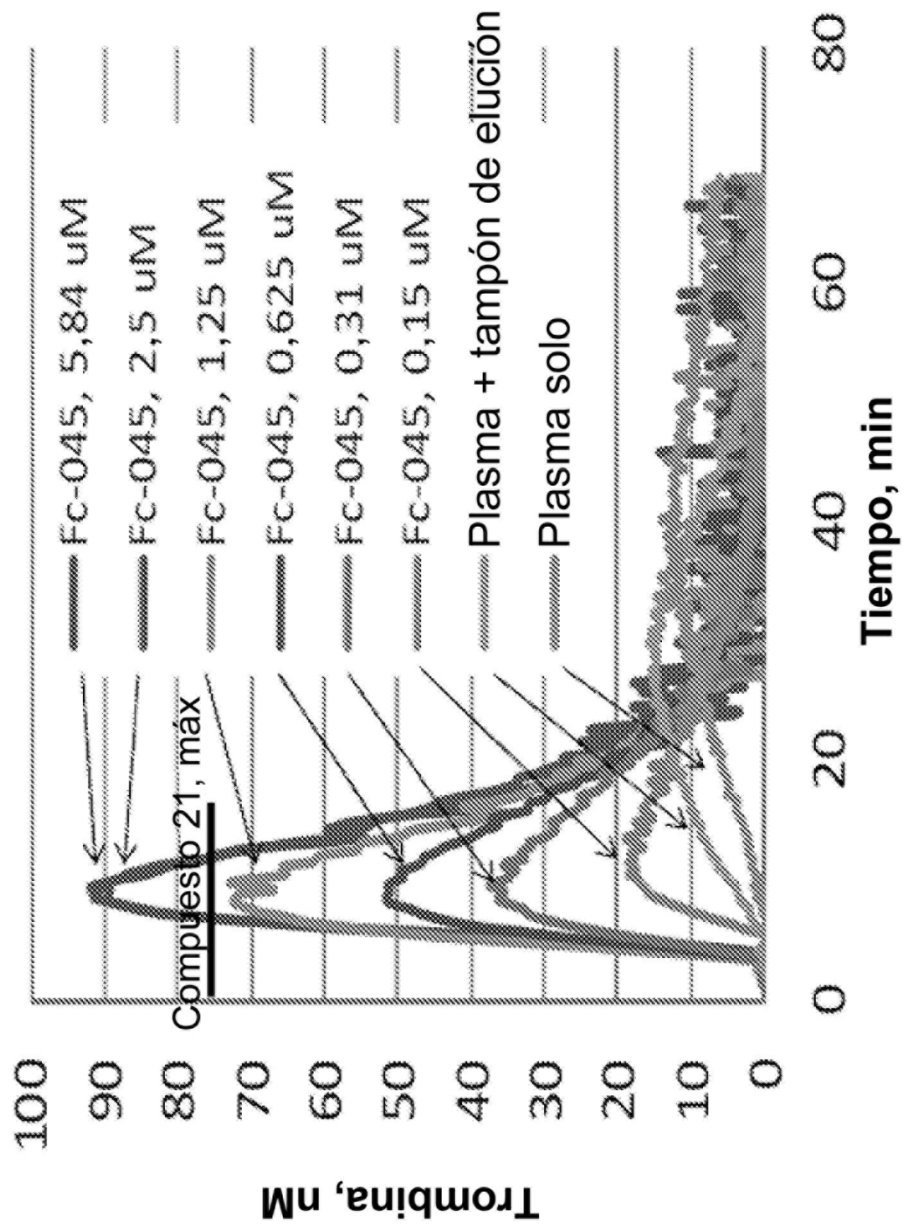
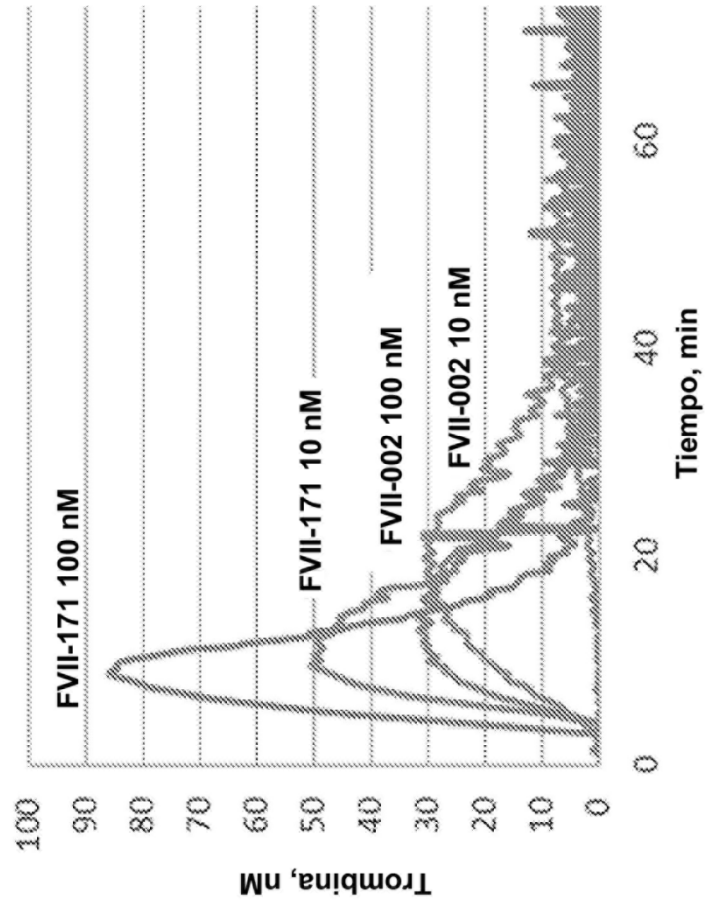


