

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 022**

51 Int. Cl.:
C07K 14/755 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08762760 .0**
96 Fecha de presentación: **21.04.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2150561**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.02.2010**

54 Título: **FACTOR VIII RECOMBINANTE DEMANOSILADO PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON HEMOFILIA A.**

30 Prioridad:
20.04.2007 EP 07290495

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.03.2012

73 Titular/es:
**LFB BIOTECHNOLOGIES
3 AVENUE DES TROPIQUES ZA DE
COURTABOEUF
91940 LES ULIS, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)**

72 Inventor/es:
**CHTOUROU, Abdessatar, Sami;
LACROIX DESMAZES, Sébastien;
KAVERI, Srinivas;
DASGUPTA, Suryasarathi y
BAYRY, Jagaadeesh**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 376 022 T3

DESCRIPCIÓN

Factor VIII recombinante demanosilado para el tratamiento de pacientes con hemofilia A.

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención se refiere a un Factor VIII modificado sustancialmente no inmunogénico o menos inmunogénico. La invención se refiere además a las construcciones de ácido nucleico, incluyendo el ADN que codifica el FVIII modificado, y a los procedimientos para la expresión y producción del FVIII modificado en una célula huésped o en un organismo. La invención también se refiere a los procedimientos de administración del FVIII modificado a un sujeto para tratar una alteración hemorrágica.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 El factor humano VIII:C (FVIII) es el factor de coagulación deficiente en el trastorno hemorrágico de la hemofilia A ligado el cromosoma X, siendo la hemofilia una fuente importante de morbilidad hemorrágica y mortalidad en los hombres afectados. Tradicionalmente, los hemofílicos recibían transfusiones de toda la sangre. Más recientemente, el tratamiento ha consistido en preparaciones de concentrados de FVIII derivados de plasma humano. Sin embargo, el consumo de productos derivados de plasma expone a los pacientes hemofílicos a un posible riesgo de contraer enfermedades transmitidas por virus, como hepatitis y sida. Los costosos esquemas de purificación para reducir el riesgo aumentan los costes del tratamiento. Con el aumento de costes y la limitada disponibilidad de FVIII derivado de plasma, los pacientes reciben el tratamiento esporádicamente en base a la demanda más que en su profilaxis. El FVIII producido en forma recombinante tiene ventajas importantes con respecto al FVIII derivado del plasma en lo que respecta a su pureza y seguridad así como también por el aumento de su disponibilidad. Por consiguiente, se han hecho muchos esfuerzos por desarrollar el FVIII producido en forma recombinante. Debido a la naturaleza lábil del FVIII, especialmente después de su activación, se deben administrar grandes y repetidas dosis de proteínas derivadas del plasma o en forma recombinante para obtener un beneficio terapéutico. Sin embargo, la cantidad de proteína del FVIII a la que el paciente está expuesto se ha relacionado con el desarrollo de anticuerpos que inhiben su actividad. En virtud de esta conocida inmunogenicidad, uno de los objetivos al desarrollar nuevas formas recombinantes del FVIII para su uso como agente terapéutico es el desarrollo de productos que reducen o eliminan dicha respuesta inmunitaria. Las funciones del FVIII en la vía intrínseca de la coagulación de la sangre como cofactor para acelerar la activación del factor X mediante el factor IXa, una reacción que ocurre en una superficie fosfolipídica cargada negativamente ante la presencia de iones calcio.

- 30 La molécula del FVIII se divide en 6 dominios estructurales: un dominio A triplicado (A1, A2, A3), un dominio central rico en carbohidratos y prescindible (dominio B) y un dominio C duplicado (C1, C2) (consulte la figura 5). El FVIII es secretado al plasma como un heterodímero de una cadena pesada (dominios A1–A2–B) y una cadena ligera (dominios A3–C1–C2) asociados mediante un ligamiento no covalente de iones metálicos divalentes entre los dominios A1 y A3. En el plasma, el FVIII se estabiliza uniéndose al factor de von Willebrand. Más específicamente, la cadena ligera de FVIII se une mediante interacciones no covalentes a un centro de unión primario en el terminal amino del factor de von Willebrand. En la activación proteolítica mediante trombina, el FVIII se activa a un heterotrímero de 2 fragmentos de la cadena pesada (A1, un fragmento de 50 kDa y A2, un fragmento de 43 kDa) y de la cadena ligera (A3–C1–C2, una cadena de 73 kDa). La forma activa del FVIII (FVIIIa), por lo tanto, consiste en una subunidad de A1 asociada a través del ligamiento de iones metálicos divalentes a una cadena ligera de A3–C1–C2 escindida a la trombina y una subunidad no unida a A2 asociada con el dominio A1 a través de una asociación de iones. Este heterotrímero de FVIIIa es inestable y está sujeto a una rápida inactivación a través de la disociación de la subunidad A2 en condiciones fisiológicas. La molécula de FVIII contiene 25 secuencias de consenso (Asn–Xxx–Thr/Ser) que permiten la glicosilación ligada a N, 20 de las cuales han demostrado ser glicosiladas (1).

- 45 La proteína del FVIII puede estar definida desde el punto de vista funcional como un factor capaz de complementar el defecto de coagulación en el plasma de los pacientes afectados con hemofilia A. Para permitir el tratamiento de la hemofilia A, el FVIII ha sido purificado a partir de plasma humano o porcino y, más recientemente, producido mediante tecnologías de ADN recombinante. El documento EE. UU. 4.965.199 describe, por ejemplo, procedimientos desarrollados para la producción recombinante de cantidades terapéuticas de FVIII en células huésped de mamíferos. Asimismo, se ha informado la expresión humana del FVIII en células de ovario de hámster chino (CHO) y células de riñón de hámster bebé (BHKC) y, más recientemente, también se ha demostrado la eficacia del FVIII con el dominio B eliminado en ensayos clínicos (documento EE. UU. 4.868.112, ref. 2).

- 50 El documento US 2005/0100990 reivindica mutantes del factor VIII modificado en los que los sitios de N-glicosilación se encuentran alterados por la sustitución de un aminoácido de una secuencia consenso de glicosilación por otro aminoácido o por la delección de todo o parte del dominio B, lo cual da como resultado la pérdida de varios sitios de N-glicosilación. Sin embargo, ninguno de los mutantes concretos descritos en este documento se corresponde realmente con la delección o la sustitución de ninguno de los aminoácidos asparagina 239, asparagina 2118, serina 241 o treonina 2120

La publicación "Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion" Miao Hongzhi, Blood, vol. 103 nº9, 2004, se centra en un FVIII modificado cuya secreción se encuentra mejorada en particular por la delección del dominio

B. La variante del FVIII incluye 226 aminoácidos del dominio B, en el que las Asn están sustituidas por Gln en la secuencia consenso de N-glicosilación en las posiciones 757, 784, 828, 900 y 963.

El documento US 6.759.216 reivindica moléculas modificadas del FVIII que muestran una menor inmunogenicidad y más concretamente un FVIII humano con delección del dominio B en el que se ha incorporado un sitio de N-glicosilación en las posiciones 486-488 del dominio A2.

La publicación "The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor", Bovenschen et al., JTH Jun 2005, vol. 3, nº 6, 2005 estudia la interacción del FVIII con el receptor lectina endocítico de asialoglicoproteínas (ASGPR). Este documento reivindica en particular que el ensamblaje del complejo FVIII-ASGPR está dirigido por elementos estructurales dentro del dominio B del FVIII y que la deglicosilación total de la cadena pesada del FVIII por la endoglicosidasa F anula completamente la interacción con el ASGPR.

Los productos terapéuticos del FVIII disponibles comercialmente incluyen el FVIII derivado del plasma (pdFVIII) y los productos del FVIII recombinante (rFVIII) como el rFVIII completo (Kogenate® Bayer, Advate® Baxter, Helixate® CSL–Behring) y un rFVIII con el dominio B eliminado (Refacto® Wyeth).

Sin embargo, a pesar de la disponibilidad del FVIII de calidad terapéutica, la necesidad de análogos del FVIII con propiedades mejoradas sigue siendo alta. Es más, el tratamiento de pacientes con hemofilia A con FVIII terapéutico (pdFVIII o rFVIII) provoca, en 15 al 30% de los casos, la aparición de anticuerpos anti FVIII (inhibidores) que neutralizan la actividad procoagulante del FVIII administrado terapéuticamente (3,4). La aparición de inhibidores se considera un reflejo de la respuesta inmunitaria alogénica a la administración repetida de una proteína del FVIII exógeno. Algunos hemofílicos son muy sensibles al factor VIII recombinante exógeno y desarrollan anticuerpos anti factor VIII limitando la eficacia del tratamiento. Por lo tanto, el desarrollo de inhibidores del FVIII representa un gran obstáculo médico y un asunto de preocupación crítico ya que los pacientes que producen los inhibidores del FVIII se vuelven resistentes a la terapia de sustitución habitual. La aparición de inhibidores del FVIII no sólo provoca un aumento 3 veces mayor de los costes del tratamiento (5) sino que también afecta drásticamente la calidad de vida de los pacientes, aumentando la morbilidad y la mortalidad. En este sentido, se espera proporcionar un FVIII con reducción o ausencia del potencial para inducir una respuesta inmunitaria en los seres humanos. Además, se espera proporcionar un FVIII con un aumento del tiempo de circulación dentro del ser humano que podría proporcionar un beneficio particular en el contexto de una enfermedad crónica y recurrente, como es el caso de la hemofilia A.

La primera etapa de la respuesta inmunitaria específica dirigida al FVIII consistió en la endocitosis del FVIII por las células presentadoras de antígenos (CPA). Las células dendríticas (CD) parecen ser las CPA más potentes para cebar los linfocitos T sin tratamiento previo y para iniciar la correspondiente respuesta inmunitaria específica del antígeno (6,7). La endocitosis de antígenos por CD se realiza generalmente mediante macropinocitosis o mediante una endocitosis mediada por receptores. Es más, la superficie de CD presenta un gran número de receptores endocíticos, la mayoría de los cuales dependen de la presencia de iones bivalentes, principalmente calcio. Muchos receptores endocíticos, por sus dominios de reconocimiento de carbohidratos (DRC) expuestos, son específicos para los residuos de azúcares presentes en los antígenos (8) y se denominan receptores de lectina tipo C (CLR, por sus siglas en inglés). De esta manera, se pueden reconocer los residuos de manosa en un antígeno mediante una serie de CLR en la superficie de las CD, que incluyen el receptor de manosa (RM, CD206), ICAM3 específica de las células dendríticas que utilizan no integrinas (DC–SIGN, CD209), dectina, DEC–205 (CD205). El polícarbohidrato de manano ha demostrado ser un ligando para las manosas sensibles a los CLR especialmente RM y DC–SIGN (9–11). La molécula de DC–SIGN en las CD se fija a la ICAM–3 en los linfocitos T. La interacción específica parece tener una función importante en el inicio de la sinapsis inmunológica entre las CD y los linfocitos T. La activación de los linfocitos podría, por lo tanto, inhibirse con un anticuerpo de bloqueo anti–DC–SIGN.

Se presentaron numerosos tratamientos para reducir las consecuencias de la respuesta inmunitaria al FVIII. Por ejemplo, el tratamiento formado por el consumo de desmopresina (una hormona sintética que estimula la producción de FVIII), agentes promotores de coagulación (por ejemplo, concentrado complejo de protrombina o concentrado complejo de protrombina activado), factor recombinante VIIa o perfusión del FVIII para inducir tolerancia.

Se ha desarrollado un procedimiento reciente, que consiste en el consumo de anticuerpos anti idiotípicos que interactúan con la región variable de otros anticuerpos, para neutralizar los anticuerpos inhibidores (12). De esta manera, se aisló un anticuerpo IgG4kappa monoclonal humano dirigido contra un dominio C1 anti–FVIII, que bloquea la actividad del cofactor del FVIII y su ligamiento con el factor de von Willebrand (vWF) (13). Del mismo modo, se aisló un anticuerpo monoclonal humano contra el dominio C2 anti–FVIII, BO2C11 (IgG4kappa) (14), que inhibe el ligamiento del FVIII a vWF y fosfolípidos. Este anticuerpo, por lo tanto, inhibe completamente la actividad procoagulante del FVIII nativo y activado. Otro ejemplo de anticuerpo monoclonal es el BO1B2, dirigido contra el dominio A2 del FVIII, que bloquea el 99% de la actividad del FVIII. Sin embargo, la respuesta inmunitaria inducida por FVIII es una respuesta policlonal, y un tratamiento formado por el consumo de anticuerpos anti idiotípicos dirigidos contra los anticuerpos anti FVIII sólo podría neutralizar parcialmente la respuesta inmunitaria al FVIII.

El solicitante ha demostrado recientemente que las glicosilaciones que terminan en manosas en el FVIII median la internalización del FVIII mediante células dendríticas (CD) humanas inmaduras. Estos resultados demuestran que el bloqueo de la interacción entre los azúcares manosilados ubicados en el FVIII y los receptores de la manosa de CD

reduce la internalización del FVIII y la posterior presentación a los linfocitos T específicos del FVIII. De esta manera, se puede lograr la reducción de la inmunogenicidad del FVIII reduciendo la capacidad de interactuar con los receptores sensibles a la manosa.

- 5 El solicitante además ha descubierto sorprendentemente la capacidad de un FVIII modificado, en el que uno o más aminoácidos seleccionados de la asparragina 239 (Asn239) y la asparragina 2118 (Asn2118) han sido sustituidos o eliminados, de activar los linfocitos T cuando son presentados por las CD se reduce o elimina sustancialmente, brindando la oportunidad de proporcionar a los pacientes un FVIII terapéutico no inmunogénico o menos inmunogénico.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

- 10 La presente invención proporciona una proteína del FVIII que comprende un polipéptido del FVIII modificado y caracterizado porque la capacidad de dicho polipéptido del FVIII modificado de interactuar o de ser endocitado mediante células de endocitosis disminuye o desaparece con respecto al polipéptido del FVIII correspondiente no modificado.

- 15 En una forma de realización específica, la presente invención proporciona un polipéptido del FVIII modificado cuya capacidad para interactuar con los receptores en la superficie a partir de células de endocitosis disminuye o desaparece, en particular un polipéptido del FVIII modificado, cuya capacidad disminuye o desaparece si los receptores en la superficie son receptores sensibles a la manosa y, más particularmente, si los receptores en la superficie se seleccionan de un grupo formado por un receptor de manosa (RM, CD206), ICAM3 específica de las células dendríticas que utilizan no integrinas (DC-SIGN, CD209), dectina, DEC-205 (CD205). En una forma de realización específica, las células de endocitosis son células presentadoras de antígenos (CPA) y, particularmente, células dendríticas, macrófagos, células endoteliales o células del linfocito B.

- 20 En otra forma de realización específica, la presente invención proporciona un polipéptido del FVIII modificado, cuya inmunogenicidad se ve sustancialmente reducida o eliminada en los seres humanos.

En otro aspecto, el polipéptido del FVIII modificado de la invención es sustancialmente desglicosilado, más particularmente el FVIII modificado de la invención es una estructura tipo glucano sustancialmente terminada con el polipéptido del FVIII desglicosilado del residuo de manosa.

- 25 Más particularmente, el polipéptido del FVIII modificado de la invención comprende la sustitución o la supresión de, al menos, un aminoácido de un sitio de consenso de glicosilación que tiene la secuencia de consenso Asn-Xxx-Thr/Ser, en la que Xxx representa cualquier aminoácido. Más particularmente, el polipéptido del FVIII modificado de la invención comprende la sustitución o la supresión de, al menos, un aminoácido seleccionado del grupo formado por asparragina 239, asparragina 2118, serina 241 y treonina 2120, con referencia a la secuencia del polipéptido del FVIII humano completo establecida en el identificador de secuencia N°: 2. En una forma de realización específica, la asparragina 239 se sustituyó por un aminoácido seleccionado del grupo formado por alanina, glicina, serina, glutamina, treonina, ácido aspártico o ácido glutámico. En otra forma de realización específica, la asparragina 2118 se sustituyó por un aminoácido seleccionado del grupo formado por alanina, serina, glutamina, treonina, ácido aspártico o ácido glutámico. En otra forma de realización, la asparragina 239 se sustituyó por alanina y/o asparragina 2118 se sustituyó con alanina. En otra forma de realización, la asparragina 239 se sustituyó por glutamina y/o asparragina 2118 se sustituyó por glutamina. En otra forma de realización, la asparragina 239 se sustituyó por alanina y la asparragina 2118 se sustituyó por glutamina. En otra forma de realización, la asparragina 239 se sustituyó por glutamina y la asparragina 2118 se sustituyó por alanina. En otra forma de realización específica, el polipéptido del FVIII modificado de la invención comprende, al menos, uno de (i) la secuencia aminoacídica establecida en el identificador de secuencia N°: 6 y/o (ii) la secuencia aminoacídica establecida en el identificador de secuencia N°: 8. En otra forma de realización específica, el polipéptido del FVIII modificado de la invención comprende, al menos, uno de (i) la secuencia aminoacídica establecida en el identificador de secuencia N°: 12 y/o (ii) la secuencia aminoacídica establecida en el identificador de secuencia N°: 14. En otra forma de realización específica, el polipéptido del FVIII modificado de la invención comprende (i) la secuencia aminoacídica establecida en el identificador de secuencia N°: 6 y (ii) la secuencia aminoacídica establecida en el identificador de secuencia N°: 14. En otra forma de realización específica, el polipéptido del FVIII modificado de la invención comprende (i) la secuencia aminoacídica establecida en el identificador de secuencia N°: 12 y (ii) la secuencia aminoacídica establecida en el identificador de secuencia N°: 8.

En otro aspecto, el polipéptido del FVIII modificado de la invención es una proteína del FVIII activo al procoagulante.

- 50 En otro aspecto, el polipéptido del FVIII modificado de la invención además comprende la supresión de todo o parte del dominio B establecido en el identificador de secuencia N°: 10. En otra forma de realización preferente, el polipéptido del FVIII modificado de la invención se elimina sólo parcialmente del dominio B y, más preferentemente, el polipéptido del FVIII modificado de la invención contiene, al menos, los primeros 226 aminoácidos del dominio B (con referencia al identificador de secuencia N°: 10).

- 55 Es otro objeto de la invención proporcionar una molécula de ácido nucleico aislada o una secuencia nucleotídica aislada modificada que codifica una proteína del FVIII que comprende el polipéptido del FVIII modificado de la invención. En una forma de realización específica, la secuencia nucleotídica que codifica una proteína del FVIII comprende, al menos, uno de (i) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 5 y/o (ii) la secuencia nucleotídica

establecida en el identificador de secuencia N°: 7. En otra forma de realización específica, la secuencia nucleotídica que codifica una proteína del FVIII comprende una molécula de ácido nucleico aislada capaz de hibridarse en condiciones muy restrictivas con, al menos, uno de (i) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 5 y/o (ii) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 7.

5 En otra forma de realización específica, la secuencia nucleotídica que codifica una proteína del FVIII comprende, al menos, uno de (i) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 11 y/o (ii) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 13. En otra forma de realización específica, la secuencia nucleotídica que codifica una proteína del FVIII comprende una molécula de ácido nucleico aislada capaz de hibridarse en condiciones muy restrictivas con, al menos, uno de (i) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 11 y/o (ii) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 13.

10 En otra forma de realización específica, la secuencia nucleotídica que codifica una proteína del FVIII comprende, al menos, uno de (i) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 5 y (ii) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 13. En otra forma de realización específica, la secuencia nucleotídica que codifica una proteína del FVIII comprende una molécula de ácido nucleico aislada capaz de hibridarse en condiciones muy restrictivas con, al menos, uno de (i) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 5 y (ii) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 13.

15 En otra forma de realización específica, la secuencia nucleotídica que codifica una proteína del FVIII comprende, al menos, uno de (i) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 11 y (ii) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 7. En otra forma de realización específica, la secuencia nucleotídica que codifica una proteína del FVIII comprende una molécula de ácido nucleico aislada capaz de hibridarse en condiciones muy restrictivas con, al menos, uno de (i) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 11 y (ii) la secuencia nucleotídica establecida en el identificador de secuencia N°: 7.

20 La presente invención además proporciona un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico aislada de la invención o una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido del FVIII modificado de la invención.

25 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una célula huésped transfectada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico aislada de la invención que permite la expresión de una proteína del FVIII o un polipéptido del FVIII modificado de la invención.

30 La presente invención además proporciona un organismo transgénico no humano que expresa la proteína del FVIII de la invención y, particularmente, un organismo seleccionado a partir de un microorganismo, un animal no humano o una planta y, más particularmente, un mamífero.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición que comprenda una proteína del FVIII como se presenta en la invención y, particularmente, una composición farmacéutica o una composición liofilizada, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la producción de una proteína del FVIII según la invención y que comprenda los pasos de cultivar una célula huésped transformada o transfectada con una molécula de ácido nucleico de la invención o con una molécula de ácido nucleico codificando una proteína del FVIII de la invención y aislando de la célula huésped y/o del medio de cultivo, la proteína del FVIII resultante de la expresión de la molécula de ácido nucleico.

40 La presente invención también proporciona el uso de una proteína del FVIII según la invención para el tratamiento de una enfermedad hemorrágica, particularmente una enfermedad caracterizada por una deficiencia del FVIII, más particularmente hemofilia A y hemofilia A adquirida.

45 En una forma de realización específica, la invención proporciona el uso de una proteína del FVIII de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar la hemofilia A o la hemofilia A adquirida así como un procedimiento para tratar la hemofilia A en un paciente, que comprende la administración de una cantidad eficaz para la coagulación de la proteína del FVIII según la invención a un paciente que la necesita.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Entrada sensible a la manosa del FVIII en las células dendríticas (CD).

50 (A) Las CD se preincubaron con 5mM de EDTA, 1mg/ml de manano o 1 mg/ml de D-galactosa durante 30 minutos a 37 °C, antes de la adición de FVIII (40 µg/ml) durante 2 horas. Los valores informados representan una asimilación de antígenos relativa definida como $[(^{37}\text{C} \text{MFI}_{\text{inh}} - ^4\text{C} \text{MFI}_{\text{medio}}) / (^{37}\text{C} \text{MFI}_{\text{medio}} - ^4\text{C} \text{MFI}_{\text{medio}})] \times 100$, en la que “MFI_{inh}” representa la MFI detectada en la presencia del inhibidor. Los resultados son de 12 donantes y la importancia estadística se calculó a partir de datos no procesados, utilizando el test de Student.

(B) La inhibición de la endocitosis en CD mediante manano. La preincubación de CD con manano (1 mg/ml) fue seguida por la adición de dextrano-FITC (50 µg/ml) o amarillo de Lucifer (200 µg/ml) durante 2 horas.

Figura 2: La entrada sensible a la manosa del FVIII mediante CD provoca la presentación de péptidos derivados del FVIII a los linfocitos T + CD4 específicos del FVIII.

5 (A) Se incubaron CD generadas a partir de donantes sanos DRB1*1501/DRB5*01 (10000 células/pocillo) en un medio solo o en presencia de manano (1 mg/ml) o anti-CD206 IgG (10 µg/ml) seguida de la incubación con el clon D9E9 del linfocito T específico del FVIII (5000 células/pocillo) en presencia de dosis variables del FVIII (5,56; 2,78 ó 1,39 µg/ml) y 20 U/ml rhlL-2 durante 20 horas a 37 °C. Se evaluó la activación del linfocito T mediante la liberación de IFN-γ en el sobrenadante del cultivo. Los resultados son de un experimento representativo de 3 a 8 experimentos independientes.