FIG. 14

**FIG. 15**

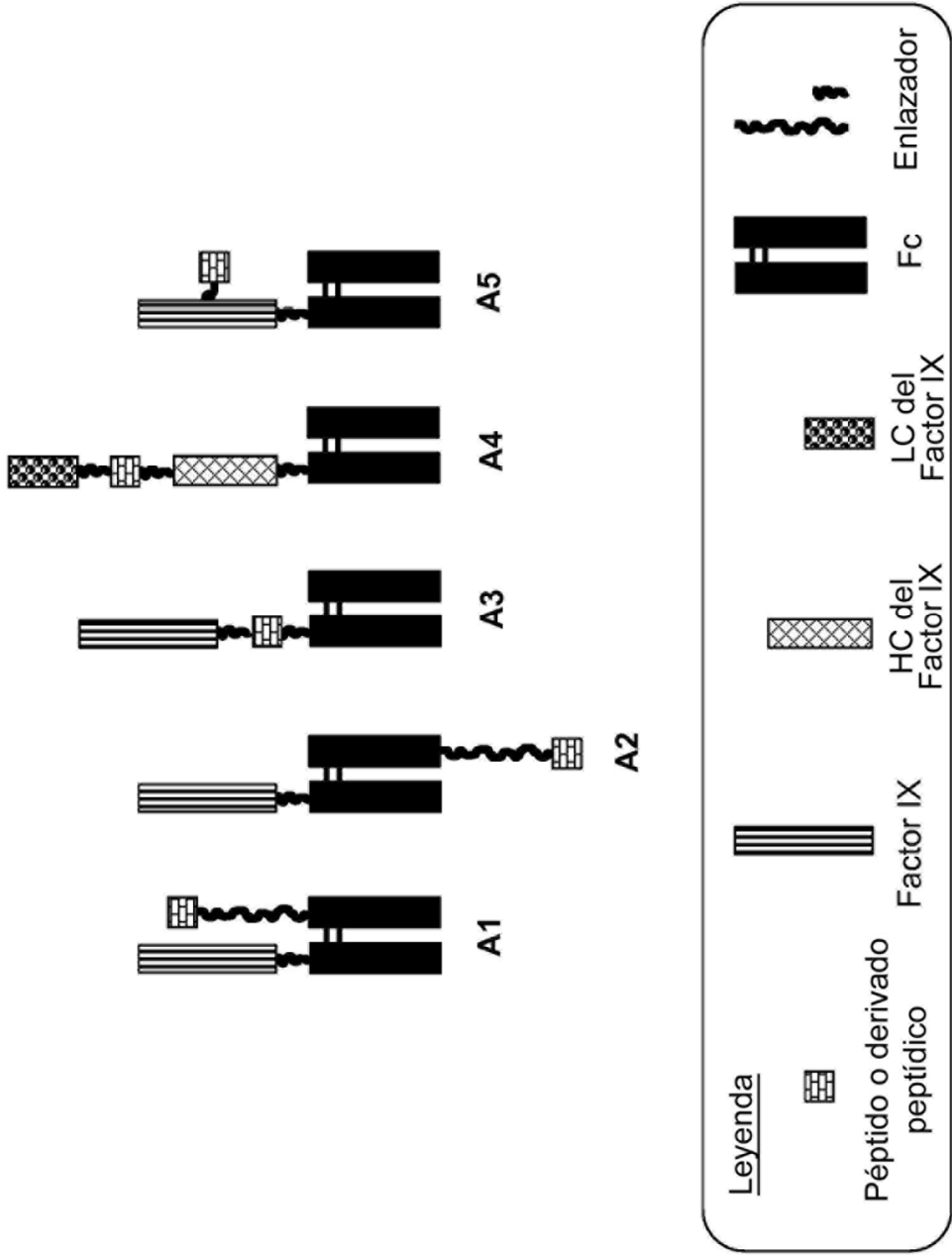


FIG. 16

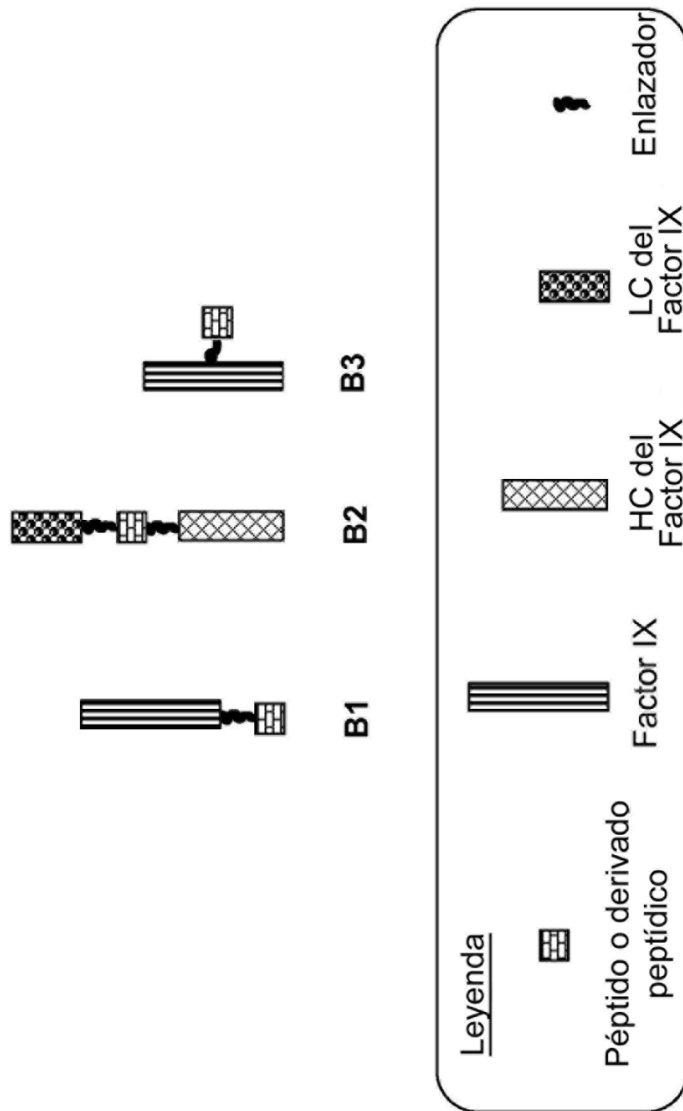


FIG. 17

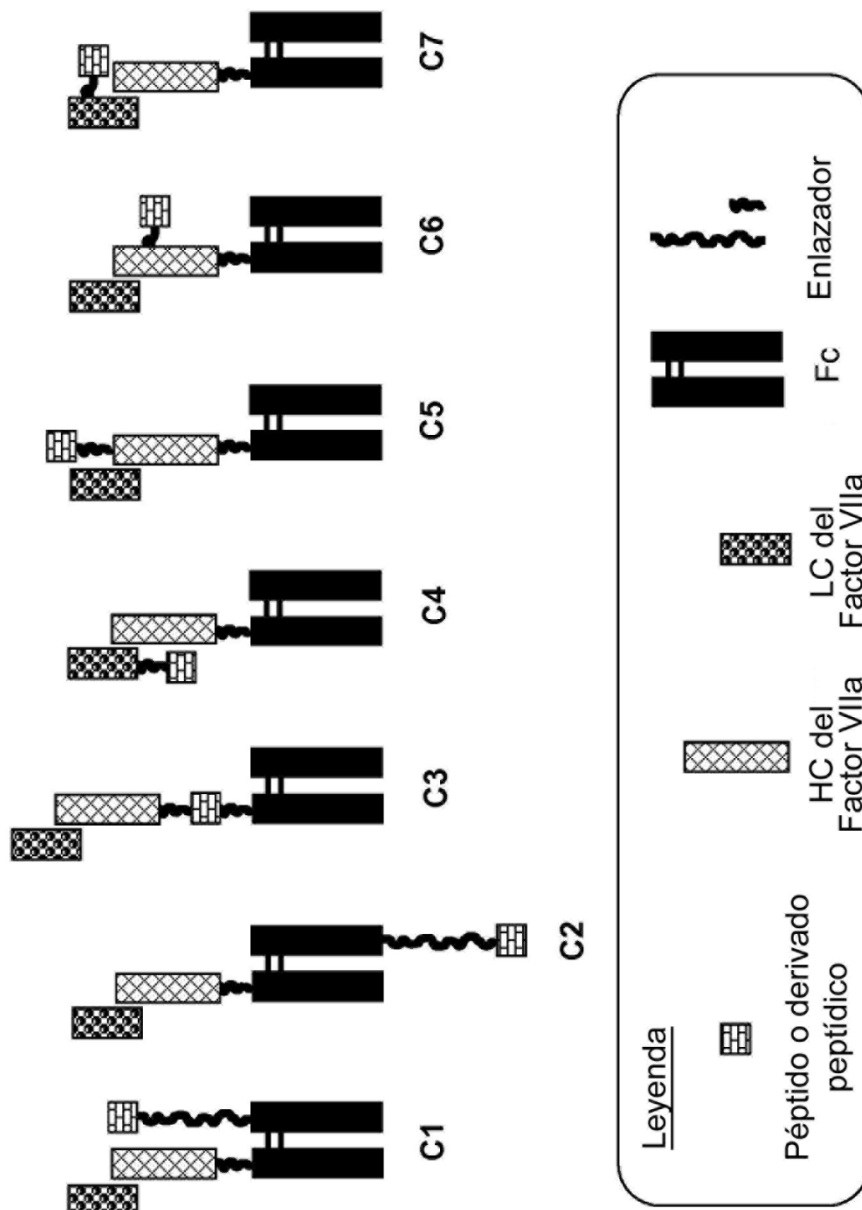


FIG. 18

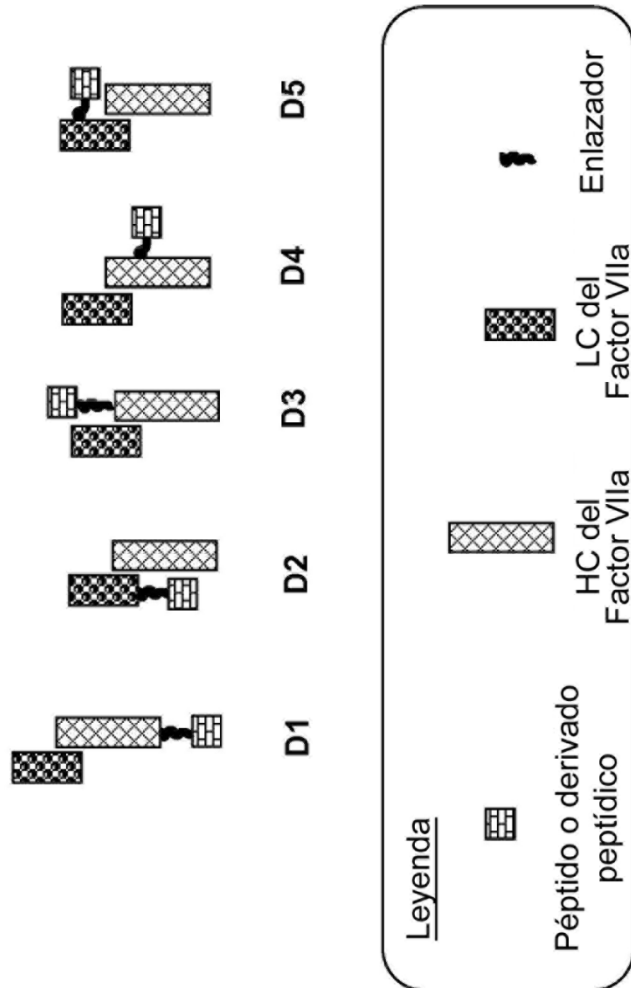


FIG. 19