10 Las producciones de IFN-γ variaron con las diferentes partidas de D9E9 y las diferentes fuentes de CD donantes utilizadas en experimentos por separado.

(B) Se preincubaron CD generadas a partir de donantes que encajan con MHC II con manano (1 mg/ml) o IgG anti-CD206 (10 µg/ml) seguidas de la adición del FVIII (5,56 µg/ml) o péptido I²¹⁴⁴-T²¹⁶¹ (del identificador de secuencia N°: 9) (2µg/ml) y D9E9. Para cada tratamiento, la producción de IFN-γ se representó en relación al valor máximo obtenido en cada experimento individual (*: P<0,0001, según la evaluación utilizando la prueba de Mann-Whitney). Los resultados son de 3 experimentos independientes.

15

(C) Las líneas celulares LE2E9 y BO2C11 B que encajan con HLA específicas del FVIII humano o las CD se incubaron en presencia del FVIII (10 µg/ml) y D9E9.

20 Figura 3: Los residuos de manosa esperados ubicados por fuera del dominio B tienen una función importante en la endocitosis del FVIII mediante CD que conducen a la activación de los linfocitos T.

(A) Las CD se preincubaron con manano (1, 5, 10, 100 y 1000 µg/ml) antes de la adición del FVIII (40 µg/ml 143 nM, círculos completos) y BDD-FVIII (24,31 µg/ml, 143 nM, círculos vacíos) o dextrano-FITC (50 µg/ml). Se analizó la asimilación de los antígenos mediante citometría de flujo. Se calculó el porcentaje de la inhibición para cada condición con respecto a la condición sin manano. Representativo de dos experimentos individuales.

25 (B) Se separó el BDD-FVIII nativo o tratado con EndoF1 (3,7 µg/ml) mediante SDS-PAGE al 7,5% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas transferidas se revelaron utilizando Protogold® o después de la incubación con 10 µg/ml de CTLD4-7-Fc utilizando una anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina. La cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CP) se identificaron a partir de la transferencia por adsorción con IgG anti FVIII monoclonales específicas de las CP y CL (no disponibles).

30 (C) Reducción de la activación de linfocitos T en el tratamiento con EndoF1 de BDD-FVIII. Los resultados representan un modelo de 3 experimentos independientes. Las producciones de IFN-γ variaron con las diferentes partidas de D9E9 y con las diferentes fuentes de CD humanas utilizadas en los diferentes experimentos. Para realizar una comparación estadística de los tres grupos de experimentos, se normalizó la producción de IFN-γ con respecto al valor máximo obtenido en cada experimento individual. Las diferencias en los niveles normalizados de la activación de linfocitos T fueron estadísticamente significativas entre "medio" y "tratadas con EndoF1", según la evaluación durante ANOVA y la prueba PSDL de Fisher (P<0,0001, datos no disponibles).

35

Figura 4: Activación de un clon de los linfocitos T específicos del FVIII (D9E9) mediante una cadena ligera del FVIII silvestre o mutante.

40 (A) y (B) Confirmación de una entrada de CD sensibles a la manosa de la cadena ligera silvestre del FVIII que conduce a la activación de linfocitos T. La cadena ligera purificada derivada del plasma del FVIII (CL silvestre) se trató con EndoF1. La CD silvestre, la cadena ligera silvestre en presencia del manano (1 mg/ml) y la cadena ligera silvestre tratada con EndoF1 se añadieron posteriormente a las CD (panel A) o a un clon de las células B específicas del FVIII (BO2C11, panel B) y cultivadas en forma conjunta con las células D9E9 durante 20 horas. Se evaluó la activación de D9E9 midiendo el IFN-γ en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA.

45 (C) y (D) Pérdida de activación de D9E9 a partir de la mutagénesis dirigida de la cadena ligera del FVIII. El clon de las células B BO2C11 B y las CD derivadas de monocitos se incubaron con D9E9 en presencia de la CL silvestre (panel C) o en presencia de la CL Asn2118Ala mutada (panel D). La sustitución de Asn2118 por un residuo de Ala extrae un sitio para la manosilación N. La activación de D9E9 se evaluó después de 20 horas midiendo el IFN-γ en el sobrenadante del cultivo.

50 Figura 5: Representación esquemática de la estructura completa del FVIII.

El FVIII humano heterodimérico completo (del identificador de secuencia N°: 2) está formado por 2.332 aminoácidos e incluye una "cadena pesada" que corresponde a los residuos 1 a 1.648 y que contiene los dominios A1-a1-A2-a2-B y una "cadena ligera" que corresponde a los residuos 1.649 a 2.332 y que contiene los dominios a3-A3-C1-C2 (la numeración de los residuos de los aminoácidos se refiere a la secuencia aminoacídica establecida en el identificador de

secuencia N°: 2). La molécula de FVIII contiene 25 secuencias de consenso (Asn–Xxx–Thr/Ser) que permiten la glicosilación ligada a N, 20 de las cuales han demostrado ser glicosiladas (1).

Figura 6: Secuencia aminoacídica del FVIII humano completo nativo (según lo establecido en el identificador de secuencia N°: 1)

5 La secuencia aminoacídica subrayada corresponde al péptido de señal que contiene los primeros 19 aminoácidos del FVIII humano completo nativo. La numeración clásica de los aminoácidos del FVIII humano heterodimérico completo (del identificador de secuencia N°: 2) se inicia con el residuo de alanina ubicado en la posición 20. Los residuos de aminoácidos en negrita corresponden a los sitios de glicosilación de consenso que se modifican preferentemente en una forma de realización de la presente invención.

10 El dominio B corresponde a la secuencia aminoacídica que va desde la posición 760 a la posición 1.667 de la secuencia aminoacídica establecida en el identificador de secuencia N°: 1 y presentada en la figura 6.

15 La cadena ligera nativa utilizada como control en el ejemplo 6 y a la que se hace referencia como “la cadena ligera derivada del plasma purificada del FVIII” corresponde a la secuencia aminoacídica que va desde la posición 1.668 a la posición 2.351 de la secuencia aminoacídica establecida en el identificador de secuencia N°: 1 y presentada en la figura 6.

La cadena pesada del FVIII humano nativo corresponde a la secuencia aminoacídica que va desde la posición 19 a la posición 759 de la secuencia aminoacídica establecida en el identificador de secuencia N°: 1 y presentada en la figura 6.

Figura 7: BDD (con el dominio B eliminado) – FVIII humano.

20 El dominio B del factor VIII demostró no ser imprescindible para la actividad procoagulante. La figura 7 muestra la secuencia aminoacídica y la secuencia nucleotídica correspondientes al FVIII humano con el dominio B eliminado obtenido cuando el dominio B se elimina del FVIII humano completo establecido en el identificador de secuencia N°: 2. La secuencia aminoacídica y la secuencia nucleotídica se unen para que cada aminoácido (en la parte superior) esté frente al codón de ácido nucleico correspondiente (en la parte inferior). La secuencia aminoacídica y la secuencia nucleotídica correspondientes al FVIII humano con BDD se numeran independientemente una de la otra (la numeración se presenta a la derecha de las secuencias). La secuencia aminoacídica del FVIII humano con BDD presentada en la figura 7 corresponde a la secuencia establecida en el identificador de secuencia N°: 4. La secuencia nucleotídica del FVIII humano con BDD presentada en la figura 7 corresponde a la secuencia establecida en el identificador de secuencia N°: 3. Los residuos de aminoácidos (o los correspondientes residuos de ácido nucleico) en negrita corresponden a los sitios de glicosilación de consenso que se modifican preferentemente en una forma de realización de la presente invención. El carácter “*” se coloca por encima del codón de terminación.

Figura 8: Cadena pesada del FVIII humano modificada por la sustitución de Asn con Ala en la posición 239 (con referencia a la secuencia del FVIII humano completo establecida en el identificador de secuencia N°: 2)

35 La figura 8 presenta la secuencia aminoacídica y la secuencia nucleotídica correspondientes a la cadena pesada modificada del FVIII humano implementada en una forma de realización particular de la presente invención. La secuencia aminoacídica y la secuencia nucleotídica se unen para que cada aminoácido (en la parte superior) esté frente al codón de ácido nucleico correspondiente (en la parte inferior). La secuencia aminoacídica y la secuencia nucleotídica correspondientes a la cadena pesada modificada del FVIII humano se numeran independientemente una de la otra (la numeración se presenta a la derecha de las secuencias). La secuencia aminoacídica de la cadena pesada modificada del FVIII humano presentada en la figura 8 corresponde a la secuencia establecida en el identificador de secuencia N°: 6. La secuencia nucleotídica de la cadena pesada modificada del FVIII humano presentada en la figura 8 corresponde a la secuencia establecida en el identificador de secuencia N°: 5. El residuo de aminoácidos (alanina) (o el correspondiente codón de ácido nucleico) en negrita corresponde al sitio de glicosilación (Asn 239) que se modificó en una forma de realización de la presente invención.

45 Figura 9: Cadena ligera del FVIII humano modificada por la sustitución de Asn con Ala en la posición 2118 (con referencia a la secuencia del FVIII humano completo establecida en el identificador de secuencia N°: 2)

La figura 9 presenta la secuencia aminoacídica y la secuencia nucleotídica correspondientes a la cadena ligera modificada del FVIII humano implementada en una forma de realización particular de la presente invención. La secuencia aminoacídica y la secuencia nucleotídica se unen para que cada aminoácido (en la parte superior) esté frente al codón de ácido nucleico correspondiente (en la parte inferior). La secuencia aminoacídica y la secuencia nucleotídica correspondientes a la cadena ligera modificada del FVIII humano se numeran independientemente una de la otra (la numeración se presenta a la derecha de las secuencias). La secuencia aminoacídica de la cadena ligera modificada del FVIII humano presentada en la figura 8 corresponde a la secuencia establecida en el identificador de secuencia N°: 8. La secuencia nucleotídica de la cadena ligera modificada del FVIII humano presentada en la figura 8 corresponde a la secuencia establecida en el identificador de secuencia N°: 7. El residuo de aminoácidos (alanina) (o el correspondiente codón de ácido nucleico) en negrita corresponde al sitio de glicosilación (Asn 2218) que se modificó en una forma de realización de la presente invención.

Figura 10: producción de IgG anti-FVIII en un ratón mediante una cadena ligera del FVIII silvestre o mutante.

La cadena ligera derivada del plasma purificada del FVIII humano (wtCL) y la CL mutada del FVIII (CL de Asn2118Ala) se inyectaron (0,2 µg de proteína en 200 µL de PBS) por vía intravenosa a ratones con deficiencia de FVIII cuatro veces en intervalos semanales. Una semana después de la cuarta inyección, se extrajo la sangre de los ratones y se analizaron los niveles de IgG anti FVIII utilizando un ELISA específico para FVIII. El suero de los ratones diluido 1 en 90 se incubó en una placa de ELISA revestida con FVIII humano. (Recombinante, Baxter) Se revelaron IgG unidas utilizando una IgG anti-murino acoplada con peroxidasa y su sustrato (OPD). Se midió la intensidad de la unión mediante densidad óptica a 492 nm con un espectrómetro (Tecan Genyos).

Figura 11: representación esquemática de tres tipos de estructura tipo glucanos terminadas con residuos de manosa

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "proteína del FVIII" se refiere a una molécula de aminoácido que comprende, al menos, un polipéptido del FVIII pero que no se limita a este polipéptido. Por lo tanto, el polipéptido del FVIII de la invención representa, al menos, aproximadamente el 50%, preferentemente el 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% del contenido de aminoácidos de la proteína del FVIII de la invención. Si la proporción del polipéptido del FVIII en la proteína del FVIII difiere un 100%, la proteína del FVIII puede contener cualquier secuencia aminoacídica, tal que la proteína del FVII debería considerarse como una proteína quimérica. Las secuencias aminoacídicas adicionales comprendidas en la proteína del FVIII se pueden ligar ya sea covalentemente o no covalentemente al polipéptido del FVIII y podrían corresponder u originarse desde cualquier polipéptido sintético o natural. Estas secuencias aminoacídicas adicionales podrían actuar como enzimas o proteínas activas, secuencias señal para el traslado, traslocación, exportación y secreción celular, o podrían funcionar como secuencias de reconocimiento para otras enzimas y/o proteínas de procesamiento.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "polipéptido del FVIII" se refiere a un polipéptido que tiene actividad de coagulación y similar perfil de activación de la trombina en comparación con el factor VIII humano completo del identificador de secuencia Nº 2 y tiene, al menos, aproximadamente 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad a las regiones 1-740 y 1689-2332 de la secuencia polipéptida representada por el identificador de secuencia Nº 2. En particular, se entiende que diversas mutaciones y cambios conservativos en los aminoácidos se pueden tolerar, así como determinados cambios no conservativos en los aminoácidos, siempre que el factor VIII variante tenga actividad de coagulación. También se permiten (y prefieren) fragmentos y determinadas glicosilaciones; es más, se permiten cambios en el polipéptido del factor VIII siempre que el polipéptido mantenga su actividad específica.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "polipéptido del FVIII" también se refiere a un polipéptido que tiene actividad de coagulación y similar perfil de activación de la trombina en comparación con el factor VIII humano completo del identificador de secuencia Nº 2 y tiene, al menos, aproximadamente 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad al factor VIII humano completo del identificador de secuencia Nº 2. En particular, se entiende que diversas mutaciones y cambios conservativos en los aminoácidos se pueden tolerar, así como determinados cambios no conservativos en los aminoácidos, siempre que el factor VIII variante tenga actividad de coagulación. También se permiten (y prefieren) fragmentos y determinadas glicosilaciones; es más, se permiten cambios en el polipéptido del factor VIII siempre que el polipéptido mantenga su actividad específica.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el "polipéptido del FVIII modificado", puede contener cualquier número de aminoácidos o alteraciones de aminoácidos en la región nativa, completa o no crítica de BDD-FVIII, incluyendo las sustituciones y/o inserciones y/o supresiones en cualquier otra región de la molécula del polipéptido, siempre que la variante del polipéptido incluya una secuencia que es, al menos, aproximadamente 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a, al menos, aproximadamente la secuencia polipéptida 1-740 y/o 1689-2332 del identificador de secuencia Nº 2 y la presencia de las modificaciones no impiden la actividad del FVIII variante.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "polipéptido del FVIII modificado" incluye las secuencias aminoacídicas con una homología en la secuencia de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 100% a la secuencia de referencia indicada; es decir, al factor VIII humano completo del identificador de secuencia Nº: 2.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "modificado" se refiere a las moléculas con algunas diferencias en sus secuencias aminoacídicas en comparación con un polipéptido de referencia (por ejemplo, secuencia del factor VIII completo). Las alteraciones de los aminoácidos pueden ser sustituciones, inserciones, supresiones o cualquier combinación deseada de dichos cambios en una secuencia aminoacídica nativa o completa. Las sustituciones pueden ser únicas, en las que sólo se sustituye un aminoácido en la molécula, o pueden ser múltiples, en las que se sustituyen dos o más aminoácidos en la misma molécula.

Para mejorar o alterar las características del polipéptido del FVIII de la presente invención, se debe emplear ingeniería de aminoácidos. La tecnología del ADN recombinante conocida por los expertos en la materia se puede utilizar para crear nuevos polipéptidos mutantes incluyendo únicas o múltiples sustituciones, supresiones o adiciones de

aminoácidos o proteínas de fusión. Dichos polipéptidos modificados pueden mostrar, por ejemplo, un aumento o disminución de la actividad o aumento o disminución de la estabilidad. Además, pueden ser purificados en producciones más altas y mostrar una mejor solubilidad que el correspondiente polipéptido natural, al menos en determinadas condiciones de purificación y almacenamiento.

5 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "polipéptido" incluye no sólo las moléculas de las proteínas completas sino también fragmentos de las mismas que, por sí mismas o con otros fragmentos, generan actividad procoagulante del FVIII en un ensayo de coagulación. Se apreciará que los polipéptidos sintéticos de las nuevas proteínas de la presente invención se encuentren también dentro del alcance de la invención y que se puedan fabricar según los procedimientos sintéticos estándar. También se apreciará que en el sistema de numeración de aminoácidos utilizado en este documento, el residuo del aminoácido 1 sea el primer residuo de la proteína del FVIII nativa y madura. Y asimismo se apreciará que el término "dominio" se refiera a las regiones aproximadas del FVIII, conocidas por los expertos en la materia.

15 Los símbolos de aminoácidos utilizados en la presente solicitud incluyen los siguientes: En toda la solicitud, se usan abreviaturas de una o tres letras para los aminoácidos. Estas abreviaturas se pueden utilizar indistintamente y tienen el siguiente significado: A o Ala=alanina; R o Arg=arginina; N o Asn=asparagina; D o Asp=ácido aspártico; C o Cys=cisteína; Q Gln=glutamina; E o Glu=ácido glutámico; G o Gly=glicina; H o His=histidina; I o Ile=isoleucina; L o Leu=leucina; K o Lys=lisina; M o Met=metionina; F o Phe=fenilalanina; P o Pro=prolina; S o Ser=serina; T o Thr=treonina; W o Trp=triptófano; Y o Tyr=tirosina y V o Val=valina.

20 Además, como se usa en la presente memoria descriptiva "la modificación del polipéptido del FVIII modificado" no está limitada al número o posición exacta indicados, siempre que se logre la misma función y resultado. Pocas posiciones de aminoácidos se pueden introducir, añadir o eliminar de los extremos terminales N o C o de cualquier otra parte del factor VIII humano completo, siempre que se mantenga la actividad funcional (como el corte de trombina) o las funciones procoagulantes. También incluidas en el alcance de la invención se encuentran las proteínas o fragmentos o derivados de las mismas que exhiben la misma o similar actividad biológica y derivados que se modifican en forma diferencial durante o después de la traducción. Es decir, mediante glicosilación, escisión proteolítica, ligamiento a una molécula de un anticuerpo u otro ligando celular y así sucesivamente.

25 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "fragmento" se refiere a una parte de un polipéptido, que mantiene las características utilizables y funcionales. Por ejemplo, como se usa en el contexto de la presente invención, el fragmento del polipéptido del factor VIII tiene la función de coagular la sangre.

30 Como se usa en la presente memoria descriptiva, una proteína con actividad procoagulantes del factor VIII es una proteína que causa la activación del factor X en sistemas de modelos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Como ejemplos no limitantes, esta definición incluye el factor VIII humano recombinante completo y factor VIII con el dominio B eliminado. Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos FVIII "activo al procoagulante" y "activo" se pueden usar indistintamente para hacer referencia a uno o más polipéptidos o proteínas que muestran actividad procoagulante en un ensayo de coagulación. El término FVIII se puede usar en la presente memoria descriptiva para incluir FVIIIa, y un experto en la materia apreciará del contexto en que se usan los términos a qué término (FVIII activado mediante pre-trombina FVIII o FVIII activado mediante trombina (FVIIIa)) se hace referencia.

35 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "estructura tipo glucano terminada con el polipéptido del FVIII desglicosilado con residuos de manosa" se refiere a un polipéptido del FVIII o un polipéptido del FVIII modificado sin una o más estructura tipo glucanos terminadas con residuos de manosa.

40 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "estructura tipo glucano terminada en residuos de manosa" se refiere a una estructura tipo glucano de un sitio de la glicosilación terminada con uno o más residuos de manosa lejos de la columna vertebral del polipéptido. Dicho residuo de manosa se denomina residuo de manosa terminal. El término "estructura tipo glucano terminada en residuos de manosa" incluye una estructura tipo glucano mono y multi-antenaria con uno o más residuos de manosa lejos de la columna vertebral del polipéptido, más particularmente el término "estructura tipo glucano terminada en residuos de manosa" incluye la estructura tipo glucano de tipo oligomanosa (figura 11).

45 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "residuo de manosa terminal" se refiere a un residuo de manosa lejos de la columna vertebral del polipéptido que termina una antena de una estructura tipo glucano en un sitio de la glicosilación (figura 11).

50 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "capaz de hibridar en condiciones muy restrictivas" significa fijar una cadena de ADN complementario al ADN de interés en condiciones muy restrictivas. Del mismo modo, "capaz de hibridar en condiciones poco restrictivas" se refiere a fijar una cadena de ADN complementario al ADN de interés en condiciones poco restrictivas. "Condiciones restrictivas" para el proceso de fijado puede significar, por ejemplo, alta temperatura y/o bajo contenido de sal, que no favorece los contactos de puentes de hidrógeno entre los pares de bases mal apareadas. "Condiciones poco restrictivas" podría significar temperaturas más bajas y/o mayor concentración de sal que la de las condiciones muy restrictivas. Estas condiciones permiten que dos cadenas de ADN se fijen si hay total complementariedad sustancial aunque no cercana entre las dos cadenas, como es el caso entre las cadenas de ADN

que codifican la misma proteína pero difieren en la secuencia debido a la degeneración del código genético. Las condiciones restrictivas apropiadas que promueven la hibridación del ADN, por ejemplo, 6*SSC a aproximadamente 45[deg.] C., seguida de un lavado de 2*SSC a 50[deg.] C. son conocidas por los expertos en la materia o se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.31–6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar entre una condición restrictiva baja de aproximadamente 2*SSC a 50[deg.] C. y una condición restrictiva alta de aproximadamente 0,2*SSC a 50[deg.] C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentar de una condición restrictiva baja a temperatura ambiente, aproximadamente 22[deg.] C., a condiciones restrictivas altas, a aproximadamente 75[deg.] C. Otros parámetros restrictivos se describen en Maniatis, T., y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring N.Y., (1982), en las páginas. 387–389; consulte también Sambrook J. y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Volume 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, N.Y. en las páginas 8.46–8.47 (1989).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “vehículos” incluyen vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizadores no tóxicos para la célula o mamífero expuestos en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa amortiguadora de pH. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitaciones, soluciones amortiguadoras como fosfato, citrato y demás ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; peso molecular bajo (menos de aproximadamente 10 residuos) polipéptido; proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y demás hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes de quelación como EDTA; alcoholes de azúcar como manitol o sorbitol; contraiones que forman sales como por ejemplo sodio y/o tensioactivos no iónicos como por ejemplo TWEEN(R), polietilenglicol (PEG) y PLURONICS(R).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “cantidad eficaz” es la cantidad suficiente para obtener resultados clínicos o bioquímicos beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz se puede administrar una o más veces. Para los propósitos de esta invención, una cantidad eficaz de un compuesto inhibidor es una cantidad que es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir o retrasar la progresión de la enfermedad. En una realización preferente de la invención, la “cantidad eficaz” se define como una cantidad de compuesto capaz de efectuar la coagulación de la sangre.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “células huésped” incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido receptora de un vector de esta invención. Las células huésped incluyen la progenie de una célula huésped única. La progenie no necesariamente deber ser completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN total) a la célula parenteral original debido a una mutación y/o cambio natural, accidental o deliberado. Una célula huésped incluye las células transfectadas o infectadas *in vivo* o *ex vivo* con un vector que comprende un polinucleótido que codifica un factor angiogénico.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “purificadas” o “aisladas” se refiere a las moléculas biológicas que se extraen de su entorno natural y se aíslan o separan y no están unidas a ningún componente con el que naturalmente están asociadas.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, no peor) de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación de la enfermedad y remisión (parcial o total), si se detecta o no. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento alguno. El “tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como las medidas profilácticas o preventivas. Entre las personas que necesitan tratamiento se incluyen aquéllas que ya tienen la enfermedad así como las que deben tomar medidas para prevenirla. “Paliar” una enfermedad significa que el alcance y/o manifestaciones clínicas no deseadas de la enfermedad disminuyen y/o el transcurso del tiempo de la progresión es más lento o va creciendo, en comparación con una situación sin tratamiento.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “vector”, “vector polinucleótido”, “construcción” y “construcción polinucleótida” se usan indistintamente en este documento. Un vector polinucleótido de esta invención puede ser tener numerosas formas, incluyendo, pero sin limitarse a, ARN, ADN, ARN encapsulado en un recubrimiento retroviral, ADN encapsulado en un recubrimiento de adenovirus, ADN dentro de otra forma vírica o similar (como herpes simple y adenovirus asociado (AAV)), ADN encapsulado en liposomas, ADN complejo con polilisina, complejo con moléculas policatiónicas sintéticas, complejo con compuestos como polietilenglicol (PEG) hasta “enmascarar” inmunológicamente la molécula y/o aumentar su semivida o conjugado a una proteína no vírica. Preferentemente, el polinucleótido es el ADN.