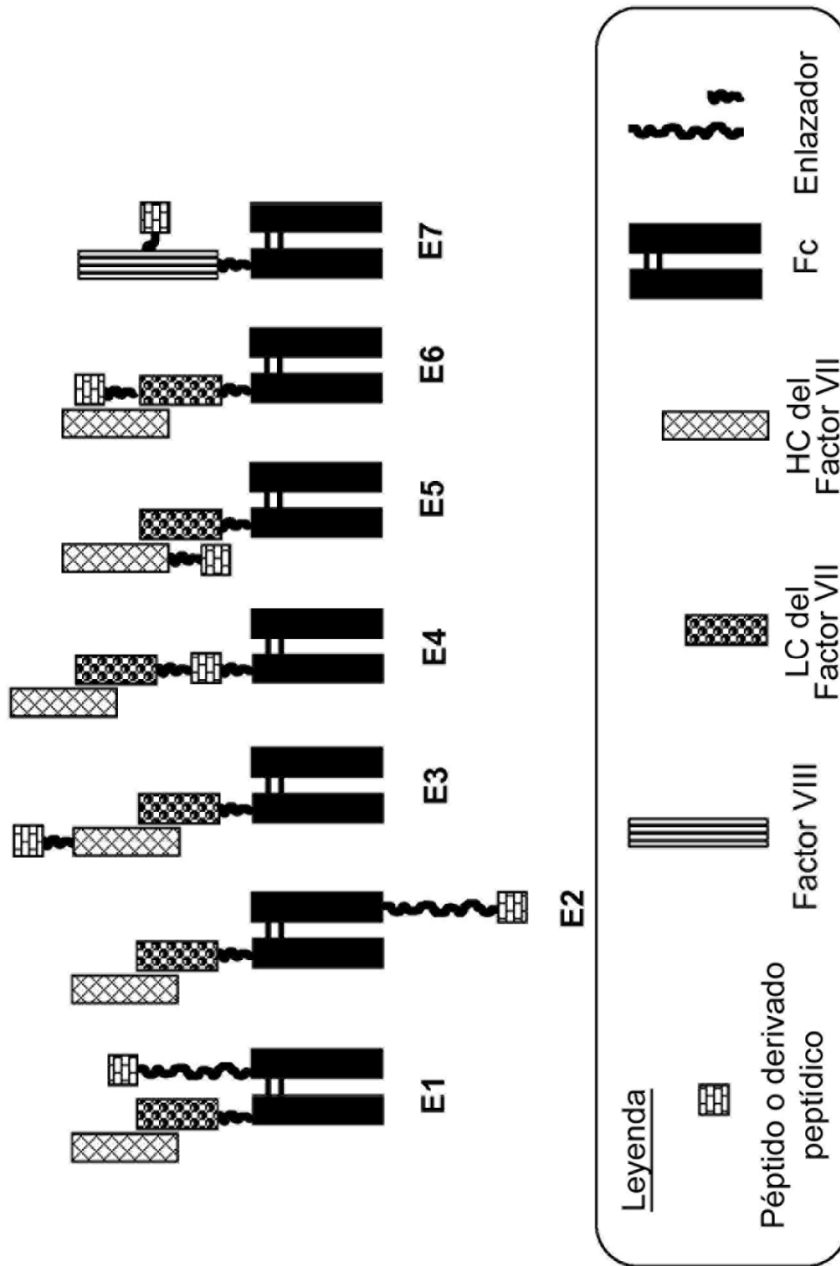


FIG. 20

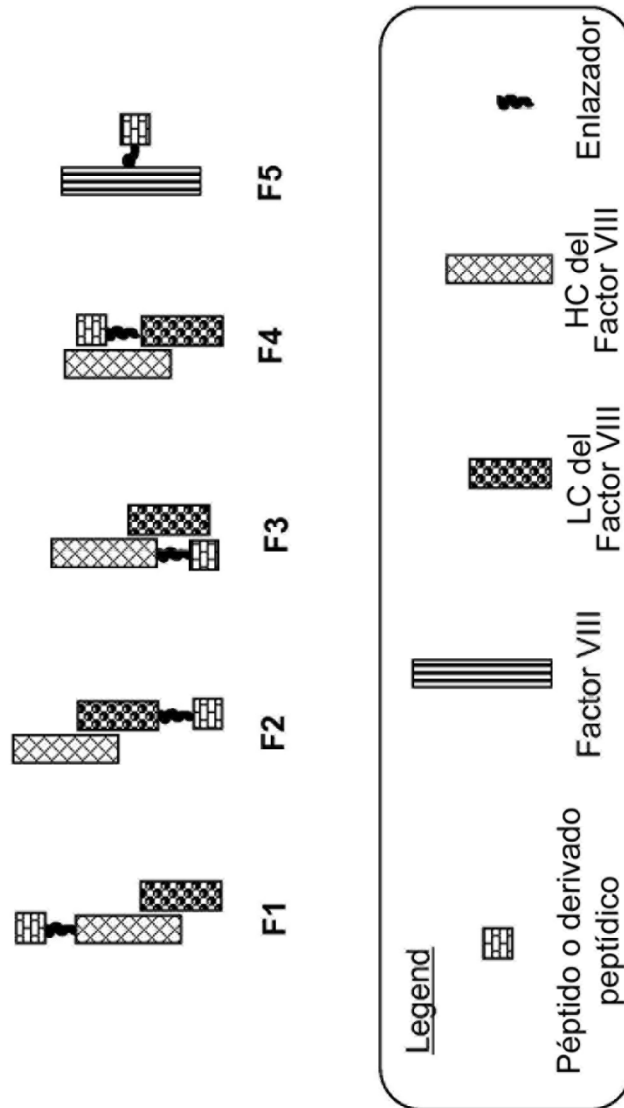


FIG. 21