En la elección de una célula hospedadora preferente para la transfección con los vectores de la invención que comprenda secuencias de ADN que codifican ambos derivados del FVIII y, por ejemplo, la proteína dihidrofolato-reductasa (DHFR), es apropiado seleccionar el huésped según el tipo de proteína DHFR empleado. Si se emplea una

proteína DHFR silvestre, es preferible seleccionar una célula hospedadora que sea deficiente en DHFR, permitiendo así el uso de la secuencia que codifica la DHFR como un marcador para una correcta transfección en un medio selectivo que carece de hipoxantina, glicina y timidina. Por otro lado, si se usa una proteína DHFR con una afinidad de unión baja al metotrexato (MTX) como la secuencia reguladora, no es necesario usar células resistentes al DHFR. El mutante DHFR es resistente al MTX; por lo tanto, se pueden usar medios con MTX como un medio de selección, siempre que las células hospedadoras sean sensibles al MTX. Alternativamente, se puede utilizar un gen de DHFR silvestre como marcador de amplificación en una célula huésped que no es deficiente en DHFR siempre que se utilice un segundo marcador de selección del fármaco, como resistencia a la higromicina. Los ejemplos enumerados describen el uso de células CHO (células CHO–DBX11) resistentes al MTX como células huésped y sobre vectores que emplean el promotor CMV y SV40 como secuencias reguladoras para conducir el “on” de los derivados del FVIII y DHFR, respectivamente. Otros marcadores de selección incluyen genes que dan resistencia a los fármacos, como neomicina, higromicina y metotrexato.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “ADN” incluye no sólo las bases A, T, C y G sino que incluye sus análogos o formas modificadas de estas bases, como nucleótidos metilados, modificaciones entre nucleótidos como ligamientos no cargados y tioatos, uso de análogos de azúcar y estructuras de la columna vertebral modificadas y/o alternativas, como poliamidas.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que se hibrida en condiciones restrictivas de hibridación a una porción de una molécula de ácido nucleico de la invención descrita anteriormente. Los polinucleótidos de hibridación son útiles como sondas y cebadores, como se analiza anteriormente. Porciones de un polinucleótido que se hibrida a un polipéptido del FVIII que codifica una secuencia, que puede estar claramente especificada por las posiciones de base de 5' y 3' o por diámetro en las bases de los nucleótidos como se describe anteriormente o claramente excluidos de la misma manera. Del mismo modo, las porciones de un polinucleótido que se hibridan al polipéptido del FVIII, que también se pueden utilizar como sondas y cebadores. Los polinucleótidos de hibridación preferentes de la presente invención son aquéllos que, cuando se etiquetan y utilizan en un ensayo de hibridación conocido en la técnica (por ejemplo, análisis de transferencia Northern y Southern), muestran la mayor concentración de señales independientemente de las demás secuencias heterólogas presentes en cantidades equimolares.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, las secuencias nucleotídicas modificadas incluyen aquéllas producidas por sustituciones, supresiones o adiciones de nucleótidos. Las sustituciones, supresiones o adiciones pueden incluir uno o más nucleótidos. Las alteraciones en la secuencia aminoacídica pueden producir sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos conservativas o no conservativas. Especialmente preferentes entre éstas se encuentran las sustituciones, adiciones y supresiones imperceptibles que no alteran las propiedades y actividades de los polipéptidos de la presente invención o porciones de los mismos. También preferentes en este aspecto son las sustituciones conservativas.

La invención permite el uso de secuencias en vectores de expresión así como la transfección de células huésped y líneas celulares, ya sean células procariotas o eucariotas. La invención también permite la purificación de los polipéptidos expresados a partir del vector de expresión. El vector de expresión puede contener diversas marcas moleculares para una fácil purificación. La construcción de la expresión obtenida posteriormente se puede transformar en cualquier célula huésped de elección. Los lisados celulares a partir de las células huésped se aíslan mediante procedimientos conocidos en la técnica.

En una forma de realización específica, los ácidos nucleicos que comprenden las secuencias que codifican la proteína del FVIII o el polipéptido del factor VIII modificado se administran para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con una expresión aberrante y/o actividad de un polipéptido de la invención, mediante una terapia génica. Una terapia génica se refiere a una terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta forma de realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su proteína codificada que media un efecto terapéutico.

Cualquiera de los procedimientos para la terapia génica disponibles se pueden utilizar según la presente invención. En un aspecto preferente, las secuencias nucleotídicas pueden codificar un polipéptido del factor VIII, en el que las secuencias nucleotídicas son parte de los vectores de expresión que expresan los polipéptidos en un huésped adecuado. En particular, dichas secuencias nucleotídicas tienen promotores enlazados operativamente al polipéptido que codifica la región. Dicho promotor es inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico del tejido. En otra forma de realización particular, las moléculas de ácido nucleico se usan en las que el polipéptido que codifica las secuencias y cualquier secuencia deseada son flanqueadas por las regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, de este modo proporcionando la expresión entre cromosomas de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo. La administración de ácidos nucleicos a un paciente puede ser directa, en cuyo caso el paciente está directamente expuesto al ácido nucleico o a los vectores que transportan el ácido nucleico o indirecta, en cuyo caso las células primero se transforman con los ácidos nucleicos *in vitro* y luego se trasplantan al paciente. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En una forma de realización específica, las secuencias nucleotídicas se administran directamente *in vivo*, donde se expresan para producir el producto codificado. Esto se puede lograr mediante numerosos procedimientos conocidos en la técnica; por ejemplo, mediante su construcción como parte del correspondiente vector de expresión del ácido nucleico y mediante su administración para que se conviertan en intracelulares; por ejemplo, mediante la infección de retrovirales defectuosos o atenuados o demás vectores víricos o mediante la inyección directa del ADN desnudo o mediante el recubrimiento con lípidos o receptores en la superficie celular o agentes de transfección, encapsidación en liposomas, micropartículas o microcápsulas o mediante su administración en ligamiento a un péptido que se introduce en el núcleo, mediante su administración en ligamiento a un ligando sujeto a una endocitosis mediada por el receptor (que se puede utilizar para determinar la diana de los tipos de células que expresan específicamente los receptores) y así sucesivamente.

Alternativamente, el ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporar en el ADN de la célula huésped para la expresión, mediante recombinación homóloga. En una forma de realización específica, se utilizan los vectores víricos que contienen secuencias nucleotídicas que codifican el polipéptido. Las secuencias nucleotídicas que codifican el polipéptido a utilizarse en la terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita la administración del gen al paciente. Los vectores retrovirales, vectores adenovirus y adenovirus asociados son ejemplos de vectores víricos que se pueden utilizar. Los vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el adecuado empaque del genoma vírico e integración en el ADN de la célula huésped.

Otro enfoque a la terapia génica implica la transferencia de un gen a las células del cultivo de tejidos mediante procedimientos como la electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección viral. Por lo general, el procedimiento para la transferencia incluye la transferencia de un marcador de selección a las células. Las células se colocan luego en selección para aislar aquellas células que se han asimilado y expresan el gen transferido. Dichas células se administran luego al paciente. En esta forma de realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción se puede realizar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, la transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector bacteriófago o vírico que contiene las secuencias nucleotídicas, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Existen numerosas técnicas conocidas para la introducción de genes extraños en las células y que se pueden utilizar según la presente invención, siempre que no se interrumpan las funciones de fisiología y de desarrollo necesarias de las células receptoras. La técnica debería proporcionar una transferencia estable del ácido nucleico a la célula para que el ácido nucleico se pueda expresar mediante la célula y, preferentemente, se pueda heredar y expresar mediante la progenie celular.

Las células a las que se les puede introducir un ácido nucleico para los propósitos de la terapia génica incluyen todo tipo de células deseadas, disponibles e incluye, sin limitarse a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas como por ejemplo linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas; por ejemplo, las obtenidas a partir de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, resto de hígado, etc.

En una forma de realización, la presente invención se refiere al tratamiento para las enfermedades de coagulación de la sangre. De esta manera, el compuesto terapéutico de la invención se puede administrar a pacientes humanos que padecen o son propensos a padecer la enfermedad suministrando compuestos que estimulan la coagulación de la sangre. En particular, la enfermedad puede ser hemofilia, en particular, hemofilia A. la formulación de los compuestos terapéuticos es generalmente conocida en la técnica y se puede hacer referencia a Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., EE. UU.

Se puede ajustar el régimen de dosificación para proporcionar una respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar numerosas dosis divididas diariamente o la dosis se puede reducir proporcionalmente según las exigencias de la situación terapéutica. El compuesto activo se puede administrar de una manera conveniente como por ejemplo por vía oral, intravenosa (soluble en agua), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o como supositorio o mediante el implante (por ejemplo, usando moléculas de liberación lenta por vía intraperitoneal o usando células como monocitos o células dendríticas sensibilizadas *in vitro* y transferidas al receptor). Dependiendo de la vía de administración, la proteína del FVIII o el polipéptido del FVIII modificado pueden necesitarse para su revestimiento en un material que lo proteja de la acción de las enzimas, ácidos y demás condiciones naturales que pueden inactivar dichos ingredientes.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de las soluciones inyectables estériles o dispersión. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida al punto de su fácil aplicación en la jeringa. Debe estar estable en condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse de la acción contaminante de los microorganismos como por ejemplo bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, etc.), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Se puede mantener una adecuada fluidez, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como por ejemplo lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de

5 dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos la puede ocasionar diversos agentes antibacterianos y antifúngicos; por ejemplo, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tiomersal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos; por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La prolongada absorción de composiciones inyectables puede estar ocasionada por el uso en la composición de agentes que retrasan la absorción; por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los procedimientos preferentes para la preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada y estéril del mismo.

10 Si los péptidos están adecuadamente protegidos como se describe anteriormente, el compuesto activo se puede administrar por vía oral; por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable o se puede encerrar en una cápsula de gelatina blanda o dura o se puede comprimir en comprimidos o se pueden incorporar directamente con la comida de la dieta. Para la administración terapéutica por vía oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares.

15 Los comprimidos, píldoras, cápsulas y similares pueden también contener lo siguiente: Un aglutinante como goma adragante o arábica, almidón de maíz o gelatina, excipientes como fosfato bicálcico; un desintegrador como almidón de maíz, fécula de patata, ácido algínico y similares; un lubricante como estearato de magnesio y un edulcorante como sacarosa, lactosa o sacarina pueden añadirse o un aromatizante como menta negra, aceite de la gaulteria o aromatizante de cereza. Si la forma de la unidad de dosificación es una cápsula, puede contener además materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o, de otro modo, para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas se pueden recubrir con goma laca, azúcar o ambas. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como edulcorante, metil y propilparabeno como conservantes, un tinte y aromatizantes como aroma a cereza o naranja. Por supuesto, todo material utilizado en la preparación de la forma de la unidad de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede estar incorporado en las preparaciones y formulaciones de liberación controlada.

20 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier disolvente, medio dispersante, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes isotónicos y dilatorios de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para los principios activos farmacéuticos es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que los medios o agentes convencionales no son compatibles con el ingrediente activo, se permite el uso del mismo en composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

25 Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en la forma de la unidad de dosificación para la comodidad de la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de la unidad de dosificación como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a las unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos mamíferos que se deban tratar; cada unidad con una cantidad predeterminada de material activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico necesario. La especificación de las formas de las unidades de dosificación de la invención están dictadas por y directamente dependientes de (a) las características únicas del material activo y el particular efecto terapéutico que se debe alcanzar y (b) las limitaciones propias de la preparación magistral de dicho material activo para el tratamiento de la enfermedad en sujetos vivos con una condición en las que su salud física se puede ver afectada.

El principal ingrediente activo se prepara para una administración eficaz y práctica en cantidades eficaces con un adecuado vehículo farmacéuticamente aceptable en la forma de la unidad de dosificación.

30 Se dice que una composición es "farmacológica o fisiológicamente aceptable" si un animal receptor puede tolerar su administración y si es adecuada para la administración en ese animal. Se dice que dicho agente se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente importante. Un agente es fisiológicamente importante si su presencia provoca un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor.

35 En una forma de realización particular, el cultivo celular de mamíferos es un procedimiento de expresar ADN exógeno para producir los derivados del FVIII humano funcional presentados en esta invención. En particular, las células de mamíferos comunes utilizadas para la producción de proteínas recombinantes, como por ejemplo líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), líneas celulares de riñón de hámster bebé (BHKC), líneas celulares COS, HKB11 (híbrido de las células de riñón y B; ATCC # CRL-12568), COS-1 (ATCC CRL 1650) y línea celular de riñón canino Madin Darby (MDCK) son de interés especial. Los vectores de expresión para tales células incluyen normalmente (si fuera necesario) un origen de replicación, un promotor localizado delante del gen que se va a expresar, junto con cualquier sitio de unión a ribosomas necesario, sitios de ajuste del ARN, sitio de poliadenilación y secuencias de terminación de la transcripción.

40 Para usar en células de mamífero, las funciones reguladoras de los vectores de expresión se pueden suministrar en material vírico. Por ejemplo, los promotores comúnmente utilizados derivan del factor 1 de elongación (EF-1), virus

simio 40 (SV40) (15), citomegalovirus (CMV) (16) y promotor tardío principal del adenovirus 2 (17). Además, también es posible, y a menudo deseable, usar promotores o secuencias reguladoras asociadas normalmente con la secuencia del gen deseado, siempre que las secuencias reguladoras sean compatibles con los sistemas de la célula hospedadora.

Los promotores celulares incluyen el promotor del gen kappa de ratón (18), el promotor de V_H del ratón (19) y el promotor de la metalotioneína-I del ratón (20). Los vectores de expresión también pueden contener un conjunto de zonas de unión exón-intrón de ARN ubicadas río abajo a partir del promotor y río arriba a partir del sitio de inserción para la secuencia del FVIII. Las zonas de unión exón-intrón preferentes del ARN se pueden obtener a partir de adenovirus y/o genes de inmunoglobulina. Los vectores de expresión también pueden contener un conjunto de zonas de unión exón-intrón de ARN ubicadas en la secuencia del FVIII del ADNc. También en los vectores de expresión se encuentra una señal de poliadenilación ubicada río abajo del sitio de inserción. Las señales de poliadenilación particularmente preferentes incluyen la señal de poliadenilación temprana o tardía a partir de SV40 (Kaufman y Sharp, *ibid.*), la señal de poliadenilación a partir de la región 5' Elb del adenovirus o terminador del gen de la hormona del crecimiento humano (21). Los vectores de expresión también pueden incluir una secuencia guía vírica no codificante, como por ejemplo el líder tripartito 2 del adenovirus ubicado entre el promotor y los sitios de empalme del ARN y las secuencias del intensificador como el intensificador SV40.

El FVIII modificado producido según la presente invención se puede purificar mediante cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpos anti FVIII. Se puede lograr una purificación adicional mediante medios de purificación química convencionales como por ejemplo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Otros procedimientos de purificación, incluyendo la precipitación de citrato de bario, son conocidos en la técnica y se puede aplicar a la purificación del nuevo FVIII modificado. El FVIII modificado sustancialmente puro puede tener usos farmacéuticos. Una vez que se purifica, parcialmente o hasta su homogeneidad según se desee, el FVIII modificado puede tener un uso terapéutico.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el péptido I²¹⁴⁴-T²¹⁶¹ es un péptido sintético de identificador de secuencia N° 9. Este péptido no es manosilado, así, el manano no tiene efecto sobre la endocitosis mediada por un receptor por las células presentadoras de antígenos (CPA), como células dendríticas (CD).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, las células D9E9 son clones de células humanas CD4⁺ T específicas del FVIII desarrolladas por Marc Jacquemin (Ref Jacquemin Blood 2003). Estas células producen IFN- γ cuando se las incuba con las células presentadoras de antígenos que han previamente endocitado el FVIII o el péptido derivado del FVIII I2144-T2161.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, las células LE2E9 son clones de células humanas B específicas del FVIII desarrolladas por Marc Jacquemin (Ref Peerlinck Blood 1999). Estas células producen una IgG4 humana específica del FVIII que reconoce el dominio C1 del FVIII.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, las células BO2C11 son clones de células humanas B específicas del FVIII desarrolladas por Marc Jacquemin (Ref Jacquemin Blood 1998). Estas células producen una IgG4 humana específica del FVIII que reconoce el dominio C2 del FVIII.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la molécula CTLD4-7Fc es una construcción quimérica que incluye los dominios 4 a 7 del receptor de manosa en macrófagos murinos (CD206). La molécula CTLD4-7Fc fue producida por Luisa Martínez-Pomares (Linehan 2001 Eur J Immunol).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, las células dendríticas (CD) son células que presentan antígenos profesionales que se caracterizan por una variedad de marcadores de superficie específicos (CD1a, CD11c, HLA-DR, CD80, CD86, CD83, CD40, etc.) y funciones (endocitosis de antígenos, presentación de antígenos para los linfocitos T).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el anticuerpo anti CD206 PAM-1 es un anticuerpo específicamente dirigido contra el receptor de manosa en macrófagos humanos (CD206). Fue producido por P. Allavena (Laboratorio de inmunología celular, Instituto Mario Negri, Milan, Italia).

La siguiente secuencia corresponde a la secuencia aminoacídica del identificador de secuencia N°: 1, es decir, a la secuencia aminoacídica del factor VIII humano completo nativo que comprende el péptido de señal de 19 aminoácidos:

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFNFNTSVVYKKTFLVEFTDHLFNIA
KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQV
LKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDR
DAASARAWPKMHTVNGYV**NRS**LPLGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLM
DLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPK
TWVHYIAAEEDWDYAPLVLPDDRYSKSYQLNNGPQIRGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDT
LLIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFFVNMERD
LASGLIGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDS
LQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTA
LLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTMPKIQNV

SSDDLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSMDMVFTEPESGLQLRLNEKLGT
 TAATELKKLDKFSVSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDITLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDK
 LLESGLMNSQESSWGKNVSTESGRLFKGKRAHGPAALLTKDNALFKVISLTKNKTNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPS
 5 VWQNILESDETFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQKKEGPIPPDAQNPDMSSFFKMLFLPESA
 RWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVGQNFLESEKNKVVVGKEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTLNLDNLHEN
 NTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLSTRQNVESYDYGAYAPVLQDFRSLNDSTNRKTKHTA
 HFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHL
 TPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPPLIAKVSSFPISIRPIYLTRVLQDNSSHLPAASYRKKDQSGVQE
 10 SSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSKGVKELLPKVHIYQKDLFPTETS
 NGSPGHLDLVEGSLQGTGEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWSQEKSPKT
 AFKKKDTILSLNACESNHAIAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVLRKHQREITRTLQSDQEEIDYDDTISVEM
 KKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRQAQSGSVQFKKVVQFEFTDGSFTQPLYRGE
 LNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLIYEEDQRGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFD
 CKAWAYFSDVDLEKDVHSLGVLIGLPLVCHTNTLNPAGHRQVTFIDETKSWYFTENMERNCRAPCNQIEMEDPT
 15 FKENYRFHAINGYIMDTLPLGLVMAQDQIRRWYLLSMGNSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP
 KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWI
 KVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGN**ST**GTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTH
 YSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD
 20 FQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQS
 VVHQIALRMEVLGCEAQDLY

La siguiente secuencia corresponde a la secuencia aminoacídica del identificador de secuencia N°: 2, es decir, a la secuencia aminoacídica del factor VIII humano completo que no comprende el péptido de señal de 19 aminoácidos:

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPVRPKSFPFNTSVVYKKTLEFVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEV
 YDVTITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSY
 25 LSHVDLVKDLNGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYV
NRSLPLGLIGCHRSVYVWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLMDLGQFLLFCHISSHQHDGM
 EAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDEMDVVRFDDDNPSFQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV
 LAPDDRSYKSYQLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDITLIIFKNQASRPYNIYPHGIT
 30 DVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLICYKESVDQR
 GNQIMSDKRNVLFSVFENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIG
 AQTDFLSVFFSGYTFKHKMVEDTLTLPFSGETVFMSENPLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDDYEDS
 YEDISAYLLSKNNAIEPRFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDIWFHRTMPKIQNVSSDDLMLLRQSPTPHGL
 35 SLSDLQEAKEYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSMDMVFTEPESGLQLRLNEKLGTATAATELKKLDKFSVSTSN
 NLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDITLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDKLLLESGLMNSQESSWGKN
 VSSTESGRLFKGKRAHGPAALLTKDNALFKVISLTKNKTNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDETFKKVTPLI
 HDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQKKEGPIPPDAQNPDMSSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQ
 PSPKQLVSLGPEKSVGQNFLESEKNKVVVGKEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTLNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKET
 40 LIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLSTRQNVESYDYGAYAPVLQDFRSLNDSTNRKTKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQ
 TKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAI
 TQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPPLIAKVSSFPISIRPIYLTRVLQDNSSHLPAASYRKKDQSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAI
 LTLEMTGDQREVGLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSKGVKELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLQ
 45 GTGEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWSQEKSPKTAFKKKDTILSLNACESN
 HAIAIAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVLRKHQREITRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSP
 RSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRQAQSGSVQFKKVVQFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEV
 EDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLIYEEDQRGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEK
 50 DVHSLGILPLVCHTNTLNPAGHRQVTVQEFALFTIFDETKEYFTENMERNCRAPCNQIEMEDPTFKENYRFHAINGYIM
 DTLPLGLVMAQDQIRRWYLLSMGNSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHL
 HAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQ
 GARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGN**ST**GTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMG
 55 DLNNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ
 VKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCE
 AQDLY

La siguiente secuencia corresponde a la secuencia nucleotídica del identificador de secuencia N°: 3; es decir, a la secuencia nucleotídica que codifica el factor VIII BDD humano.

GCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAAGTGCATGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCTG
 TGGACGCAAGATTTCTCCTAGAGTGCCAAAATCTTTTCATT**CAACACCTCAG**TCGTGTACAAAAAGACTCTGTTTG
 TAGAATTCACGGTTCACCTTTTCAACATCGCTAAGCCAAGGCCACCTGGATGGGTCTGCTAGGTCCTACCATCCAG
 GCTGAGGTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCTTCCCATCCTGTCAGTCTTCATGCTGTTGGTGTA
 TCCTACTGGAAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAGAAGATGATAAAGTCTT
 60 CCCTGGTGGAAGCCATACATATGTCTGGCAGGTCCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTT
 ACCTACTCATATCTTTCTCATGTGGACCTGGTAAAGACTTGAATTCAGGCCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGA
 GAAGGGAGTCTGGCCAAGGAAAAGACACAGACCTTGACAAATTTATACTACTTTTTGCTGTATTGTATGAAGGAA

AAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCCTTGATGCAGGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGCCTGGCCTAAATG
 CACACAGTCAATGGTTATGTA**AACAGGTCT**CTGCCAGGTCTGATTGGATGCCACAGGAAATCAGTCTATTGGCATGT
 GATTGGAATGGGCACCACTCCTGAAGTGCCTCAATATTCTCGAAGGTCACACATTTCTTGAGGAACCATCGCC
 5 AGGCGTCCTTGAAATCTCGCCAATAACTTTCTTACTGCTCAAACACTCTTGATGGACCTTGACAGTTTCTACTGT
 TTTGTCATATCTCTTCCCAACATGATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTGTCCAGAGGAACCCCAA
 CTACGAATGAAAAATAATGAAGAAGCGGAAGACTATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTT
 GATGATGACAACTCTCCTTCTTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGAAGCATCCTAAAACTTGGGTACATTACATT
 GCTGCTGAAGAGGAGGACTGGGACTATGCTCCCTTAGTCTCGCCCCGATGACAGAAGTTATAAAAGTCAATATTT
 10 GAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAAAAAGTCCGATTTATGGCATACACAGATGAAACCTTTAAGA
 CTCGTGAAGCTATTTCAGCATGAATCAGGAATCTTGGGACCTTTACTTTATGGGGAAGTTGGAGACACACTGTTGATT
 ATATTTAAGAATCAAGCAAGCAGACCATATAACATCTACCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCCTTTGATTCAAGG
 AGATTACCAAAAGGTGTAAACATTTGAAGGATTTTCCAATTCTGCCAGGAGAAATATTCAAATATAAATGGACAGTG
 ACTGTAGAAGATGGGCCAACTAAATCAGATCTCGGTGCCTGACCCGCTATTACTCTAGTTTCGTTAATATGGAGAG
 15 AGATGACTTACAGGACTTGGCCCTCTCCTCTCTCTGCTACAGAAATCTGTAGATCAAAAGAGGAAACAGATAA
 TGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTTTTCTGATTTTGTAGAAACCGAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATACAA
 CGCTTTCTCCCAATCCAGCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCAGAGTTCCAAGCCTCCAACATCATGCACAGCATCA
 ATGGCTATGTTTTGATAGTTTGCAGTTGTCAGTTTGTTCATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAG
 CACAGACTGACTTCCTTTCTGTCTTCTCTGATATACCTTCAAACACAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCC
 20 TATTCCCATTCTCAGGAGAACTGTCTTCATGTCGATGGAAAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGGTGGCACAACCTCA
 GACTTTCGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGGTTTCTAGTTGTGACAAGAACTGGTGATTATTACGAGGA
 CAGTTATGAAGATATTTGACATACTTGTCTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCAAGAGAAATACTCGTACTACTT
 TCAGTCAGATCAAGAGGAAATTGACTATGATGATACCATATCAGTTGAAATGAAGAAGGAAGATTTTGACATTTATGA
 TGAGGATGAAATCAGAGCCCCCGCAGCTTTCAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGCTGCAGTGGAGAGGCTCT
 25 GGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCCACATGTTCTAAGAAACAGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAA
 AGTTGTTTTCCAGGAATTTACTGATGGCTCCTTTACTCAGCCCTTATACCGTGGAGAACTAAATGAACATTTGGGACT
 CCTGGGGCCATATATAAGAGCAGAAGTTGAAGATAATATCATGGTAACCTTTCAGAAATCAGGCCTCTCGTCCCTATT
 CCTTCTATTCTAGCCTTATTTCTTATGAGGAAGATCAGAGGCAAGGAGCAGAACCTAGAAAAAATTTGTCAAGCCT**A**
ATGA**AACCA**AACTTACTTTTGGAAAGTCAACATCATATGGCACCCACTAAAGATGAGTTTGACTGCAAAGCCTGG
 30 GCTTATTTCTCTGATGTTGACCTGGAAAAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCCCTTCTGGTCTGCCACACTAA
 CACACTGAACCCTGCTCATGGGAGACAAGTGACAGTACAGGAATTTGCTCTGTTTTTACCATCTTTGATGAGACCA
 AAAGCTGGTACTTCACTGAAATATGAAAGAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATGGAAGATCCCCTTTT
 AAAGAGAATTATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTACATAATGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAA
 AGGATTCGATGGTATCTGCTCAGCATGGGCAGCAATGAAAACATCCATTCTATTCTTTTCACTGGACATGTGTTCACT
 35 GTACGAAAAAAGAGGAGTATAAATGGCACTGTACAATCTCTATCCAGGTGTTTTTGGAGACAGTGGAAATGTTACCA
 TCCAAAGCTGGAATTTGGCGGGTGAATGCCTTATTGGCAGCATCTACATGCTGGGATGAGCAGACTTTTTCTGGT
 GTACAGCAATAAGTGAAGTCCCTGGGAGGCTTCTGGACACATAGAGATTTTTCAGATTATCAGTTCTCAGGAC
 AATATGGACAGTGGGCCCCAAAGCTGGCCAGACTTCATTATCCGGATCAATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCC
 CTTTTCTTGGATCAAGGTGGATCTGTTGGCACCAATGATTATTCACGGCATCAAGACCCAGGGTGGCCGTCAGAAGT
 40 TCTCCAGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATCATGTATAGTCTTGATGGGAAGAAGTGGCAGACTTATCGAGGA**AATT**
CCACTGGAACCTTAATGGTCTTCTTTGGCAATGTGGATTCTGTTGATAAAACACAATATTTTAAACCTCCAATTAT
 TGCTCGATACATCCGTTTGCACCAACTCATTATAGCATTTCGACAGCACTTTCGCATGGAGTTGATGGGCTGTGATT
 TAAATAGTTGCAGCATGCCATTGGGAATGGAGAGTAAGCAATATCAGATGCACAGATTACTGCTTCATCCTACTTTA
 CCAATATGTTTGGCACCTGGTCTCCTTCAAAGCTCGACTTCACTCCAAGGGAGGAGTAAATGCCTGGAGACCTCAG
 45 GTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCACAGGAGTAATACTCAGGGAG
 TAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTC
 TTTTTTCAAGATGGCAAAGTAAAGTTTTTTCAGGGAAATCAAGACTCCTTACACCTGTGGTGAAGTCTCTAGACCCA
 CCGTTACTGACTCGCTACCTTCGAATTCACCCCCAGAGTTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTTCTGG
 GCTGCGAGGCACAGGACCTCTACTGA

50 La siguiente secuencia corresponde a la secuencia aminoacídica del identificador de secuencia Nº: 4; es decir, a la
 secuencia aminoacídica del factor VIII BDD humano:

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPVRPKSFP**NTS**VVYKKTLFVEFTVHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEV
 YDVTITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAAYDDQTSQREKEDDKVPFGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSY
 LSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNLSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYV
 55 **NRS**LPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLMLDLGQFLLFCHISSHQHDGM
 EAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWWHYIAAEEEDWDYAPLV
 LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLIIIFKNQASRPYNIYPHGIT
 DVRPLYSRRLPKGVKHLKDFILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQR
 GNQIMSDKRNVLFSVFEDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIG
 AQTDFLSVFFSGYTFFKHMMVYEDTLTLFPFSGETVFMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDS
 60 YEDISAYLLSKNNAIEPREITRTLLQSDQEEIDYDDTISVEMKCTDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGM
 SSPHVLNRNRAQSGSVQFKKVVVFQEDTDGFTQPLRYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSY
 EEDQRQGAEPKRNFKV**PNET**KTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQ
 VTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRIRWYLLSMGSN
 ENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASG

HIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKW
QTYR**GNST**GTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLPHPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS
YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQW
TLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

- 5 La siguiente secuencia corresponde a la secuencia nucleotídica del identificador de secuencia N°: 5; es decir, a la secuencia nucleotídica que codifica la cadena pesada que comprende la mutación Asn239Ala del factor VIII humano:

10 GCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCATGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCTG
TGGACGCAAGATTTCTCCTAGAGTGCCAAAATCTTTTCATTCAACACCTCAGTCGTGTACAAAAAGACTCTGTTTG
TAGAATTCACGGTTCACCTTTTCAACATCGCTAAGCCAAGGCCACCCTGGATGGGTCTGCTAGGTCCTACCATCCAG
15 GCTGAGGTTTATGATACAGTGGTTCATTACACTTAAGAACATGGCTTCCCATCCTGTCAGTCTTCATGCTGTTGGTGTA
TCCTACTGGAAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAGAAGATGATAAAGTCTT
CCCTGGTGGAAGCCATACATATGTCTGGCAGGTCCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTT
ACCTACTCATATCTTTCTCATGTGGACCTGGTAAAAGACTTGAATTCAGGCCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGA
20 GAAGGGAGTCTGGCCAAGGAAAAGACACAGACCTTGACAAAATTTATACTACTTTTTGCTGTATTTGATGAAGGGAA
AAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCCTTGATGCAGGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGCCTGGCCTAAAATG
CACACAGTCAATGGTTATGTAG**CC**CAGGTCTCTGCCAGGTCTGATTGGATGCCACAGGAAATCAGTCTATTGGCATGT
GATTGGAATGGGCACCACTCCTGAAGTGCATCAATATTTCTCGAAGGTACACATTTCTTGTGAGGAACCATCGCC
AGGCGTCTTGGAAATCTCGCCAATAACTTTCTTACTGCTCAAACACTCTTGATGGACCTTGGACAGTTTCTACTGT
25 TTTGTCATATCTCTTCCCAACATGATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTGTCCAGAGGAACCCCAA
CTACGAATGAAAAATAATGAAGAAGCGGAAGACTATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTT
GATGATGACAACCTCTCCTTCTTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGAAGCATCCTAAAACCTTGGGTACATTACATT
GCTGCTGAAGAGGAGGACTGGGACTATGCTCCCTTAGTCTCGCCCCCGATGACAGAAGTTATAAAAGTCAATATTT
GAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAAAAAGTCCGATTTATGGCATAACACAGATGAAACCTTTAAGA
30 CTCGTGAAGCTATTACAGCATGAATCAGGAATCTGGGACCTTTACTTTATGGGGAAGTTGGAGACACACTGTTGATT
ATATTTAAGAATCAAGCAAGCAGACCATATAACATCTACCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCCTTTGTATTCAAGG
AGATTACCAAAAGGTGTAAACATTTGAAGGATTTTCAATTCTGCCAGGAGAAATATTCAAATATAAATGGACAGTG
ACTGTAGAAGATGGGCCAACTAAATCAGATCCTCGGTGCCTGACCCGCTATTACTCTAGTTTCGTTAATATGGAGAG
AGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTCTCCTCATCTGCTACAAAGAATCTGTAGATCAAAGAGGAAACCAGATAA
35 TGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTTTTCTGTATTTGATGAGAACCGAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATACAA
CGTTTTCTCCCAATCCAGCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCAGAGTTCCAAGCCTCCAACATCATGCACAGCATCA
ATGGCATGTTTTGATGTTTGCAGTTTGCAGTTTGTTCATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAG
CACAGACTGACTTCTTTCTGTCTTCTCTGATATACCTTCAAACACAAAATGGTCTATGAAGACACTCACCC
TATTCCCATTTCTCAGGAGAACTGTCTTCATGTGATGGAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGGTGCCACAACCTCA
GACTTTCGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGTTTCTAGTTGTGACAAGAACACTGGTGATTATTACGAGGA
CAGTTATGAAGATATTTACAGCATACTTGCTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCAAGA

La siguiente secuencia corresponde a la secuencia aminoacídica del identificador de secuencia N°: 6; es decir, a la secuencia aminoacídica de la cadena pesada que comprende la mutación Asn239Ala del factor VIII humano:

40 ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSPFNSTSVVYKKTLFVEFTVHLEFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEV
YDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAHEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSY
LSHVDLVKDLNLSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYV
45 ARSLPGLIGCHRSKPSVYVHVIGMGTTPPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLMDLGQFLLFCHISSHQHDM
EAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTSEMDEVRFDDDNPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAEEDWDYAPLV
LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDEFKTRAIQHESGILGPLLYGEVGDLLIIFKNQASRPYNIYPHGIT
DVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQR
45 GNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIG
AQTDFLSVFFSGYTFKHKMYVEDTLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYES
YEDISAYLLSKNNAIEPR

La siguiente secuencia corresponde a la secuencia nucleotídica del identificador de secuencia N°: 7; es decir, a la secuencia nucleotídica que codifica la cadena ligera que comprende la mutación Asn2118Ala del factor VIII humano:

50 AGCTTTCAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGCTGCAGTGGAGAGGCTCTGGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCC
ACATGTTCTAAGAAACAGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGTTGTTTTCCAGGAATTTACTGATG
GCTCCTTTACTCAGCCCTTATACCGTGAGAACTAAATGAACATTTGGGACTCCTGGGGCCATATATAAGAGCAGAA
GTTGAAGATAATATCATGGTAACCTTTCAGAAATCAGGCCTCTCGTCCCTATTCCTTCTATTCTAGCCTTATTTCTTATG
55 AGGAAGATCAGAGGCAAGGAGCAGAACCTAGAAAAAATTTGTCAAGCCTAATGAAACCAAACTTACTTTTGGAAA
GTGCAACATCATATGGCACCCACTAAAGATGAGTTTGACTGCAAGCCTGGGCTTATTTCTCTGATGTTGACCTGGA
AAAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCCCTTCTGGTCTGCCACACTAACACACTGAACCCTGCTCATGGGAGA
CAAGTGACAGTACAGGAATTTGCTCTGTTTTTCACCATCTTTGATGAGACCAAAAGCTGGTACTTCACTGAAAATATG
GAAAGAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATGGAAGATCCCACCTTTTAAAGAGAATTATCGCTTCCATGCAAT
CAATGGCTACATAATGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGATTCTGATGGTATCTGCTCAGCA
60 TGGGCAGCAATGAAAACATCCATTCTATTTCATTTCACTGGACATGTGTTCACTGTACGAAAAAAGAGGAGTATAAAA

5 TGGCACTGTACAATCTCTATCCAGGTGTTTTTGGAGACAGTGGAAATGTTACCATCCAAAGCTGGAATTTGGCGGGTG
 GAATGCCTTATTGGCGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTTTCTGGTGTACAGCAATAAGTGTACAGACTCC
 CCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTTTCAGATTACAGCTTCAGGACAATATGGACAGTGGGCCCCAAAGC
 TGGCCAGACTTCATTATTCCGGATCAATCAATGCCTGGAGCACCAGGAGCCCTTTTCTGGATCAAGGTGGATCTG
 10 TTGGCACCAGTATTACCGGCATCAAGACCCAGGGTGGCCGTCAGAAGTTCTCCAGCCTCTACATCTCTCAGTT
 TATCATCATGTATAGTCTTGATGGGAAGAAGTGGCAGACTTATCGAGGAGCCTCCACTGGAACCTTAATGGTCTTCT
 TTGGCAATGTGGATTCATCTGGGATAAAACACAATATTTTAAACCCTCCAATTATTGCTCGATACATCCGTTTGCACC
 CAACTCATTATAGCATTTCGACAGCACTCTTCGCATGGAGTTGATGGGCTGTGATTTAAATAGTTGCAGCATGCCATTG
 GGAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCACAGATTACTGCTTCATCCTACTTTACCAATATGTTTGGCACCTGGTCT
 15 CCTTCAAAGCTCGACTTCACCTCCAAGGGAGGAGTAATGCCTGGAGACCTCAGGTGAATAATCCAAAAGAGTGGC
 TGCAAGTGGACTTCAGAAAGACAATGAAAGTCACAGGAGTAATACTCAGGGAGTAAATCTCTGCTTACCAGCATG
 TATGTGAAGGAGTTCCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTGAATGGCAAAGTAAA
 GGTTTTTCAGGGAAATCAAGACTCCTTCACACCTGTGGTGAAGTCTCTAGACCCACCGTTACTGACTCGCTACCTTC
 GAATTCACCCCAAGAGTTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTTCTGGGCTGCGAGGCACAGGACCTCT
 ACTGA

La siguiente secuencia corresponde a la secuencia aminoacídica del identificador de secuencia N°: 8; es decir, a la secuencia aminoacídica que codifica la cadena ligera que comprende la mutación Asn2118Ala del factor VIII humano:

20 SFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLPYIRAEVE
 DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRNFKVPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCXAWAYFSDVDLEKD
 VHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFITFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMD
 TLPGLVMAQDQIRRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLH
 AGMSTFLVYSNKCQTPGLMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQG
 ARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGASTGTLMVFFGNVDSSGKHNIFNPPIARYIRLHPHTHYSIRSLRMELMGCDL
 25 NSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVK
 SLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPLLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ
 DLY

La siguiente secuencia corresponde a la secuencia aminoacídica del identificador de secuencia N°: 9; es decir, a la secuencia aminoacídica del polipéptido I²¹⁴⁴-T²¹⁶¹.

HARYIRLHPHTHYSIRST

30 La siguiente secuencia corresponde a la secuencia aminoacídica del identificador de secuencia N°: 10; es decir, a la secuencia aminoacídica del dominio B del factor VIII humano completo:

35 SFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDWPFAHRTMPMKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDP
 SPGAIDSNNSLSEMTFRPQLHHSGDMVFTPEGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNT
 SSLGPPSMPVHYDSQLDITLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDKLLSGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAH
 GPALLTKDNALFKVISLTKNKTNNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDETFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLN
 HMSNKTSSKNMEMVQKKEGPIPPDAQNPDMSEFFKMLFLPESARWIQRTGKNSLNSGQGPSKQLVSLGPEKSVEG
 QNFLSEKNKVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTNLDNLHENNTNHNQEKIIEKKEITLIQENVVLPQIHTVTGK
 NFMKNLFLSTRQNVESGYDGAAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLNQTKQIVEKYACTTRISPNT
 SQQNFTVQRSKR

40 La siguiente secuencia corresponde a la secuencia nucleotídica del identificador de secuencia N°: 11; es decir, a la secuencia nucleotídica que codifica la cadena ligera que comprende la mutación Asn239Gln del factor VIII humano:

45 GCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCATGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCTG
 TGGACGCAAGATTTCTCCTAGAGTGCCAAAATCTTTCCATTCAACACCTCAGTCGTGTACAAAAAGACTCTGTTTG
 TAGAATTCACGGTTCACCTTTTCAACATCGCTAAGCCAAAGGCCACCTGGATGGGTCTGCTAGGTCTTACCATCCAG
 GCTGAGGTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCTTCCCATCTGTCAGTCTTCATGCTGTTGGTGTA
 TCCTACTGGAAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAGAAGATGATAAAGTCTT
 CCCTGGTGGAAAGCCATACATATGTCTGGCAGGTCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTT
 ACCTACTCATATCTTTCTCATGTGGACCTGGTAAAGACTTGAATTCAGGCCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGA
 GAAGGGAGTCTGGCCAAGGAAAAGACACAGACCTTGACAAATTTATACTACTTTTTGCTGTATTTGATGAAGGGAA
 50 AAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCCTTGATGCAGGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGCCTGGCCTAAAATG
 CACACAGTCAATGGTTATGTACAGAGGTCTCTGCCAGGTCTGATTGGATGCCACAGGAAATCAGTCTATTGGCATGT
 GATTGGAATGGGCACCACTCCTGAAGTGAAGTCAATATTCCTCGAAGGTACACATTTCTTGTGAGGAACCATCGCC
 AGGCGTCCTTGGAAATCTCGCCAATAACTTTCTTACTGCTCAAACACTCTTGATGGACCTTGGACAGTTTCTACTGT
 TTTGTATATCTCTTCCCAACATGATGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTGTCCAGAGGAACCCCAA
 55 CTACGAATGAAATAATGAAGAAGCGGAAGACTATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTT
 GATGATGACAACTCTCCTTCTTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGAAGCATCCTAAAACCTGGGTACATTACATT
 GCTGCTGAAGAGGAGGACTGGGACTATGCTCCCTTAGTCTCGCCCCGATGACAGAAGTTATAAAAGTCAATATTT
 GAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAAAAAGTCCGATTTATGGCATACACAGATGAAACCTTTAAGA
 CTCGTGAAGCTATTCAGCATGAATCAGGAATCTTGGGACCTTTACTTTATGGGGAAGTTGGAGACACACTGTTGATT

ATATTTAAGAATCAAGCAAGCAGACCATATAACATCTACCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCCTTTGTATTCAAGG
 AGATTACCAAAAGGTGTAAAACATTTGAAGGATTTTCCAATTCTGCCAGGAGAAATATTCAAATATAAATGGACAGTG
 ACTGTAGAAGATGGGCCAACTAAATCAGATCCTCGGTGCCTGACCCGCTATTACTCTAGTTTCGTTAATATGGAGAG
 5 AGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTCTCCTCATCTGCTACAAAGAATCTGTAGATCAAAGAGGAAACCAGATAA
 TGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTTTTCTGTATTTGATGAGAACCGAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATACAA
 CGCTTTCTCCCAATCCAGCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCAGAGTTCCAAGCCTCCAACATCATGCACAGCATCA
 ATGGCTATGTTTTGATAGTTTGCAGTTGTGAGTTTGTTCATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAG
 CACAGACTGACTTCCTTTCTGTCTTCTCTGATATACCTTCAAACACAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCC
 10 TATTCCCATTCTCAGGAGAACTGTCTTCATGTGATGGAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGGTGCCACAACCTCA
 GACTTTCGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGGTTTCTAGTTGTGACAAGAACACTGGTGATTATTACGAGGA
 CAGTTATGAAGATATTTACAGCATACTTGCTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCAAGA

La siguiente secuencia corresponde a la secuencia aminoacídica del identificador de secuencia N°: 12; es decir, a la secuencia aminoacídica que codifica la cadena pesada que comprende la mutación Asn239Gln del factor VIII humano:

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFNFNTSVVYKKTFLVEFTVHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEV
 YDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSY
 15 LSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYV
 QRSPLGLIGCHRKSVYWHVIGMGTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIFLTAQTLLMDLQGLLFCHISSHQHDG
 MEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTVVHYIAEEEDWDYAPL
 VLAPDDRSYKSYQLNNGPQRIGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLIIIFKNQASRPYNIYPHGI
 20 TDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSSFVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQ
 RGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDEPFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSI
 GAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYED
 SYEDISAYLLSKNNAIEPR

La siguiente secuencia corresponde a la secuencia nucleotídica del identificador de secuencia N°: 13; es decir, a la secuencia nucleotídica que codifica la cadena ligera que comprende la mutación Asn2118Gln del factor VIII humano:

AGCTTTCAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGCTGCAGTGGAGAGGCTCTGGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCC
 ACATGTTCTAAGAAACAGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGTTGTTTTCCAGGAATTTACTGATG
 GCTCCTTTACTCAGCCCTTATACCGTGGAGAACTAAATGAACATTTGGGACTCCTGGGGCCATATATAAGAGCAGAA
 30 GTTGAAGATAATATCATGGTAACCTTTCAGAAATCAGGCCTCTCGTCCCTATTCTTCTATTCTAGCCTTATTTCTTATG
 AGGAAGATCAGAGGCAAGGAGCAGAACCTAGAAAAAATTTGTCAAGCCTAATGAAACCAAACTTACTTTTGAAA
 GTGCAACATCATATGGCACCCACTAAAGATGAGTTTGACTGCAAAAGCCTGGGCTTATTTCTCTGATGTTGACCTGGA
 AAAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCCCTTCTGGTCTGCCACACTAACACACTGAACCCTGCTCATGGGAGA
 CAAGTGACAGTACAGGAATTTGCTCTGTTTTTACCATCTTTGATGAGACCAAAAGCTGGTACTTCACTGAAAATATG
 35 GAAAGAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATGGAAGATCCCACTTTTAAAGAGAATTATCGTCTCCATGCAAT
 CAATGGCTACATAATGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGATTCGATGGTATCTGCTCAGCA
 TGGGCAGCAATGAAAACATCCATTCTATTCTATTTCACTGGACATGTGTTCACTGTACGAAAAAAGAGGAGTATAAAA
 TGGCACTGTACAATCTCTATCCAGGTGTTTTGAGACAGTGGAAATGTTACCATCCAAAGCTGGAATTTGGCGGGTG
 GAATGCCTTATTGGCGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTTCTGGTGTACAGCAATAAGTGTCAGACTCC
 40 CCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTTTTCAGATTACAGCTTCAGGACAATATGGACAGTGGGCCCCAAAGC
 TGGCCAGACTTCATTATTCGGATCAATCAATGCCCTGGAGACCAAGGAGCCCTTTTCTTGGATCAAGTGGATGATG
 TTGGCAACCAATGATTATTCAGGCATCAAGACCCAGGTTGCCGTGAGAAGTTCTCCAGCTCTACATCTCTCAGTT
 TATCATCATGTATAGTCTTGATGGGAAGAAGTGGCAGACTTATCGAGGACAGTCCACTGGAACCTTAAATGGTCTTCT
 TTGGCAATGTGGATTCTGTTGATAAAACACAATATTTTAAACCCTCCAATTATTGCTCGATACATCCGTTTGCACC
 45 CAACTCATTATAGCATTTCGAGCACTCTTCGCATGGAGTTGATGGGCTGTGATTTAAATAGTTGCAGCATGCCATTG
 GGAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCACAGATTACTGCTTCATCCTACTTTACCAATATGTTTGCCACCTGGTCT
 CCTTCAAAGCTCGACTTCACCTCCAAGGGAGGAGTAATGCCTGGAGACCTCAGGTGAATAATCCAAAGAGTGGC
 TGCAAGTGGACTTCAGAAAGACAATGAAAGTCACAGGAGTAATACTCAGGGAGTAAATCTCTGCTTACCAGCATG
 TATGTGAAGGAGTTCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTCAAGATGGCAAAGTAAA
 50 ARQKFSSLYSIQFIIMYSLDGKKWQTYRGQSTGLMVFFGNVDSSGIKHNFNPIIARYIRLHPHYHSIRSTLRMELMGCDL
 GAATTCACCCCCAGAGTTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTTCTGGGCTGCGAGGCACAGGACCTCT
 ACTGA

La siguiente secuencia corresponde a la secuencia aminoacídica del identificador de secuencia N°: 14; es decir, a la secuencia aminoacídica que codifica la cadena ligera que comprende la mutación Asn2118Gln del factor VIII humano:

SFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVQPKKVVQFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE
 55 DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLYEEDQRQGAEPKRFVKNETKTYFWKQVHHMAPTKDEFDCWAYFSDVDLEKD
 VHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNQMEDPTFKENYRFHAINGYIMD
 TLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLH
 AGMSTLFLVYSNKCQTPLMASGHIRDFQITASGQYQGWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQG
 60 ARQKFSSLYSIQFIIMYSLDGKKWQTYRGQSTGLMVFFGNVDSSGIKHNFNPIIARYIRLHPHYHSIRSTLRMELMGCDL
 NSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVK

SLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ
DLY

La presente invención no está prevista para que esté limitada en su alcance por las formas de realización específicas descritas en este documento. Es más, varias modificaciones de la invención además de las descritas en el presente serán aparentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas. Dichas modificaciones pretenden estar incluidas en el alcance de las reivindicaciones incluidas. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración de la presente invención y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: CD humanas derivadas de monocitos

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica a partir de capas leucocitarias heparinizadas de donantes adultos sanos por adherencia a las placas plásticas de cultivo celular en el medio con RPMI 1640 complementado con suero humano AB al 10%, glutamina y antibióticos durante 60 minutos. Se quitaron las células no adherentes mediante 3 lavados suaves con el medio. Los monocitos adherentes se cultivaron en X-VIVO 15 (Cambrex Bio Sciences, París, Francia) complementados con suero humano AB al 1%, antibióticos y en presencia de la 500 IU/mL de interleucina humana recombinante (rhIL-4), R&D Systems (Lille, Francia) y 1000 IU/mL del factor estimulador de colonias granulocíticas-macrofágicas humano recombinante (rhGM-CSF), ImmunoTools (Friesoythe, Alemania). Se reemplazó cada 2 días la mitad del medio, incluyendo todos los suplementos. Después de 5 días de cultivo, se realizó la recolección de las células no adherentes o de baja adherencia correspondientes a la fracción enriquecida con CD. Dichas células se lavaron y se utilizaron para posteriores experimentos.

Ejemplo 2: Conjugación del FVIII humano recombinante completo, FVIII humano recombinante con el dominio B eliminado con fluoresceína

El FVIII humano recombinante completo (1000 IU, Kogenate, Bayer) y el FVIII humano recombinante con el dominio B eliminado (BDD-FVIII, 1000 IU, Refacto®, Wyeth) se solubilizaron en agua y se dializaron frente a una solución amortiguadora de bicarbonato (pH 9,2) que contiene 5 mM CaCl₂ a 4 °C seguida de un enlace con fluoresceína 5-isotiocianato (isómero I, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Francia) durante 7 a 8 horas a 4 °C. Posteriormente, el FVIII etiquetado se dializó frente a un medio con RPMI 1640 para eliminar el FITC no enlazado. El FVIII-FITC se cuantificó mediante el ensayo de Bradford utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Ejemplo 3: naturaleza del receptor de la endocitosis del FVIII

Protocolo

Las DC se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con EDTA 5 mM, manano (1 mg/ml) o galactosa (1 mg/ml) antes de añadir el FVIII-FITC (40 µg/ml) durante 2 horas.

Se utilizó la endocitosis a 4 °C como control (no disponible).

Resultados

Figura 1A: la endocitosis del FVIII-FITC se inhibió hasta 92±16,5% (P<0,01) en el caso de EDTA. Estos datos implican una función para los receptores dependientes de iones bivalentes en la endocitosis del FVIII mediante CD. El polícarbohidrato de manano, un ligando competitivo modelo para la asimilación sensible a la manosa, redujo la asimilación del FVIII-FITC un 60±19% (P<0,01), mientras que la galactosa, un ligando competitivo para la asimilación sensible a la galactosa, no tuvo un efecto significativo.

Figura 1B: La especificidad del manano para los CLR sensibles a la manosa se confirmó en nuestro ajuste experimental utilizando dextrano etiquetado FITC, un ligando típico para los CLR sensibles a la manosa, especialmente CD206 y amarillo de Lucifer (LY, por sus siglas en inglés), la internalización del cual se realiza exclusivamente mediante macropinocitosis mediada por receptores. La internalización del dextrano se bloqueó un 89±9,3% en presencia del manano, mientras que el LY no se vio afectado.

Conclusión

Los resultados indican que los receptores sensibles a la manosa median una parte significativa de la endocitosis del FVIII mediante CD.

Ejemplo 4: La entrada sensible a la manosa del FVIII mediante CD provoca la presentación de péptidos derivados del FVIII a los linfocitos T + CD4 específicos del FVIII.

Protocolo

Figura 2A: Se incubaron CD generadas a partir de donantes que encajan con MHC II (10000 células/pocillo) en un medio solo o en presencia de manano (1 mg/ml) o anti-CD206 IgG (10 µg/ml) seguida de la incubación con el clon D9E9 del linfocito T específico del FVIII (5000 células/pocillo) en presencia de dosis variables del FVIII completo (Kogenate®) (5,56, 2,78 ó 1,39 µg/ml) y 20 U/ml rhlL-2 durante 20 horas a 37 °C. Se evaluó la activación del linfocito T mediante la liberación de IFN-γ en el sobrenadante del cultivo.

Figura 2B: Se preincubaron CD generadas a partir de donantes que encajan con MHC II con manano (1 mg/ml) o IgG anti-CD206 (10 µg/ml) seguidas de la adición del FVIII (5,56 µg/ml) o péptido I2144-T2161 (2 µg/ml) y D9E9. Para cada tratamiento, la producción de IFN-γ se representó en relación al valor máximo obtenido en cada experimento individual (*: P<0,0001, según la evaluación utilizando la prueba de Mann-Whitney).

Figura 1C: Las líneas celulares LE2E9 y BO2C11 B que encajan con HLA específicas del FVIII humano o las CD se incubaron solas o en presencia del manano (1 mg/ml) seguidas de la incubación con FVIII completo (Kogenate®) (10 µg/ml) y D9E9.

Resultados

En conjunto, los datos validan el hecho que los efectos de la inhibición del manano en la activación de D9E9 surgen del bloqueo de la endocitosis sensible a la manosa del FVIII por parte de las CD.

Ejemplo 5: Los residuos de manosa esperados ubicados por fuera del dominio B tienen una función importante en la endocitosis del FVIII mediante CD que conducen a la activación de los linfocitos T.

Protocolo

Figura 3A: Las CD se preincubaron con manano (1, 5, 10, 100 y 1000 µg/ml) antes de la adición del FVIII-FITC completo (Kogenate®) (40 µg/ml, 143 nM, círculos completos) o BDD-FVIII-FITC (24,31 µg/ml, 143 nM, círculos vacíos) o dextrano-FITC (50 µg/ml). Se analizó la asimilación de los antígenos mediante citometría de flujo. Se calculó el porcentaje de la inhibición para cada condición con respecto a la condición sin manano.

Figura 3B: Se separó el BDD-FVIII nativo o tratado con EndoF1 (3,7 µg) mediante SDS-PAGE al 7,5% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas transferidas se revelaron utilizando Protogold® o después de la incubación con 10 µg/ml de CTLD4-7-Fc utilizando una anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina. La cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CP) se identificaron a partir de la transferencia por adsorción con IgG anti FVIII monoclonales específicas de las CP y CL (no disponibles).

Figura 3C: Reducción de la activación de linfocitos T en el tratamiento con EndoF1 de BDD-FVIII. Los resultados representan un modelo de 3 experimentos independientes.

Resultados

En conjunto, los datos que confirman la implicación de glucanos que terminan en manosa ubicados por fuera del dominio B en la asimilación del FVIII.

Figura 3B: se indicó la extracción de estructuras oligomanosas en el tratamiento con EndoF1 mediante un desplazamiento del perfil de migración del BDD-FVIII y mediante la pérdida del reconocimiento del CTLD4-7-Fc.

Figura 3C: CD incubadas con D9E9 activadas con BDD-FVIII tratado con EndoF1 en menor grado que las incubadas con BDD-FVIII nativo (P<0,0001 en el caso de CD). Cabe destacar que la demanosilación del FVIII no tuvo la misma eficacia en la reducción de la activación de linfocitos T como en la saturación de los receptores de la manosa en CD utilizando manano. La capacidad residual del BDD-FVIII tratado con EndoF1 para activar D9E9 se puede atribuir a la presencia de residuos de N-acetil-glucosamina en el FVIII, que se presentan con moderada afinidad para los receptores sensibles a la manosa.

Ejemplo 6: Activación de los linfocitos T de la cadena ligera Asn2118A1a del FVIII modificado

Protocolo

La cadena ligera derivada de plasma purificada del FVIII (wtCL) amablemente facilitado por el Dr. E. Saenko (University of Maryland, Baltimore, MD, EE. UU.) se trató o no con Endo-F1. La wtCL, la wtCL en presencia de manano (1 mg/ml) y la wtCL tratada con Endo-F1 se añadieron a las CD (figura 4A) o a BO2C11 (figura 4B) y se cultivaron en forma conjunta con células D9E9 durante 20 horas. Se evaluó la activación de D9E9 midiendo el IFN-γ en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA. Las figuras C y D muestran la pérdida de activación de D9E9 en mutagénesis

dirigida del CL–FVIII (Asn2118Ala–CL–FVIII). El clon de las células B BO2C11 y las CD derivadas de monocitos se incubaron con D9E9 en presencia de la CL silvestre (figura 4C) o en presencia del FVIII de la CL Asn2118Ala mutada (figura 4D). La sustitución de Asn2118 por un residuo de Ala extrae un sitio para la manosiación N. La activación de D9E9 se evaluó después de 20 horas midiendo el IFN–gamma en el sobrenadante del cultivo.

5 Resultados

Figuras 4A y 4B: En primer lugar, validamos que la wtCL ingresara en las CD derivadas de monocitos de una manera sensible a la manosa y activará el clon del linfocito T de D9E9 específico del FVIII. La activación de la D9E9 por las CD fue significativamente menor en el caso de la wtCL incubada con manano y en el caso de la wtCL tratada con Endo–F1 que en el caso de la wtCL no tratada (figura 4A). Por el contrario, la activación de D9E9 por la línea celular B BO2C11, que endocitosa el FVIII a través de un receptor de las células B específico del FVIII, no presentó alteraciones en la incubación de la wtCL en presencia de manano o en el tratamiento con Endo–F1 (figura 4B). Estos datos son una reminiscencia de nuestras observaciones con el FVIII intacto (figura 3) y demuestran que la entrada de la cadena ligera del FVIII en las CD derivadas de monocitos depende, en la mayor parte, de glucanos manosilados.

Figura 4C y 4D: El adecuado plegamiento de la CL Asn2118Ala se confirmó en un ELISA utilizando una IgG humana monoclonal específica para un epítipo conformacional en el dominio C2 del FVIII (es decir, IgG producida por el clon de la célula B BO2C11). La D9E9 activada de la wtCL en la presentación de BO2C11 y CD (figura 4C). Por el contrario, si bien la D9E9 se activó por el FVIII de la CL Asn2118Ala en la presentación de BO2C11, no fue cuando las CD se utilizaron como células presentadoras de antígenos (CPA) (figura 4D).

Ejemplo 7: Clonación y producción de variantes del FVIII recombinante

20 Etapa 1. Clonación de diferentes variantes del FVIII

El ADNc que codifica el BDD–FVIII (a partir de ATCC, clon pSP64–FVIII), FVIII recombinante completo (Kogenate, Bayer) o cualquier FVIII modificado se utilizan como “FVIII” en este ejemplo.

El FVIII se subclona en un vector de subclonación (vector pCR®–Blunt II–TOPO®) utilizando la PCR Zero Blunt® TOPO®. La mutagénesis dirigida se realiza utilizando los cebadores apropiados para generar 4 ADNc de diferentes variantes del FVIII:

- secuencia silvestre.
- variante única de cadena pesada: codón AAC (Asn239) → codón GCC (Ala239)
- variante única de cadena ligera: codón AAT (Asn2118) → codón GCT (Ala2118)
- doble variante: Asn239Asn2118 → Ala239Ala2118

El inserto se digiere con las correspondientes enzimas de restricción, purificadas y ligadas a un extremo cohesivo con el vector pCDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) para la expresión de la proteína en líneas celulares eucariotas o con el vector pLIVE (Mirus, Madison, WI, EE. UU.) para una inyección hidrodinámica *in vivo*.

Etapa 2. Transfección temporal de líneas celulares de mamíferos

Las diferentes variantes del FVIII pCDNA3.1(+) se transfectaron en diferentes líneas celulares eucariotas: Células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de hámster bebé (BHK) y células HKB11 (híbrido de las células de riñón y B; ATCC # CRL–12568), utilizando la tecnología Nucleofector® (Amaxa Biosystems). En general, la tecnología Nucleofector® permite la transfección estable de 70 a 100% de las células. Las células HKB11 se han desarrollado específicamente para la producción del FVIII recombinante.

El FVIII se detecta en el sobrenadante utilizando el ELISA tipo sándwich, resonancia de plasmón superficial (SPR, Biacore®) e inmunotransferencia tipo Western. Los niveles del FVIII se compararon con un estándar FVIII recombinante disponible comercialmente (rFVIII, Kogenate®, Bayer o BDD BrFVIII Refacto® Wyeth). Una transfección temporal indica si las células producen las variantes del FVIII.

Etapa 3. Transfección *in vivo* de diferentes construcciones de FVIII

Las diferentes construcciones del FVIII clonadas en el vector pLIVE se inyectaron en ratones con deficiencia de FVIII. Se inyectó cien µg de cada plásmido por vía intravenosa en 2 ml en ≤5 segundos. Este enfoque, al que se hace referencia como “inyección hidrodinámica”, se ha utilizado con éxito en el pasado para expresar altos niveles del factor de von Willebrand (VWF) en ratones con deficiencia de FVIII (25). En estos experimentos, la expresión de VWF se mantuvo hasta 3 semanas a niveles superiores a los encontrados en el plasma de los ratones silvestres. En este caso, la cinética de la expresión del FVIII fue seguida por 3 semanas utilizando ELISA, SPR y transferencia por adsorción tipo Western.

Etapa 4. Transfección estable de líneas celulares de mamíferos y producción a baja escala

La transfección estable se realizará como se describe en la etapa 2. Después de la transfección de la línea celular candidata utilizando la tecnología Nucleofector®, se clonarán las células limitando diluciones. Las células que producen FVIII se amplificarán y las soluciones madres se mantendrán congeladas a -80°C .

- 5 La producción a baja escala de las proteínas se realiza en DMEM 1:1–F12 siguiendo procedimientos clásicos. En resumen, las células se cultivan para la subconfluencia durante 3 a 4 días antes de la recolección de los sobrenadantes. Se analizarán los sobrenadantes en busca de la presencia de variantes del FVIII mediante ELISA, resonancia de plasmón superficial (SPR, Biacore®) e inmunotransferencia tipo Western, utilizando IgG anti FVIII monoclonales humanas y murinas. Las cantidades del FVIII se cuantifican utilizando el rFVIII disponible comercialmente como estándar (Kogenate, Bayer o Refacto Wyeth) para realizar una estimación de la producción del FVIII por célula por día.

Etapa 5. Solución propuesta para aumentar la producción y secreción de las variantes del rFVIII.

- 15 El nivel de producción del rFVIII por células de mamíferos se limita por diferentes factores: 1) interacciones del dominio A1 del FVIII con chaperonas del retículo endoplasmático (RE) como por ejemplo la proteína unida a la inmunoglobulina (BiP, por sus siglas en inglés), que inhibe la secreción del FVIII; 2) es necesaria la unión de los azúcares manosilados de la molécula del FVIII con LMAN1 (ERGIC53) para una adecuada exportación desde el RE al aparato de Golgi y, de este modo, se debe evitar la extracción de las glicosilaciones ligadas a N, para no prevenir la unión con LMAN1 y exportación del FVIII. A la inversa, se puede aumentar la producción y secreción del FVIII en la bioingeniería de la molécula: 1) la adición de una parte truncada del dominio B, expresando 6 sitios para la glicosilación N aumenta la producción del rFVIII muchas veces en comparación con el rFVIII eliminado del dominio silvestre; 2) la mutación de Phe309 en un residuo Ser reduce la capacidad de unión a BiP y aumenta la secreción del FVIII. En este sentido, la eliminación de sitios para la glicosilación ligada a N mediante mutagénesis dirigida podría resultar en una reducción de la producción del FVIII. Es más, el ADNc del FVIII con el dominio B eliminado silvestre presenta 3 sitios para la glicosilación. Después de la mutagénesis dirigida, se espera que sólo un sitio permanezca: Asn1810 en el dominio A3, que podría no ser suficiente para la secreción adecuada de las moléculas.

- 25 Si se obtienen producciones bajas de FVIII con variantes del rFVIII mutadas, en la construcción podríamos introducir la secuencia del ADNc que codifica los primeros 226 aminoácidos del dominio B del FVIII. Esta secuencia presenta 6 sitios para la glicosilación ligada a N. Para este propósito, ya se quitó el ARNm de los extractos del hígado humano y se preparó ADNc humano (un presente del Dr. Cavard, Institut Cochin, París). Se amplificó el ADN que codifica el dominio B utilizando cebadores adecuados y se introdujo entre las cadenas pesada y ligera de las cuatro construcciones del FVIII. El dominio B que contiene las construcciones luego se clona en los vectores pCDNA3 y pLIVE. Las células se transfectan y las expresiones se estudian según lo explicado anteriormente.

Ejemplo 8: Producción a media escala del FVIII modificado

- 35 El FVIII del ejemplo 7 (silvestre/239^{mut}/2118^{mut}/239^{mut}2118^{mut}) se produce utilizando frascos rotativos en un medio basal con suero. Una cantidad suficiente del FVIII diferente se produce en frascos rotativos y luego se purifica mediante cromatografía de afinidad. Las cantidades estimadas necesarias para realizar todos los estudios descritos a continuación se evaluaron a aproximadamente 2 mg (10 000 UI) para cada variante del FVIII. La producción del procedimiento de purificación es cercana al 25% por lo que será necesario producir 8 mg (40 000 UI) de cada variante del FVIII.

- 40 La producción del FVIII por cada clon se adapta dependiendo de la productividad del clon. Para un productor alto ($> 5\text{UI}/10^6$ células/día), la producción se realiza en frascos rotativos en un sistema de partidas. Para un productor bajo ($< 5\text{UI}/10^6$ células/día), la producción se realiza en partidas repetidas utilizando frascos rotativos.

Ejemplo 9: Integridad estructural y funcional del FVIII modificado**Etapa 1. Transfección *in vivo* de variantes del FVIII recombinante**

- 45 Las diferentes construcciones del FVIII del ejemplo 7 u 8 se clonan en un vector pLIVE y se expresan en ratones con deficiencia del FVIII después de la inyección hidrodinámica. Los niveles del FVIII en el plasma de los ratones se miden utilizando un ELISA tipo sándwich y ensayos de coagulación funcionales. Se investiga la corrección de la coagulación en ratones después de tomar una muestra de tejido de la cola con unas tijeras y la medición del tiempo de sangrado y de la cantidad de sangre perdida.

Etapa 2. Actividad procoagulante *in vitro*

- 50 La actividad procoagulante de las cuatro variantes del FVIII recombinante (ejemplo 7) se está investigando *in vitro* e *in vivo*. Se incuba FVIII en diluciones con plasma humano reducido en FVIII y su actividad se mide utilizando un ensayo de coagulación funcional (FibrinTimer CA540, Dade–Behring). Alternativamente, la actividad del FVIII se evalúa utilizando un ensayo cromogénico, en el que el FVIII se mezcla con el factor IX activado y con el factor X y los fosfolípidos. Posteriormente se mide la generación del factor X activado utilizando un sustrato sintético cromogénico del factor X activado. Se calculan las actividades específicas de las diferentes construcciones del FVIII. El FVIII con el dominio B

eliminado (Refacto® Wyeth) es el preferente y el utilizado en el ensayo. Los resultados de la generación FXa se expresan como el cociente del valor del estándar dividido por el valor de la muestra de la prueba $t_{1/2}$ (respuesta semimáxima).