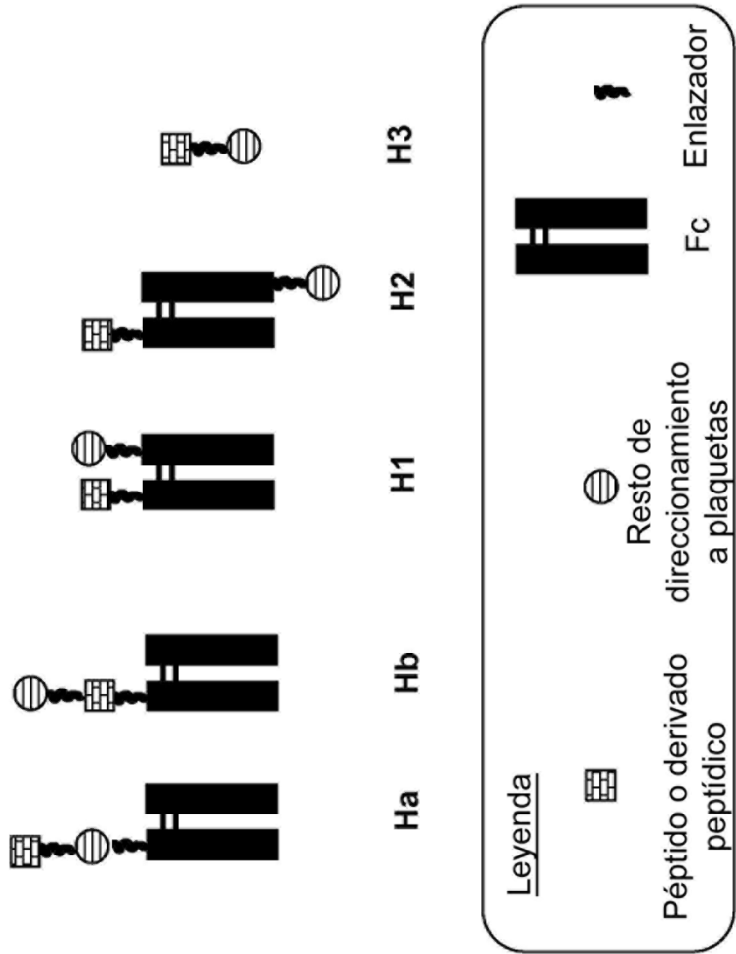


FIG. 22

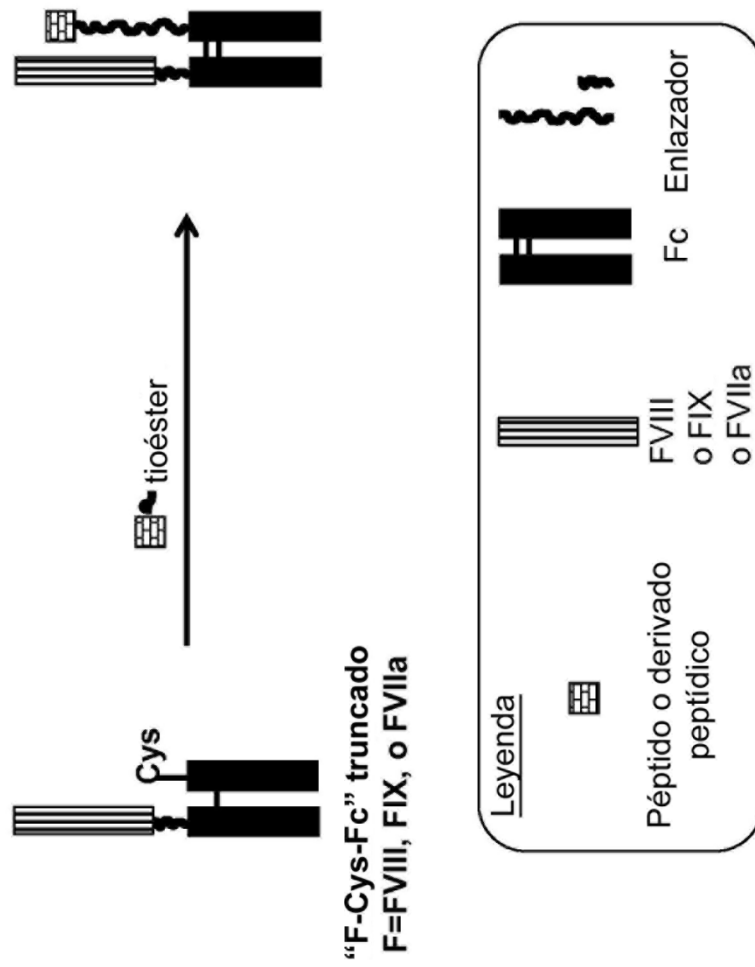


FIG. 23

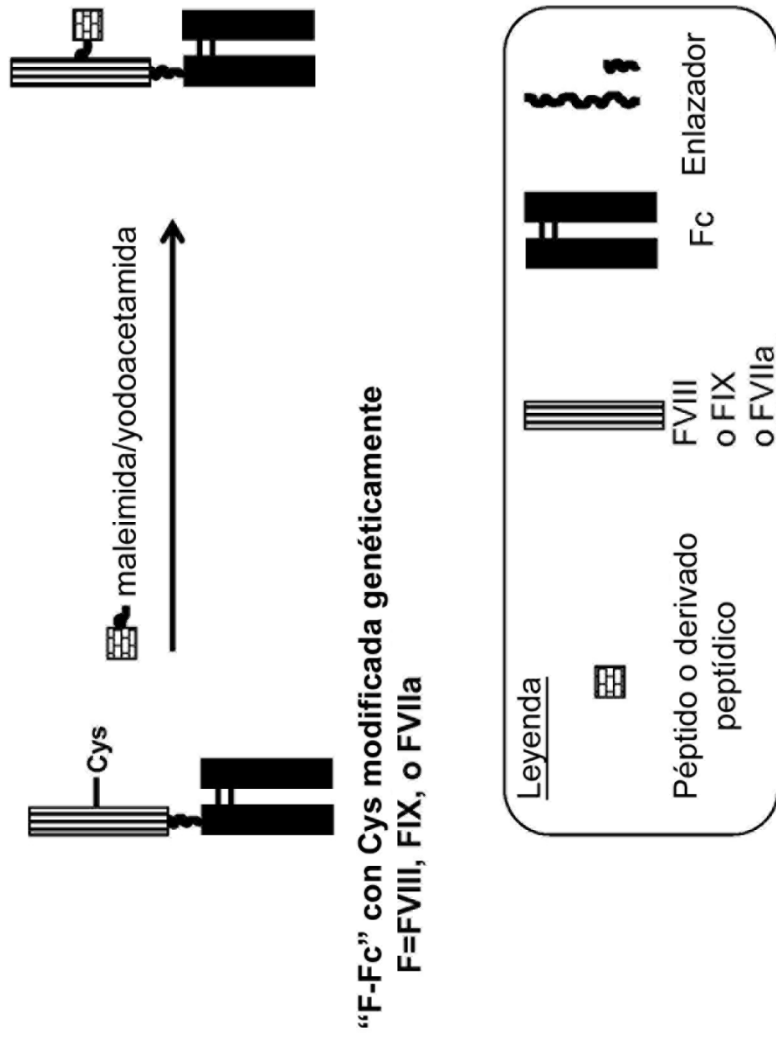
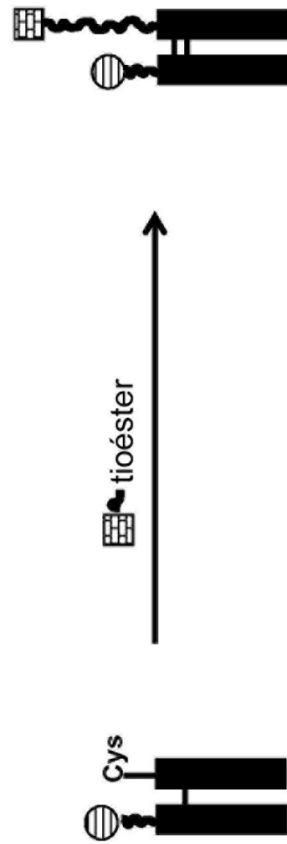


FIG. 24

Ligamiento nativo:

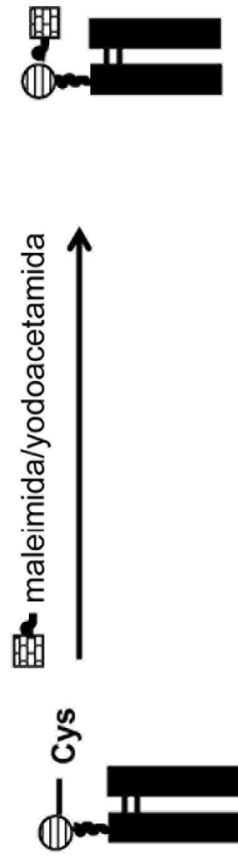


“Direccionamiento a plaquetas-Fc” truncado



FIG. 25

Modificación dirigida a un sitio:



“Resto de direccionamiento a plaquetas”
con Cys modificada genéticamente

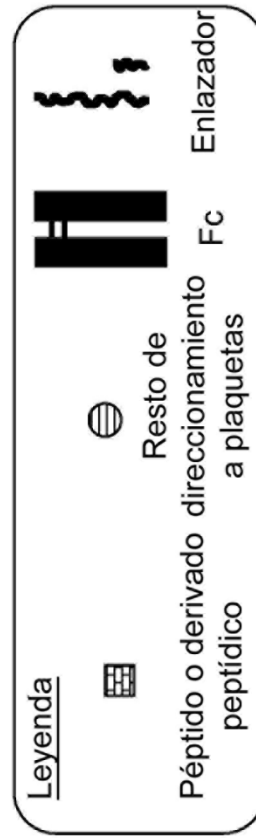


FIG. 26