Etapas 3. Interacción del FVIII con los anticuerpos monoclonales, factor de von Willebrand y fosfolípidos

- 5 Se está investigando la interacción de las diferentes variantes del FVIII con los anticuerpos monoclonales, factor de von Willebrand y fosfolípidos.

Etapas 4. Procedimientos para el análisis de modificaciones postraduccionales

a) Desalación, concentración y activación del FVIII

- 10 La concentración y desalación de las muestras del FVIII son necesarias para eliminar las sales, monosacáridos y pequeñas moléculas que podrían interferir en varios análisis futuros.

La desalación se realiza en un sistema purificador AKTA (Amersham–Biosciences) equipado con una columna 10WC4–25QS Uptisphere de fase reserva (FR) (Interchim) equilibrada en 5 % de MeCN + TFA al 0,1%. La elución se realizó utilizando un gradiente del 5 al 90 % de MeCN + TFA a 0,1% en 5 CV. El producto desalado se recoge y seca en un evaporador al vacío Speed–Vac.

- 15 Las muestras del FVIII purificadas puede también someterse a una activación a través de un tratamiento con trombina. Las cadenas del FVIII resultantes se pueden luego separar utilizando RP–HPLC (Uptisphere UP5WOD\$25QK) utilizando un gradiente MeCN + TFA regular.

b) Desglicosilación enzimática del FVIII

i) Desglicosilación de PNGase F

- 20 La PNGase F es una enzima específica para las estructuras de N–glucano. Después de la desalación y secado, el FVIII se resuspende en la solución amortiguadora de la enzima, con o sin agentes reductores y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. La enzima se añade luego (E/S 5mIU/200µg) y la desglicosilación se realiza mediante incubación a 37 °C durante 18 horas.

ii) Desglicosilación de Endo–H

- 25 La Endo H es una enzima específica para las N–glico estructuras de la oligomanosa y del tipo híbrido. Después de la desalación y secado, el FVIII se resuspende en la solución amortiguadora de la enzima, con o sin agentes reductores y se incuba durante 5 minutos a 95 °C. Después de la refrigeración en hielo, la enzima se añade (E/S: 0,2 mIU/µg prot). La reacción de desglicosilación se realiza durante 2 horas a 37 °C.

iii) Análisis de SDS–PAGE

- 30 La glicosilación del FVIII se puede caracterizar parcialmente mediante análisis de SDS–PAGE de los productos obtenidos antes y después de la desglicosilación enzimática con PNGase F o Endo H. SDS–PAGE se realiza en un sistema NOVEX (Invitrogen, Life Technologies). La muestra se carga (0,5 y 1 µg) en condiciones no reductoras y reductoras en un gel al 4 al 12 % (Novex). Después de la migración a 200 V durante 50 minutos, las proteínas se tiñen de plata. Después del barrido digital e integración del gel (software Quantity One, Biorad), el aparente peso molecular de las diferentes bandas de proteínas se determina mediante la comparación con estándares de proteínas.

iv) Análisis de la transferencia por adsorción de lectina

- 40 La detección específica de péptidos glicosilados (tipo complejo, tipo manosa alta) y de polipéptidos, incluyendo el FVIII, se realiza utilizando un análisis de transferencia por adsorción de lectina (Fukuda y Kobata, Glycobiology a Practical Approach). Se separan diez µg de FVIII mediante SDS–PAGE como se describió anteriormente y se transfieren a una membrana de nailon o nitrocelulosa según las instrucciones del fabricante (Novex). En resumen, una vez que la membrana se transfiere por adsorción se bloquea con BSA, se lava en PBST (PBS, Tween 20 0,05%) y se incuba a 4 °C con la lectina correspondiente (es decir, GNA, Con A, DGA, LcH, MNA–M, VFA, PEA, PMA, AMA, etc.) etiquetada con peroxidasa (laboratorios Ey). Después de algunos lavados con PBST, la peroxidasa se revela mediante procedimientos colorimétricos y de quimioluminiscencia y se captura la imagen de la transferencia por adsorción resultante utilizando un escáner o cámara CCD. El análisis de la imagen y la cuantificación se realizan utilizando el software Quantity One (Biorad).

Etapas 5. Procedimientos para el análisis de la estructura primaria del FVIII

a) Mapeo del FVIII

- 50 El mapeo del FVIII permite el análisis de la estructura primaria. La secuencia de la proteína es única, y los péptidos generados después de la digestión con las enzimas específicas (tripsina o Asp–N endoproteasa) son característicos a la

5 proteína de interés. Después de la desalación y secado, el FVIII se desnaturaliza (8M Urea), reduce (DTT 20 moles/mol de SH) y alquila (iodoacetamida 40 moles/mol de SH). El FVIII luego se digiere con tripsina (E/S: 1/25 m/m), que escinde la proteína después de los residuos de Arg (R) y Lys (K). Asp-N (E/S: 1/100 m/m), que escinde las proteínas antes de que los residuos de Asp (D) se utilicen. Después de la digestión de proteínas, los péptidos generados se inyectan directamente al sistema LC-MS/MS para el análisis o se separan mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa en una columna C18 300 Å utilizando un gradiente de acetonitrilo en aumento. Las fracciones luego se recogen y se secan utilizando un Speed-Vac para análisis adicionales mediante secuenciación de Edman y MALDI-TOF MS.

b) Secuenciación de Edman

10 La secuenciación de Edman del extremo N terminal del FVIII se realiza en un microsecuenciador (Procise 491 HT, Applied Biosystems) en un procedimiento en tres etapas: acople – escisión y conversión. Los aminoácidos luego se separan mediante cromatografía en fase reversa. El análisis e identificación de los residuos del extremo N terminal se logran utilizando aminoácidos estándar a partir de Sequence Pro (Applied Biosystems) y se comparan con la secuencia teórica del FVIII, permitiendo así la confirmación de las sustituciones de aminoácidos, por ejemplo.

15 c) Espectrometría de masas

MALDI TOF (TOF)

La espectrometría de masas mediante tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) es una técnica que permite la medición de las masas moleculares con gran precisión. La MALDI-TOF MS es un procedimiento de ionización que permite el análisis de péptidos, proteínas y glucanos.

20 Los péptidos, proteínas o glucanos de interés (FVIII, fragmentos del mismo o glucanos) se mezclan con una matriz que se absorbe en la longitud de onda del láser. Las matrices utilizadas con mayor frecuencia son un ácido ciano-4-hidroxicinámico (HCCA para el análisis de péptidos, ácido sinapico (AS) para las proteínas y ácido 2,5-dihidroxibenzoico para los oligosacáridos (DHB). La identificación de cada péptido se puede realizar midiendo su masa mediante espectrometría de masas y comparándola con la masa teórica deducida de la secuencia de proteínas teórica.

25 La secuenciación de péptidos se puede realizar utilizando experimentos MS/MS (espectrometría de masas en tandem, TOF/TOF) a base de iones de fragmentos obtenidos en estas condiciones para un péptido dado. Una estrategia similar se utiliza para la identificación y caracterización de los oligosacáridos. Se encuentra disponible un instrumento Bruker Autoflex 2.

30 Cromatografía en fase líquida acoplada con la espectrometría de masas de ionización de electronebulización (LC-ESIMS)

A diferencia de MALDI, la ionización por electronebulización (ESI, por sus siglas en inglés) no requiere el uso de una matriz. En ESI, la solución de la muestra se introduce en un capilar que se encuentra a un alto voltaje. Se aplica un fuerte campo eléctrico en los tubos que conducen a la formación de un rocío de gotitas cargadas que simultáneamente cruzan un campo eléctrico y un gradiente de presión que se encuentra en la vía del analizador de espectrometría de masas.

El análisis mediante ESIMS se puede realizar después de la separación cromatográfica de los péptidos en investigación. También se puede obtener un mapa de péptidos. En el caso del FVIII, la separación de péptidos se puede realizar en una columna Uptisphere UP5WOD25QK (Interchim) con un gradiente de acetonitrilo.

40 La detección mediante espectrometría de masas se realiza a través de un espectrómetro de masas híbrido Qq-TOF (tetrapolar – tiempo de vuelo, Qstar-xl, Applied Biosystems) que permite la recolección de datos de MS y MS/MS. De este modo, se puede lograr la cobertura de la secuencia aminoacídica.

d) Mapeo de oligosacáridos HPCE-LIF

La caracterización y cuantificación de diferentes estructuras de oligosacáridos relacionados con las asparraginas o “estructuras ligadas a N” se realizan mediante HPCE-LIF. Los azúcares se liberan del FVIII mediante un tratamiento de PNGase F y se aíslan mediante precipitación con etanol en hielo frío. Las muestras se tratan con exoglicosidasas (sialidasa, galactosidasa, manosidasas, N-acetilhexosaminidasa) para garantizar que todas las estructuras aisladas se cuantifiquen y caractericen. Todas las glucosidasas utilizados se obtienen de Prozyme. En esta etapa, se realiza una segunda precipitación etanólica. Los glucanos obtenidos se etiquetan con un fluoróforo (APTS) y se separan según su masa y carga. Dos estándares (homopolímeros de glucosa, oligosacáridos) permiten la identificación de las estructuras.

50 Un capilar recubierto N-CHO de Beckman Coulter (dimensión 50 cm x 50 µm ID) se monta en una electroforesis capilar (ProteomeLab PA800, Beckman Coulter). Las condiciones experimentales son: solución amortiguadora de separación «gel solución amortiguadora-N – Beckman coulter», migración a 25 KV, 20 min a 20 °C y detección láser utilizando λ_{ex} 488nm y λ_{em} 520 nm.

e) Mapeo de oligosacáridos NP-HPLC

La identificación y cuantificación de las numerosas estructuras de oligosacáridos relacionadas a las asparraginas, conocidas como estructuras ligadas a N, también se pueden realizar mediante una cromatografía líquida de alta resolución en fase normal (NP-HPLC). Los N-glucanos se liberan utilizando una enzima específica (PNGase F) y se aíslan mediante precipitación de etanol. Los glucanos obtenidos se etiquetan con fluoróforo de 2-aminobenzamida (2-AB). Los glucanos etiquetados se separan mediante NP-HPLC utilizando una columna Amide-80 (Tosohaas), conectada a un sistema «Gold» (Beckman).

Antes de la inyección de la muestra, la columna se equilibra con una solución amortiguadora de acetonitrilo al 80%. Los oligosacáridos se eluyen en una gradiente en aumento de 50 mM de formiato de amonio con pH 4,45. La detección se realiza utilizando fluorescencia a λ_{ex} 330nm y λ_{em} 420nm.

Ejemplo 10: inmunogenicidad de la CL Asn2118Ala en ratones con deficiencia de FVIII**Protocolo**

La cadena ligera derivada de plasma purificada del FVIII (wtCL) fue amablemente facilitada por el Dr. E. Saenko (University of Maryland, Baltimore, MD, EE. UU.) La CL mutada del FVIII (CL de Asn2118Ala) se generó y produjo. La wtCL y la CL mutada se inyectaron por vía intravenosa (0,2 µg de proteína en 200µL de PBS) a ratones con deficiencia de FVIII (un presente del Prof. Kazazian, Pennsylvania University, EE. UU.) cuatro veces en intervalos semanales. Una semana después de la cuarta inyección, se extrajo la sangre de los ratones y se analizaron los niveles de anti-IgG del-FVIII utilizando un ELISA específico para FVIII.

ELISA: El suero de los ratones diluido 1 en 90 se incubó en una placa de ELISA revestida con FVIII humano.(Recombinante, Baxter). Las placas se bloquearon utilizando PBS-1% BSA. Se revelaron IgG unidas utilizando una IgG anti-murino acoplada con peroxidasa y su sustrato (OPD). Se midió la intensidad de la unión mediante densidad óptica a 492 nm con un espectrómetro (Tecan Genyos), definiendo de esta manera los niveles de anti-IgG del FVIII.

Resultados

La administración por vía intravenosa de la cadena ligera derivada del plasma purificada del FVIII humano (wtCL) a ratones con deficiencia de FVIII indujo niveles detectables de anti-IgG del FVIII. Es interesante destacar que la respuesta inmunitaria de los ratones a la wtCL fue heterogénea entre los seis ratones incluidos en el experimento. Por contraste, el tratamiento con ratones con la CL de Asn2118Ala no pudo inducir niveles importantes de anti-IgG del FVIII.

Conclusión

Estos datos demuestran que la capacidad de la CL de Asn2118Ala para inducir una respuesta inmunitaria específica se reduce fuertemente en comparación con la wtCL.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lenting P, y col. 1998. Blood 92(11):3983-96
2. Lusher JM y col. 2003 Hoemophilia 9: 38 – 49
3. Ehrenforth S, y col. 1992. Lancet 339:594.
4. De Biasi R, y col. 1994. Throm Haemost 7(5):544
5. Gringeri A, y col. 2003. Blood 102:2358
6. Banchereau J, y col. 1998. Nature 392:245
7. Trombetta ES, y col. 2005. Annu Rev Immunol 23:975
8. Geijtenbeek TB, y col. 2004. Annu Rev Immunol 22:33
9. Sallusto F, y col. 1995. J Exp Med 182:389
10. Geijtenbeek TB, y col. 2000. Cell 100:575
11. Keler T, y col. 2004. Expert Opin Biol Ther 4:1953
12. Saint-Remy JM y col. 1999 Vox Sang ; 77 (supl. 1): 21-24
13. Jacquemin y col. 2000 Blood 95: 156-163

14. Jacquemin y col. 1998 Blood Jul 15 ; 92 (2): 496–506
15. Subramani y col. 1981 Mol. Cell. Biol. 1:854–864
16. Boshart y col. 1985 Cell 41:521–530
17. Kaufman y Sharp, 1982 Mol. Cell. Biol. 2:1304–1319
- 5 18. Bergman y col. 1983 Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 81:7041–7045
19. Loh y col. 1983 Cell 33:85–93
20. Palmiter y col. 1983 Science 222:809–814
21. DeNoto y col. 1981 Nuc. Acids Res. 9:3719–3730
22. Pittman y col. 1994. Blood 84(12):4214–4225
- 10 23. Kaufman RJ 1989. Nature 342(6246): 207–208
24. Toole y col. 1984. Nature 312(5992): 342–347
25. Lenting y col. 2007. Blood. 109(5):2267–226

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> LFB biotechnologies
instituí National de la Sante et de la Recherche Medicale
(INSERM)
- 5 <120> Factor VIII recombinante demanosilado para el tratamiento de pacientes con hemofilia A
<130> 27690PC
<160> 14
<170> Patentin versión 3.3
<210> 1
- 10 <211> 2351
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

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
 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
 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
	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			
Asp	Ser	Gly	Val	Gln	Glu	Ser	Ser	His	Phe	Leu	Gln	Gly	Ala	Lys
	1445					1450					1455			
Lys	Asn	Asn	Leu	Ser	Leu	Ala	Ile	Leu	Thr	Leu	Glu	Met	Thr	Gly
	1460					1465					1470			
Asp	Gln	Arg	Glu	Val	Gly	Ser	Leu	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser
	1475					1480					1485			
Val	Thr	Tyr	Lys	Lys	Val	Glu	Asn	Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Asp
	1490					1495					1500			
Leu	Pro	Lys	Thr	Ser	Gly	Lys	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Val	His
	1505					1510					1515			

Ile	Tyr	Gln	Lys	Asp	Leu	Phe	Pro	Thr	Glu	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser
	1520					1525					1530			
Pro	Gly	His	Leu	Asp	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Leu	Leu	Gln	Gly	Thr
	1535					1540					1545			
Glu	Gly	Ala	Ile	Lys	Trp	Asn	Glu	Ala	Asn	Arg	Pro	Gly	Lys	Val
	1550					1555					1560			
Pro	Phe	Leu	Arg	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Pro	Ser
	1565					1570					1575			
Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	His	Tyr	Gly	Thr	Gln
	1580					1585					1590			
Ile	Pro	Lys	Glu	Glu	Trp	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Lys
	1595					1600					1605			
Thr	Ala	Phe	Lys	Lys	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys
	1610					1615					1620			
Glu	Ser	Asn	His	Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys
	1625					1630					1635			
Pro	Glu	Ile	Glu	Val	Thr	Trp	Ala	Lys	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Arg
	1640					1645					1650			
Leu	Cys	Ser	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu
	1655					1660					1665			
Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr
	1670					1675					1680			
Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile
	1685					1690					1695			
Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys
	1700					1705					1710			
Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr
	1715					1720					1725			
Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser
	1730					1735					1740			
Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr
	1745					1750					1755			
Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu
	1760					1765					1770			

His	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp
	1775					1780					1785			
Asn	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser
	1790					1795					1800			
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	Leu	Met	Gly	Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys
	2180					2185					2190			
Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln
	2195					2200					2205			
Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn	Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser
	2210					2215					2220			
Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp
	2225					2230					2235			
Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe
	2240					2245					2250			
Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys
	2255					2260					2265			
Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser
	2270					2275					2280			

Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys
2285 2290 2295

Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val
2300 2305 2310

Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His
2315 2320 2325

Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu
2330 2335 2340

Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
2345 2350

<210> 2

<211> 2332

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ala	Thr	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Asp	Tyr
1				5					10					15	
Met	Gln	Ser	Asp	Leu	Gly	Glu	Leu	Pro	Val	Asp	Ala	Arg	Phe	Pro	Pro
			20					25					30		
Arg	Val	Pro	Lys	Ser	Phe	Pro	Phe	Asn	Thr	Ser	Val	Val	Tyr	Lys	Lys
		35					40					45			
Thr	Leu	Phe	Val	Glu	Phe	Thr	Asp	His	Leu	Phe	Asn	Ile	Ala	Lys	Pro
	50					55					60				
Arg	Pro	Pro	Trp	Met	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Thr	Ile	Gln	Ala	Glu	Val
65					70					75					80
Tyr	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Ala	Ser	His	Pro	Val
				85					90					95	
Ser	Leu	His	Ala	Val	Gly	Val	Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Ser	Glu	Gly	Ala
			100					105					110		
Glu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp	Asp	Lys	Val
		115					120					125			
Phe	Pro	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Tyr	Val	Trp	Gln	Val	Leu	Lys	Glu	Asn
	130					135					140				
Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Cys	Leu	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ser
145					150					155					160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
 165 170 175
 Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
 180 185 190
 His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
 195 200 205
 His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
 210 215 220
 Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
 225 230 235 240
 Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255
 Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270
 Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
 275 280 285
 Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
 290 295 300
 Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
 305 310 315 320
 Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
 325 330 335
 Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
 340 345 350
 Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
 355 360 365
 Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
 370 375 380
 Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
 385 390 395 400
 Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
 405 410 415
 Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
 420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445
 Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460
 Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480
 Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495
 His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510
 Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525
 Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540
 Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560
 Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575
 Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590
 Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605
 Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620
 Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640
 Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655
 Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
 660 665 670
 Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685
 Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700

Leu 705 Leu Lys Val Ser 710 Ser Cys Asp Lys Asn 715 Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu 720
 Asp Ser Tyr Glu 725 Asp Ile Ser Ala Tyr Leu 730 Leu Ser Lys Asn 735 Asn Ala
 Ile Glu Pro Arg 740 Ser Phe Ser Gln 745 Asn Ser Arg His Pro 750 Ser Thr Arg
 Gln Lys Gln 755 Phe Asn Ala Thr 760 Thr Ile Pro Glu Asn 765 Asp Ile Glu Lys
 Thr 770 Asp Pro Trp Phe Ala 775 His Arg Thr Pro Met 780 Pro Lys Ile Gln Asn
 Val 785 Ser Ser Ser Asp 790 Leu Leu Met Leu Leu Arg 795 Gln Ser Pro Thr Pro 800
 His Gly Leu Ser 805 Leu Ser Asp Leu Gln 810 Glu Ala Lys Tyr Glu Thr 815 Phe
 Ser Asp Asp 820 Pro Ser Pro Gly Ala 825 Ile Asp Ser Asn Asn 830 Ser Leu Ser
 Glu Met Thr 835 His Phe Arg Pro 840 Gln Leu His His Ser 845 Gly Asp Met Val
 Phe Thr 850 Pro Glu Ser Gly 855 Leu Gln Leu Arg Leu 860 Asn Glu Lys Leu Gly
 Thr 865 Thr Ala Ala Thr 870 Glu Leu Lys Lys Leu 875 Asp Phe Lys Val Ser Ser 880
 Thr Ser Asn Asn 885 Leu Ile Ser Thr Ile 890 Pro Ser Asp Asn Leu Ala 895 Ala
 Gly Thr Asp 900 Asn Thr Ser Ser Leu Gly 905 Pro Pro Ser Met 910 Pro Val His
 Tyr Asp 915 Ser Gln Leu Asp Thr 920 Thr Leu Phe Gly Lys 925 Lys Ser Ser Pro
 Leu 930 Thr Glu Ser Gly Gly 935 Pro Leu Ser Leu Ser 940 Glu Glu Asn Asn Asp
 Ser 945 Lys Leu Leu Glu 950 Ser Gly Leu Met Asn 955 Ser Gln Glu Ser Ser Trp 960
 Gly Lys Asn Val 965 Ser Ser Thr Glu Ser 970 Gly Arg Leu Phe Lys 975 Gly Lys

Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
 980 985 990
 Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
 995 1000 1005
 Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
 1010 1015 1020
 Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
 1025 1030 1035
 Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
 1040 1045 1050
 Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
 1055 1060 1065
 Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
 1070 1075 1080
 Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
 1085 1090 1095
 Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His
 1100 1105 1110
 Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
 1115 1120 1125
 Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe
 1130 1135 1140
 Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr
 1145 1150 1155
 Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn
 1160 1165 1170
 Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His
 1175 1180 1185
 Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr
 1190 1195 1200
 Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr
 1205 1210 1215
 Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg
 1220 1225 1230

Gln	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ala	Tyr	Ala	Pro	Val	Leu
	1235					1240					1245			
Gln	Asp	Phe	Arg	Ser	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Asn	Arg	Thr	Lys	Lys
	1250					1255					1260			
His	Thr	Ala	His	Phe	Ser	Lys	Lys	Gly	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Glu
	1265					1270					1275			
Gly	Leu	Gly	Asn	Gln	Thr	Lys	Gln	Ile	Val	Glu	Lys	Tyr	Ala	Cys
	1280					1285					1290			
Thr	Thr	Arg	Ile	Ser	Pro	Asn	Thr	Ser	Gln	Gln	Asn	Phe	Val	Thr
	1295					1300					1305			
Gln	Arg	Ser	Lys	Arg	Ala	Leu	Lys	Gln	Phe	Arg	Leu	Pro	Leu	Glu
	1310					1315					1320			
Glu	Thr	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Val	Asp	Asp	Thr	Ser	Thr
	1325					1330					1335			
Gln	Trp	Ser	Lys	Asn	Met	Lys	His	Leu	Thr	Pro	Ser	Thr	Leu	Thr
	1340					1345					1350			
Gln	Ile	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Glu	Lys	Gly	Ala	Ile	Thr	Gln	Ser
	1355					1360					1365			
Pro	Leu	Ser	Asp	Cys	Leu	Thr	Arg	Ser	His	Ser	Ile	Pro	Gln	Ala
	1370					1375					1380			
Asn	Arg	Ser	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Lys	Val	Ser	Ser	Phe	Pro	Ser
	1385					1390					1395			
Ile	Arg	Pro	Ile	Tyr	Leu	Thr	Arg	Val	Leu	Phe	Gln	Asp	Asn	Ser
	1400					1405					1410			
Ser	His	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys	Asp	Ser	Gly	Val
	1415					1420					1425			
Gln	Glu	Ser	Ser	His	Phe	Leu	Gln	Gly	Ala	Lys	Lys	Asn	Asn	Leu
	1430					1435					1440			
Ser	Leu	Ala	Ile	Leu	Thr	Leu	Glu	Met	Thr	Gly	Asp	Gln	Arg	Glu
	1445					1450					1455			
Val	Gly	Ser	Leu	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser	Val	Thr	Tyr	Lys
	1460					1465					1470			
Lys	Val	Glu	Asn	Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys	Thr
	1475					1480					1485			

Ser	Gly	Lys	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Val	His	Ile	Tyr	Gln	Lys
	1490					1495					1500			
Asp	Leu	Phe	Pro	Thr	Glu	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser	Pro	Gly	His	Leu
	1505					1510					1515			
Asp	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Leu	Leu	Gln	Gly	Thr	Glu	Gly	Ala	Ile
	1520					1525					1530			
Lys	Trp	Asn	Glu	Ala	Asn	Arg	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Phe	Leu	Arg
	1535					1540					1545			
Val	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Pro	Ser	Lys	Leu	Leu	Asp
	1550					1555					1560			
Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	His	Tyr	Gly	Thr	Gln	Ile	Pro	Lys	Glu
	1565					1570					1575			
Glu	Trp	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Lys	Thr	Ala	Phe	Lys
	1580					1585					1590			
Lys	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys	Glu	Ser	Asn	His
	1595					1600					1605			
Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys	Pro	Glu	Ile	Glu
	1610					1615					1620			
Val	Thr	Trp	Ala	Lys	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Arg	Leu	Cys	Ser	Gln
	1625					1630					1635			
Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr
	1640					1645					1650			
Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile
	1655					1660					1665			
Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp
	1670					1675					1680			
Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys	Thr	Arg	His	Tyr
	1685					1690					1695			
Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Ser
	1700					1705					1710			
Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Pro
	1715					1720					1725			
Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Phe
	1730					1735					1740			

Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu	His	Leu	Gly	Leu
	1745					1750					1755			
Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp	Asn	Ile	Met	Val
	1760					1765					1770			
Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser
	1775					1780					1785			
Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro	Arg
	1790					1795					1800			
Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Trp	Lys
	1805					1810					1815			
Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Lys
	1820					1825					1830			
Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	His
	1835					1840					1845			
Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu
	1850					1855					1860			
Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu
	1865					1870					1875			
Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu
	1880					1885					1890			
Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu
	1895					1900					1905			
Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly
	1910					1915					1920			
Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln
	1925					1930					1935			
Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile
	1940					1945					1950			
His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys
	1955					1960					1965			
Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe
	1970					1975					1980			
Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val
	1985					1990					1995			

Glu	Cys 2000	Leu	Ile	Gly	Glu	His 2005	Leu	His	Ala	Gly	Met 2010	Ser	Thr	Leu
Phe	Leu 2015	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys 2020	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu 2025	Gly	Met	Ala
Ser	Gly 2030	His	Ile	Arg	Asp	Phe 2035	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser 2040	Gly	Gln	Tyr
Gly	Gln 2045	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu 2050	Ala	Arg	Leu	His	Tyr 2055	Ser	Gly	Ser
Ile	Asn 2060	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys 2065	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp 2070	Ile	Lys	Val
Asp	Leu 2075	Leu	Ala	Pro	Met	Ile 2080	Ile	His	Gly	Ile	Lys 2085	Thr	Gln	Gly
Ala	Arg 2090	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser 2095	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln 2100	Phe	Ile	Ile
Met	Tyr 2105	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys 2110	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr 2115	Arg	Gly	Asn
Ser	Thr 2120	Gly	Thr	Leu	Met	Val 2125	Phe	Phe	Gly	Asn	Val 2130	Asp	Ser	Ser
Gly	Ile 2135	Lys	His	Asn	Ile	Phe 2140	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile 2145	Ala	Arg	Tyr
Ile	Arg 2150	Leu	His	Pro	Thr	His 2155	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser 2160	Thr	Leu	Arg
Met	Glu 2165	Leu	Met	Gly	Cys	Asp 2170	Leu	Asn	Ser	Cys	Ser 2175	Met	Pro	Leu
Gly	Met 2180	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile 2185	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile 2190	Thr	Ala	Ser
Ser	Tyr 2195	Phe	Thr	Asn	Met	Phe 2200	Ala	Thr	Trp	Ser	Pro 2205	Ser	Lys	Ala
Arg	Leu 2210	His	Leu	Gln	Gly	Arg 2215	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg 2220	Pro	Gln	Val
Asn	Asn 2225	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu 2230	Gln	Val	Asp	Phe	Gln 2235	Lys	Thr	Met
Lys	Val 2240	Thr	Gly	Val	Thr	Thr 2245	Gln	Gly	Val	Lys	Ser 2250	Leu	Leu	Thr

Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly
 2255 2260 2265
 His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
 2270 2275 2280
 Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp
 2285 2290 2295
 Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
 2300 2305 2310
 Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
 2315 2320 2325
 Gln Asp Leu Tyr
 2330

<210> 3

<211> 4275

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

gccaccagaa gatactacct ggggtgcagtg gaactgtcat gggactatat gcaaagtgat	60
ctcgggtgagc tgcctgtgga cgcaagattt ctccttagag tgccaaaatc ttttccattc	120
aacacctcag tcgtgtacaa aaagactctg tttgtagaat tcacggttca ccttttcaac	180
atcgctaagc caaggccacc ctggatgggt ctgctagggtc ctaccatcca ggctgagggt	240
tatgatacag tggtcattac acttaagaac atggcttccc atcctgtcag tcttcatgct	300
gttgggtgat cctactggaa agcttctgag ggagctgaat atgatgatca gaccagtcaa	360
agggagaaaag aagatgataa agtcttcctt ggtggaagcc atacatatgt ctggcagggtc	420
ctgaaagaga atgggtccaat ggcctctgac ccactgtgcc ttacctactc atatctttct	480
catgtggacc tggtaaaaga cttgaattca ggcctcattg gagccctact agtatgtaga	540
gaagggagtc tggccaagga aaagacacag acctgcaca aatttatact actttttgct	600
gtatttgatg aagggaaaag ttggcactca gaaacaaaga actccttgat gcaggatagg	660
gatgctgcat ctgctcgggc ctggcctaaa atgcacacag tcaatggtta tgtaaacagg	720
tctctgccag gtctgattgg atgccacagg aaatcagtct attggcatgt gattggaatg	780
ggcaccactc ctgaagtgca ctcaatattc ctcgaagggtc acacatttct tgtgaggaac	840
catcgccagg cgtccttgga aatctcgcca ataactttcc ttactgctca aacactcttg	900
atggaccttg gacagtttct actgttttgt catatctctt cccaccaaca tgatggcatg	960
gaagcttatg tcaaagtaga cagctgtcca gaggaacccc aactacgaat gaaaaataat	1020
gaagaagcgg aagactatga tgatgatctt actgattctg aaatggatgt ggtcagggtt	1080
gatgatgaca actctccttc ctttatccaa attcgtcag ttgccaagaa gcatcctaaa	1140

acttgggtac	attacattgc	tgctgaagag	gaggactggg	actatgctcc	cttagtcctc	1200
gccccgatg	acagaagtta	taaaagtcaa	tatttgaaca	atggccctca	gcggattggt	1260
aggaagtaca	aaaaagtccg	atttatggca	tacacagatg	aaaccttta	gactcgtgaa	1320
gctattcagc	atgaatcagg	aatcttggga	cctttacttt	atggggaagt	tggagacaca	1380
ctgttgatta	tatttaagaa	tcaagcaagc	agaccatata	acatctaccc	tcacggaatc	1440
actgatgtcc	gtcctttgta	ttcaaggaga	ttaccaaaag	gtgtaaaaca	tttgaaggat	1500
tttccaattc	tgccaggaga	aatattcaaa	tataaatgga	cagtgcactgt	agaagatggg	1560
ccaactaaat	cagatcctcg	gtgcctgacc	cgctattact	ctagtttcgt	taatattggag	1620
agagatctag	cttcaggact	cattggccct	ctcctcatct	gtacaaaaga	atctgtagat	1680
caaagaggaa	accagataat	gtcagacaag	aggaatgtca	tcctgttttc	tgtattttgat	1740
gagaaccgaa	gctggtacct	cacagagaat	atacaacgct	ttctcccaa	tccagctgga	1800
gtgcagcttg	aggatccaga	gttccaagcc	tccaacatca	tgcacagcat	caatggctat	1860
gtttttgata	gtttgcagtt	gtcagtttgt	ttgcatgagg	tggcactactg	gtacattcta	1920
agcattggag	cacagactga	cttcctttct	gtctttctct	ctggatatac	cttcaaacac	1980
aaaatgggtct	atgaagacac	actcacccta	ttcccattct	caggagaaac	tgtcttcctg	2040
tcgatggaaa	accaggtct	atggattctg	gggtgccaca	actcagactt	tcggaacaga	2100
ggcatgaccg	ccttactgaa	ggtttctagt	tgtgacaaga	acactggtga	ttattacgag	2160
gacagttatg	aagatatttc	agcatacttg	ctgagtaaaa	acaatgccat	tgaaccaaga	2220
gaaataactc	gtactactct	tcagtcagat	caagaggaaa	ttgactatga	tgataccata	2280
tcagttgaaa	tgaagaagga	agattttgac	atttatgatg	aggatgaaaa	tcagagcccc	2340
cgcagctttc	aaaagaaaac	acgacactat	tttattgctg	cagtggagag	gctctgggat	2400
tatgggatga	gtagctcccc	acatgttcta	agaaacaggg	ctcagagtgg	cagtgtccct	2460
cagttcaaga	aagttgtttt	ccaggaattt	actgatggct	cctttactca	gcccttatac	2520
cgtggagaac	taaatgaaca	tttgggactc	ctggggccat	atataagagc	agaagttgaa	2580
gataatatca	tggttaacttt	cagaaatcag	gcctctcgtc	cctattcctt	ctattctagc	2640
cttatttctt	atgaggaaga	tcagaggcaa	ggagcagaac	ctagaaaaaa	ctttgtcaag	2700
cctaataaaa	ccaaaactta	cttttgaaa	gtgcaacatc	atatggcacc	cactaaagat	2760
gagtttgact	gcaaagcctg	ggcttatttc	tctgatgttg	acctggaaaa	agatgtgcac	2820
tcaggcctga	ttggaccctt	tctggtctgc	cacactaaca	cactgaaccc	tgctcatggg	2880
agacaagtga	cagtacagga	atttgctctg	tttttcacca	tctttgatga	gaccaaagc	2940
tggtacttca	ctgaaaatat	ggaaagaaac	tgcagggtc	cctgcaatat	ccagatggaa	3000
gatccactt	ttaaagagaa	ttatcgcttc	catgcaatca	atggctacat	aatggataca	3060
ctacctggct	tagtaatggc	tcaggatcaa	aggattcgat	ggtatctgct	cagcatgggc	3120
agcaatgaaa	acatccattc	tattcatttc	agtggacatg	tgttcaactgt	acgaaaaaaa	3180

```

gaggagtata aaatggcact gtacaatctc tatccaggtg tttttgagac agtggaaatg 3240
ttaccatcca aagctggaat ttggcgggtg gaatgcctta ttggcgagca tctacatgct 3300
gggatgagca cactttttct ggtgtacagc aataagtgtc agactcccct gggaatggct 3360
tctggacaca ttagagattt tcagattaca gcttcaggac aatatggaca gtgggccccca 3420
aagctggcca gacttcatta ttccggatca atcaatgcct ggagcaccaa ggagcccttt 3480
tcttgatca aggtggatct gttggcacca atgattattc acggcatcaa gacccaggggt 3540
gcccgtcaga agttctccag cctctacatc tctcagttta tcatcatgta tagtcttgat 3600
gggaagaagt ggcagactta tcgaggaaat tccactggaa ccttaatggc cttctttggc 3660
aatgtggatt catctggggt aaaacacaat atttttaacc ctccaattat tgctcgatac 3720
atccgtttgc acccaactca ttatagcatt cgcagcactc ttcgcatgga gttgatgggc 3780
tgtgatttaa atagttgcag catgccattg ggaatggaga gtaaagcaat atcagatgca 3840
cagattactg cttcatccta ctttaccat atgtttgcca cctggtctcc ttcaaaagct 3900
cgacttcacc tccaaggag gagtaatgcc tggagacctc aggtgaataa tccaaaagag 3960
tggctgcaag tggacttcca gaagacaatg aaagtcacag gagtaactac tcaggagagta 4020
aaatctctgc ttaccagcat gtatgtgaag gagttcctca tctccagcag tcaagatggc 4080
catcagtgga ctctcttttt tcagaatggc aaagtaaagg tttttcaggg aaatcaagac 4140
tccttcacac ctgtgggtgaa ctctctagac ccaccgttac tgactcgcta ctttcgaatt 4200
cacccccaga gttgggtgca ccagattgcc ctgaggatgg aggttctggg ctgagaggca 4260
caggacctct actga 4275

```

<210> 4

<211> 1424

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Val His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val

ES 2 376 022 T3

85										90					95				
Ser	Leu	His	Ala 100	Val	Gly	Val	Ser	Tyr 105	Trp	Lys	Ala	Ser	Glu 110	Gly	Ala				
Glu	Tyr	Asp 115	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln 120	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp 125	Asp	Lys	Val				
Phe	Pro 130	Gly	Gly	Ser	His	Thr 135	Tyr	Val	Trp	Gln	Val 140	Leu	Lys	Glu	Asn				
Gly 145	Pro	Met	Ala	Ser	Asp 150	Pro	Leu	Cys	Leu	Thr 155	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ser 160				
His	Val	Asp	Leu	Val 165	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser 170	Gly	Leu	Ile	Gly	Ala 175	Leu				
Leu	Val	Cys	Arg 180	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala 185	Lys	Glu	Lys	Thr	Gln 190	Thr	Leu				
His	Lys	Phe 195	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala 200	Val	Phe	Asp	Glu	Gly 205	Lys	Ser	Trp				
His	Ser 210	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser 215	Leu	Met	Gln	Asp	Arg 220	Asp	Ala	Ala	Ser				
Ala 225	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys 230	Met	His	Thr	Val	Asn 235	Gly	Tyr	Val	Asn	Arg 240				
Ser	Leu	Pro	Gly	Leu 245	Ile	Gly	Cys	His	Arg 250	Lys	Ser	Val	Tyr	Trp 255	His				
Val	Ile	Gly	Met 260	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu 265	Val	His	Ser	Ile	Phe 270	Leu	Glu				
Gly	His	Thr 275	Phe	Leu	Val	Arg	Asn 280	His	Arg	Gln	Ala	Ser 285	Leu	Glu	Ile				
Ser	Pro 290	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr 295	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu 300	Met	Asp	Leu	Gly				
Gln 305	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys 310	His	Ile	Ser	Ser	His 315	Gln	His	Asp	Gly	Met 320				
Glu	Ala	Tyr	Val	Lys 325	Val	Asp	Ser	Cys	Pro 330	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu 335	Arg				
Met	Lys	Asn 340	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp 345	Tyr	Asp	Asp	Asp	Leu 350	Thr	Asp				
Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Phe				

355					360					365					
Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	Trp	Val	His
	370					375					380				
Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	Leu	Val	Leu
385				390						395					400
Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	Gly	Pro
				405					410					415	
Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met	Ala	Tyr	Thr
			420					425					430		
Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	Ser	Gly	Ile
		435					440					445			
Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile
	450					455					460				
Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	His	Gly	Ile
465					470					475					480
Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	Val	Lys
				485					490					495	
His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Tyr	Lys
			500					505					510		
Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys
		515					520					525			
Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala
	530					535					540				
Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp
545					550					555					560
Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Leu	Phe
				565					570					575	
Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn	Ile	Gln
			580					585					590		
Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Phe
		595					600					605			
Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	Phe	Asp	Ser
	610					615					620				
Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ile	Leu

625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
660 665 670

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
690 695 700

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
725 730 735

Ile Glu Pro Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu
740 745 750

Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp
755 760 765

Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln
770 775 780

Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp
785 790 795 800

Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser
805 810 815

Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp
820 825 830

Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu
835 840 845

Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met
850 855 860

Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
865 870 875 880

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys
885 890 895

Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln

ES 2 376 022 T3

900										905										910																																			
His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala																																								
		915					920					925																																											
Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile																																								
	930					935					940																																												
Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly																																								
945					950					955					960																																								
Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp																																								
				965					970						975																																								
Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg																																								
			980					985				990																																											
Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr																																								
		995					1000					1005																																											
Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly																																									
	1010					1015					1020																																												
Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser																																									
	1025					1030					1035																																												
Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His																																									
	1040					1045					1050																																												
Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr																																									
	1055					1060					1065																																												
Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser																																									
	1070					1075					1080																																												
Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu																																									
	1085					1090					1095																																												
His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys																																									
	1100					1105					1110																																												
Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln																																									
	1115					1120					1125																																												
Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala																																									
	1130					1135					1140																																												
Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu																																									
	1145					1150					1155																																												
Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro	Met	Ile	Ile																																									

1160		1165		1170
His Gly 1175	Ile Lys Thr Gln	Gly 1180	Ala Arg Gln Lys	Phe 1185
Tyr Ile 1190	Ser Gln Phe Ile	Ile 1195	Met Tyr Ser Leu	Asp 1200
Trp Gln 1205	Thr Tyr Arg Gly	Asn 1210	Ser Thr Gly Thr	Leu 1215
Phe Gly 1220	Asn Val Asp Ser	Ser 1225	Gly Ile Lys His	Asn 1230
Pro Pro 1235	Ile Ile Ala Arg	Tyr 1240	Ile Arg Leu His	Pro 1245
Ser Ile 1250	Arg Ser Thr Leu	Arg 1255	Met Glu Leu Met	Gly 1260
Asn Ser 1265	Cys Ser Met Pro	Leu 1270	Gly Met Glu Ser	Lys 1275
Asp Ala 1280	Gln Ile Thr Ala	Ser 1285	Ser Tyr Phe Thr	Asn 1290
Thr Trp 1295	Ser Pro Ser Lys	Ala 1300	Arg Leu His Leu	Gln 1305
Asn Ala 1310	Trp Arg Pro Gln	Val 1315	Asn Asn Pro Lys	Glu 1320
Val Asp 1325	Phe Gln Lys Thr	Met 1330	Lys Val Thr Gly	Val 1335
Gly Val 1340	Lys Ser Leu Leu	Thr 1345	Ser Met Tyr Val	Lys 1350
Ile Ser 1355	Ser Ser Gln Asp	Gly 1360	His Gln Trp Thr	Leu 1365
Asn Gly 1370	Lys Val Lys Val	Phe 1375	Gln Gly Asn Gln	Asp 1380
Pro Val 1385	Val Asn Ser Leu	Asp 1390	Pro Pro Leu Leu	Thr 1395
Arg Ile 1400	His Pro Gln Ser	Trp 1405	Val His Gln Ile	Ala 1410
Glu Val	Leu Gly Cys Glu	Ala	Gln Asp Leu Tyr	

1415

1420

<210> 5

<211> 2220

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

gccaccagaa gatactacct ggggtgcagtg gaactgtcat gggactatat gcaaagtgat	60
ctcgggtgagc tgcctgtgga cgcaagatct cctcctagag tgccaaaatc ttttccattc	120
aacacctcag tcgtgtacaa aaagactctg tttgtagaat tcacggttca ctttttcaac	180
atcgctaagc caaggccacc ctggatgggt ctgctaggtc ctaccatcca ggctgagggt	240
tatgatacag tggtcattac acttaagaac atggcttccc atcctgtcag tcttcatgct	300
gttgggtgat cctactggaa agcttctgag ggagctgaat atgatgatca gaccagtcaa	360
agggagaaaag aagatgataa agtcttcctt ggtggaagcc atacatatgt ctggcaggtc	420
ctgaaagaga atggtccaat ggcctctgac ccactgtgcc ttacctactc atatctttct	480
catgtggacc tggtaaaaga cttgaattca ggcctcattg gagccctact agtatgtaga	540
gaagggagtc tggccaagga aaagacacag accttgcaca aattttatact actttttgct	600
gtatttgatg aagggaaaag ttggcactca gaaacaaaga actccttgat gcaggatagg	660
gatgctgcat ctgctcgggc ctggcctaaa atgcacacag tcaatgggta tgtagccagg	720
tctctgccag gtctgattgg atgccacagg aaatcagtct attggcatgt gattggaatg	780
ggcaccactc ctgaagtga ctcaatattc ctggaaggtc acacatttct tgtgaggaac	840
catcgccagg cgtccttgga aatctcgcca ataactttcc ttactgctca aacactcttg	900
atggaccttg gacagtttct actgttttgt catatctctt cccaccaaca tgatggcatg	960
gaagcttatg tcaaagtaga cagctgtcca gaggaacccc aactacgaat gaaaaataat	1020
gaagaagcgg aagactatga tgatgatctt actgattctg aaatggatgt ggtcagggtt	1080
gatgatgaca actctccttc ctttatccaa attcgctcag ttgccaagaa gcatcctaaa	1140
acttgggtac attacattgc tgcgaagag gaggactggg actatgctcc cttagtccctc	1200
gccccgatg acagaagtta taaaagtcaa tatgtgaaca atggccctca gcggattgggt	1260
aggaagtaca aaaaagtccg atttatggca tacacagatg aaaccttta gactcgtgaa	1320
gctattcagc atgaatcagg aatcttggga cctttacttt atggggaagt tggagacaca	1380
ctgttgatta tatttaagaa tcaagcaagc agaccatata acatctaccc tcacggaatc	1440
actgatgtcc gtcctttgta ttcaaggaga ttacaaaag gtgtaaaaca tttgaaggat	1500
tttccaattc tgccaggaga aatattcaaa tataaatgga cagtgactgt agaagatggg	1560
ccaactaaat cagatcctcg gtgcctgacc cgctattact ctagtctcgt taatatggag	1620
agagatctag cttcaggact cattggccct ctctcatct gctacaaaga atctgtagat	1680
caaagaggaa accagataat gtcagacaag aggaatgtca tcctgttttc tgtatttgat	1740
gagaaccgaa gctggtacct cacagagaat atacaacgct ttctcccaa tccagctgga	1800

gtgcagcttg aggatccaga gttccaagcc tccaacatca tgcacagcat caatggctat 1860
 gtttttgata gtttgcagtt gtcagtttgt ttgcatgagg tggcactactg gtacattcta 1920
 agcattggag cacagactga cttcctttct gtcttcttct ctggatatac cttcaaacac 1980
 aaaatggtct atgaagacac actcaccta ttccattct caggagaaac tgtcttcatg 2040
 tcgatggaaa acccaggctct atggattctg ggggtgccaca actcagactt tcggaacaga 2100
 ggcattgaccg ccttactgaa ggtttctagt tgtgacaaga aactgggtga ttattacgag 2160
 gacagttatg aagatatttc agcactacttg ctgagtaaaa acaatgccat tgaaccaaga 2220

<210> 6

<211> 740

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

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

180										185										190										
His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Gly	Lys	Ser	Trp															
		195					200					205																		
His	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser	Leu	Met	Gln	Asp	Arg	Asp	Ala	Ala	Ser															
	210					215					220																			
Ala	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys	Met	His	Thr	Val	Asn	Gly	Tyr	Val	Ala	Arg															
225					230					235					240															
Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Cys	His	Arg	Lys	Ser	Val	Tyr	Trp	His															
				245					250					255																
Val	Ile	Gly	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	Val	His	Ser	Ile	Phe	Leu	Glu															
			260					265					270																	
Gly	His	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Asn	His	Arg	Gln	Ala	Ser	Leu	Glu	Ile															
		275					280					285																		
Ser	Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu	Met	Asp	Leu	Gly															
	290					295					300																			
Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His	Asp	Gly	Met															
305					310					315					320															
Glu	Ala	Tyr	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Arg															
				325					330					335																
Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp	Leu	Thr	Asp															
			340					345					350																	
Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Phe															
		355					360					365																		
Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	Trp	Val	His															
	370					375					380																			
Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	Leu	Val	Leu															
385				390						395					400															
Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	Gly	Pro															
				405					410					415																
Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met	Ala	Tyr	Thr															
			420					425					430																	
Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	Ser	Gly	Ile															
		435					440					445																		
Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile															

450		455		460	
Phe 465	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser 470
		Arg	Pro	Tyr	Asn 475
				Ile	Tyr 480
				Pro	His
				Gly	Ile 480
Thr	Asp	Val	Arg	Pro 485	Leu
				Tyr	Ser
				Arg	Arg 490
				Leu	Pro
				Lys	Gly
				Val	Lys 495
His	Leu	Lys	Asp 500	Phe	Pro
				Ile	Leu
				Pro 505	Gly
				Glu	Ile
				Phe	Lys 510
				Tyr	Lys
Trp	Thr	Val 515	Thr	Val	Glu
				Asp	Gly 520
				Pro	Thr
				Lys	Ser
				Asp 525	Pro
				Arg	Cys
Leu	Thr 530	Arg	Tyr	Tyr	Ser
				Ser 535	Phe
				Val	Asn
				Met	Glu 540
				Arg	Asp
				Leu	Ala
Ser 545	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro 550
				Leu	Leu
				Ile	Cys
				Tyr 555	Lys
				Glu	Ser
				Val	Asp 560
Gln	Arg	Gly	Asn	Gln 565	Ile
				Met	Ser
				Asp	Lys 570
				Arg	Asn
				Val	Ile
				Leu 575	Phe
Ser	Val	Phe	Asp 580	Glu	Asn
				Arg	Ser
				Trp 585	Tyr
				Leu	Thr
				Glu	Asn 590
				Ile	Gln
Arg	Phe	Leu 595	Pro	Asn	Pro
				Ala	Gly
				Val	Gln
				Leu	Glu
				Asp 605	Pro
				Glu	Phe
Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met
				His 615	Ser
				Ile	Asn
				Gly	Tyr 620
				Val	Phe
				Asp	Ser
Leu 625	Gln	Leu	Ser	Val	Cys 630
				Leu	His
				Glu	Val
				Ala 635	Tyr
				Trp	Tyr
				Ile	Leu 640
Ser	Ile	Gly	Ala	Gln 645	Thr
				Asp	Phe
				Leu	Ser
				Val 650	Phe
				Phe	Ser
				Gly 655	Tyr
Thr	Phe	Lys	His 660	Lys	Met
				Val	Tyr
				Glu 665	Asp
				Thr	Leu
				Thr	Leu 670
				Phe	Pro
Phe	Ser	Gly 675	Glu	Thr	Val
				Phe	Met
				680	Ser
				Met	Glu
				Asn	Pro
				Gly 685	Leu
				Trp	
Ile	Leu 690	Gly	Cys	His	Asn
				Ser 695	Asp
				Phe	Arg
				Asn	Arg
				Gly 700	Met
				Thr	Ala
Leu 705	Leu	Lys	Val	Ser	Ser 710
				Cys	Asp
				Lys	Asn
				Thr 715	Gly
				Asp	Tyr
				Tyr	Glu 720
Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile
				Ser	Ala
				Tyr	Leu
				Leu	Ser
				Lys	Asn
				Asn	Ala

725

730

735

Ile Glu Pro Arg
740

<210> 7

<211> 1932

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

agctttcaaa agaaaacacg acactatattt attgctgcag tggagaggct ctgggattat	60
gggatgagta gctccccaca tgttctaaga aacagggctc agagtggcag tgtccctcag	120
ttcaagaaag ttgtttttcca ggaattttact gatggctcct ttactcagcc cttataaccgt	180
ggagaactaa atgaacattt gggactcctg gggccatata taagagcaga agttgaagat	240
aatatcatgg taacttttcag aaatcaggcc tctcgtccct attcctttcta ttctagcctt	300
atttcttatg aggaagatca gaggaagga gcagaacctt gaaaaaactt tgtcaagcct	360
aatgaaacca aaacttactt ttggaaagtg caacatcata tggcaccac taaagatgag	420
tttgactgca aagcctgggc ttattttctt gatgttgacc tggaaaaaga tgtgcactca	480
ggcctgattg gaccccttct ggtctgccac actaacacac tgaaccctgc tcatgggaga	540
caagtgcag tacaggaatt tgctctgttt ttcacatctt ttgatgagac caaaagctgg	600
tacttactg aaaatatgga aagaaactgc agggctccct gcaatatcca gatggaagat	660
cccactttta aagagaatta tcgcttccat gcaatcaatg gctacataat ggatacacta	720
cctggcttag taatggctca ggatcaaagg attcgatggt atctgctcag catgggcagc	780
aatgaaaaca tccattctat tcatttcagt ggacatgtgt tcaactgtacg aaaaaagag	840
gagtataaaa tggcactgta caatctctat ccagggtgttt ttgagacagt ggaaatgtta	900
ccatccaaag ctggaatttg gcgggtggaa tgccttattg gcgagcatct acatgctggg	960
atgagcacac tttttctggt gtacagcaat aagtgtcaga ctccccctggg aatggcttct	1020
ggacacatta gagattttca gattacagct tcaggacaat atggacagtg ggccccaag	1080
ctggccagac ttcatatttc cggatcaatc aatgcctgga gcaccaagga gcccttttct	1140
tggatcaagg tggatctgtt ggcaccaatg attattcacg gcatcaagac ccagggtgcc	1200
cgtcagaagt tctccagcct ctacatctct cagtttatca tcatgtatag tcttgatggg	1260
aagaagtggc agacttatcg aggagcctcc actggaacct taatgggtctt ctttggaat	1320
gtggattcat ctgggataaa acacaatatt ttttaaccctc caattattgc tcgatacatc	1380
cgtttgcacc caactcatta tagcattcgc agcactcttc gcatggagtt gatgggctgt	1440
gatttaaata gttgcagcat gccattggga atggagagta aagcaatatc agatgcacag	1500
attactgctt catcctactt taccaatatg tttgccacct ggtctccttc aaaagctcga	1560
cttcacctcc aagggaggag taatgcctgg agacctcagg tgaataatcc aaaagagtgg	1620
ctgcaagtgg acttccagaa gacaatgaaa gtcacaggag taactactca gggagtaaaa	1680
tctctgctta ccagcatgta tgtgaaggag ttcctcatct ccagcagtca agatggccat	1740
cagtggactc tcttttttca gaatggcaaa gtaaagggtt ttcagggaaa tcaagactcc	1800
ttcacacctg tgggtgaactc tctagacca cgtttactga ctcgtacct tcgaattcac	1860
ccccagagtt ggggtcacca gattgccctg aggatggagg ttctgggctg cgaggcacag	1920
gacctctact ga	1932

<210> 8

<211> 643

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

195					200					205					
Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Lys
	210					215					220				
Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu
225					230					235					240
Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu
				245					250					255	
Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His
			260					265					270		
Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn
		275					280					285			
Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala
	290					295					300				
Gly	Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly
305					310					315					320
Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu
				325					330					335	
Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly
			340					345					350		
Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly
		355					360					365			
Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val
	370					375					380				
Asp	Leu	Leu	Ala	Pro	Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile	Lys	Thr	Gln	Gly	Ala
385					390					395					400
Arg	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr
				405					410					415	
Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Ala	Ser	Thr	Gly
			420					425					430		
Thr	Leu	Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His
		435					440					445			
Asn	Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro
	450					455					460				
Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly	Cys

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

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg
 1 5 10 15

Ser Thr

<210> 10

10 <211> 573

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe
 1          5          10          15

Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp
          20          25          30

Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser
          35          40          45

Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro His Gly Leu Ser
 50          55          60

Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro
 65          70          75

Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser Glu Met Thr His
          85          90          95

Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val Phe Thr Pro Glu
          100          105          110

Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala
          115          120          125

Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn
          130          135          140

Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn
          145          150          155          160

Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His Tyr Asp Ser Gln
          165          170          175

Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser
          180          185          190

Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu
          195          200          205

Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val
          210          215          220

Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys Arg Ala His Gly
          225          230          235          240

Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser
          245          250          255

Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys
          260          265          270

```

Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val
 275 280 285
 Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro
 290 295 300
 Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg
 305 310 315 320
 Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met
 325 330 335
 Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro
 340 345 350
 Asp Met Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp
 355 360 365
 Ile Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro
 370 375 380
 Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly
 385 390 395 400
 Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu
 405 410 415
 Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg
 420 425 430
 Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His
 435 440 445
 Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr Leu
 450 455 460
 Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr Gly Thr
 465 470 475 480
 Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val
 485 490 495
 Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg
 500 505 510
 Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys His Thr Ala His Phe
 515 520 525
 Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr
 530 535 540

ES 2 376 022 T3

Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn
545 550 555 560

Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser Lys Arg
565 570

<210> 11

<211> 2220

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

```

gccaccagaa gatactacct ggggtgcagtg gaactgtcat gggactatat gcaaagtgat      60
ctcgggtgagc tgcctgtgga cgcaagattt cctcctagag tgccaaaatc ttttccattc     120
aacacctcag tcgtgtacaa aaagactctg tttgtagaat tcacggttca ccttttcaac      180
atcgctaagc caaggccacc ctggatgggt ctgctaggtc ctaccatcca ggctgagggt      240
tatgatacag tggtcattac acttaagaac atggcttccc atcctgtcag tcttcattgct      300
gttggtgtat cctactggaa agcttctgag ggagctgaat atgatgatca gaccagtcaa      360
agggagaaag aagatgataa agtcttccct ggtggaagcc atacatatgt ctggcagggtc     420
ctgaaagaga atgggtccaa ggccctctgac ccaactgtgc ttacctactc atatctttct     480
catgtggacc tggtaaaaga cttgaattca ggccctcatt gagccctact agtatgtaga      540
gaaggaggatc tggccaagga aaagacacag accttgcaca aatttatact actttttgct      600
gtatttgatg aagggaagag ttggcactca gaaacaaaga actccttgat gcaggatagg      660
gatgtgcatc ctgctcgggc ctggcctaaa atgcacacag tcaatgggta tgtacagagg      720
tctctgccag gtctgattgg atgccacagg aaatcagtct attggcatgt gattggaatg      780
ggcaccactc ctgaagtgca ctcaatatc ctggaagggt acacatttct tgtgaggaac      840
catcgccagg cgtccttgga aatctcgcca ataactttcc ttactgctca aacactcttg      900
atggaccttg gacagtttct actgttttgt catatctctt cccaccaaca tgatggcatg      960
gaagcttatg tcaaagtaga cagctgtcca gaggaacccc aactacgaat gaaaaataat     1020
gaagaagcgg aagactatga tgatgatctt actgattctg aaatggatgt ggtcagggtt     1080
gatgatgaca actctccttc ctttatccaa attcgctcag ttgccaagaa gcatcctaaa     1140
acttgggtac attacattgc tgctgaagag gaggactggg actatgctcc cttagtccctc     1200
gccccgatg acagaagtta taaaagtcaa tatttgaaca atggccctca gcggattgggt     1260
aggaagtaca aaaaagtccg atttatggca tacacagatg aaacctttaa gactcgtgaa     1320
gctattcagc atgaatcagg aatcttggga cttttacttt atggggaagt tggagacaca     1380
ctgttgatta tatttaagaa tcaagcaagc agaccatata acatctaccc tcacggaatc     1440
actgatgtcc gtcctttgta ttcaaggaga ttacaaaag gtgtaaaaca tttgaaggat     1500
tttccaattc tgccaggaga aatattcaaa tataaatgga cagtgactgt agaagatggg     1560
ccaactaaat cagatcctcg gtgcctgacc cgctattact ctagtttcgt taatatggag     1620

```

```

agagatctag cttcaggact cattggccct ctccatcatct gctacaaaga atctgtagat 1680
caaagaggaa accagataat gtcagacaag aggaatgtca tcctgttttc tgtatttgat 1740
gagaaccgaa gctggtacct cacagagaat atacaacgct ttctcccaa tccagctgga 1800
gtgcagcttg aggatccaga gttccaagcc tccaacatca tgcacagcat caatggctat 1860
gtttttgata gtttgagtt gtcagtttgt ttgcatgagg tggcatactg gtacattcta 1920
agcattggag cacagactga cttcctttct gtcttcttct ctggatatac cttcaaacac 1980
aaaatggctt atgaagacac actcacccta ttcccattct caggagaaac tgtcttcatg 2040
tcgatggaaa acccaggtct atggattctg ggggtgccaca actcagactt tcggaacaga 2100
ggcatgaccg cttactgaa ggtttctagt tgtgacaaga aactgggtga ttattacgag 2160
gacagttatg aagatatttc agcatacttg ctgagtaaaa acaatgccat tgaaccaaga 2220

```

<210> 12

<211> 740

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
 1 5 10 15
 Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
 20 25 30
 Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
 35 40 45
 Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Val His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
 50 55 60
 Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
 65 70 75 80
 Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
 85 90 95
 Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
 100 105 110
 Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
 115 120 125
 Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
 130 135 140
 Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
 145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
 165 170 175
 Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
 180 185 190
 His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
 195 200 205
 His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
 210 215 220
 Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Gln Arg
 225 230 235 240
 Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255
 Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270
 Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
 275 280 285
 Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
 290 295 300
 Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
 305 310 315 320
 Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
 325 330 335
 Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
 340 345 350
 Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
 355 360 365
 Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
 370 375 380
 Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
 385 390 395 400
 Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
 405 410 415
 Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
 420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445
 Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460
 Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480
 Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495
 His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510
 Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525
 Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540
 Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560
 Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575
 Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590
 Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605
 Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620
 Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640
 Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655
 Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
 660 665 670
 Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685
 Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
725 730 735

Ile Glu Pro Arg
740

<210> 13

<211> 1932

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

agctttcaaa	agaaaacacg	acactat	ttt	attgctgcag	tggagaggct	ctgggattat	60
gggatgagta	gctccccaca	tggtctaaga	aacagggtc	agagtggcag	tgtccctcag		120
ttcaagaaag	ttgttttcca	ggaatttact	gatggctcct	ttactcagcc	cttataccgt		180
ggagaactaa	atgaacat	ttt	gggactcctg	gggccatata	taagagcaga	agttgaagat	240
aatatcatgg	taactttcag	aaatcaggcc	tctcgtccct	attccttcta	ttctagcctt		300
atttcttatg	aggaagatca	gaggcaagga	gcagaacct	gaaaaaactt	tgtcaagcct		360
aatgaaacca	aaacttactt	ttggaaagt	caacatcata	tggcaccac	taaagatgag		420
tttgactgca	aagcctgggc	ttatttctct	gatgttgacc	tggaaaaaga	tgtgcactca		480
ggcctgattg	gaccccttct	ggtctgccac	actaacacac	tgaaccctgc	tcatgggaga		540
caagtgcag	tacaggaatt	tgctctgttt	ttcaccatct	ttgatgagac	caaaagctgg		600
tacttactg	aaaatatgga	aagaaactgc	agggctccct	gcaatatcca	gatggaagat		660
cccactttta	aagagaatta	tcgcttccat	gcaatcaatg	gctacataat	ggatacacta		720
cctggcttag	taatggctca	ggatcaaagg	attcgatgg	atctgctcag	catgggcagc		780
aatgaaaaca	tccattctat	tcatttcagt	ggacatgtgt	tcactgtacg	aaaaaaagag		840
gagtataaaa	tggcactgta	caatctctat	ccagggtgtt	ttgagacagt	ggaaatgtta		900
ccatccaaag	ctggaatttg	gcgggtggaa	tgctttattg	gcgagcatct	acatgctggg		960
atgagcacac	tttttctggt	gtacagcaat	aagtgtcaga	ctcccctggg	aatggcttct		1020
ggacacatta	gagattttca	gattacagct	tcaggacaat	atggacagt	ggcccaaag		1080
ctggccagac	ttcattat	tc	cgatcaatc	aatgcctgga	gcaccaagga	gcccttttct	1140
tggatcaagg	tggatctgtt	ggcaccaatg	attattcacg	gcatcaagac	ccagggtgcc		1200
cgtcagaagt	tctccagcct	ctacatctct	cagtttatca	tcattgtatag	tcttgatggg		1260
aagaagtggc	agacttatcg	aggacagtcc	actggaacct	taatggtctt	ctttggcaat		1320
gtggattcat	ctgggataaa	acacaatatt	tttaaccctc	caattattgc	tcgatacatc		1380
cgtttgcacc	caactcatta	tagcattcgc	agcactcttc	gcatggagtt	gatgggctgt		1440
gatttaaata	gttgcagcat	gccattggga	atggagagta	aagcaatatc	agatgcacag		1500

attactgctt catcctactt taccaatatg tttgccacct ggtctccttc aaaagctcga	1560
cttcacctcc aaggaggagg taatgcctgg agacctcagg tgaataatcc aaaagagtgg	1620
ctgcaagtgg acttccagaa gacaatgaaa gtcacaggag taactactca gggagtaaaa	1680
tctctgctta ccagcatgta tgtgaaggag ttcctcatct ccagcagtca agatggccat	1740
cagtggaactc tcttttttca gaatggcaaa gtaaagggtt ttcagggaat tcaagactcc	1800
ttcacacctg tggatgaactc tctagacca ccgttactga ctcgctacct tcgaattcac	1860
ccccagagtt gggatgcacca gattgccctg aggatggagg ttctgggctg cgaggcacag	1920
gacctctact ga	1932

<210> 14

<211> 643

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

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

Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr
 180 185 190
 Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg
 195 200 205
 Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
 210 215 220
 Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu
 225 230 235 240
 Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu
 245 250 255
 Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His
 260 265 270
 Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn
 275 280 285
 Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala
 290 295 300
 Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly
 305 310 315 320
 Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu
 325 330 335
 Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly
 340 345 350
 Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly
 355 360 365
 Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val
 370 375 380
 Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala
 385 390 395 400
 Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr
 405 410 415
 Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Gln Ser Thr Gly
 420 425 430
 Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His
 435 440 445

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

REIVINDICACIONES

1. Una proteína FVIII con actividad procoagulante que incluye un polipéptido FVIII modificado cuya modificación comprende la sustitución o delección de al menos un aminoácido seleccionado del grupo formado por asparagina 239, asparagina 2118, serina 241 y treonina 2120, comprendiendo dicha modificación preferentemente al menos
 - 5 - la sustitución de la asparagina 239 por un aminoácido seleccionado del grupo formado por alanina, glicina, serina, glutamina, treonina, ácido aspártico o ácido glutámico y preferentemente por alanina o glutamina;
 - la sustitución de la asparagina 2118 por un aminoácido seleccionado del grupo formado por alanina, serina, glutamina, treonina, ácido aspártico o ácido glutámico y preferentemente por alanina o glutamina;
 - la sustitución de la asparagina 239 y la asparagina 2118 por alanina o glutamina;
- 10 - la sustitución de la asparagina 239 por alanina y la asparagina 2118 por glutamina
- la sustitución de la asparagina 239 por glutamina y la asparagina 2118 por alanina
2. Una proteína FVIII según la reivindicación 1, en la que la modificación de dicho polipéptido FVIII modificado incluye además la delección de todo o parte del dominio B descrito en SEQ ID N°: 10
- 15 3. Una proteína FVIII según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el polipéptido FVIII modificado incluye al menos una de ambas:
 - (i) la secuencia de ácidos nucleicos descrita en SEQ ID N°: 6; y/o
 - (ii) la secuencia de ácidos nucleicos descrita en SEQ ID N°: 8
- 20 4. Una molécula aislada de ácidos nucleicos o una secuencia aislada modificada de ácidos nucleicos que codifica la proteína FVIII de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que dicha secuencia de ácidos nucleicos o secuencia modificada de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido FVIII modificado incluye al menos una de las siguientes:
 - (i) la secuencia de ácidos nucleicos descrita en SEQ ID N°: 5; y/o
 - (ii) la secuencia de ácidos nucleicos descrita en SEQ ID N°: 7
- 25 5. La molécula de ácidos nucleicos complementaria de la molécula de ácidos nucleicos aislada de la reivindicación 4.
6. Un vector de expresión que incluye una molécula aislada de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.
7. Una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6 o que expresa la proteína FVIII de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 30 8. Un organismo transgénico no humano que expresa la proteína FVIII de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, siendo seleccionado preferiblemente dicho organismo entre un microorganismo, un animal, un mamífero o una planta.
9. Una composición que incluye una proteína FVIII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, preferiblemente una composición farmacéutica o liofilizada y más preferiblemente que incluya un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Un método para la producción de una proteína FVIII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que incluye los pasos de:
 - 35 a) Hacer crecer en un cultivo una célula hospedadora transformada o transfectada con la molécula de ácidos nucleicos de la reivindicación 4 ó 5, o con una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína FVIII como la de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y
 - b) aislar de la célula hospedadora y/o del medio de cultivo la proteína FVIII resultante de la expresión de la molécula de ácidos nucleicos.
- 40 11. La proteína FVIII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una deficiencia de FVIII, siendo dicha enfermedad preferentemente hemofilia A o hemofilia adquirida.
12. El uso de una proteína FVIII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de un medicamento para tratar hemofilia A o hemofilia adquirida.

Figura 1

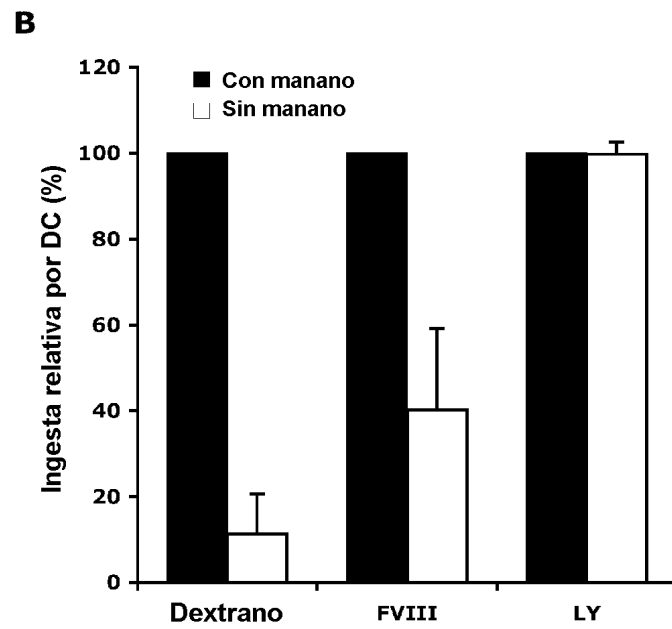
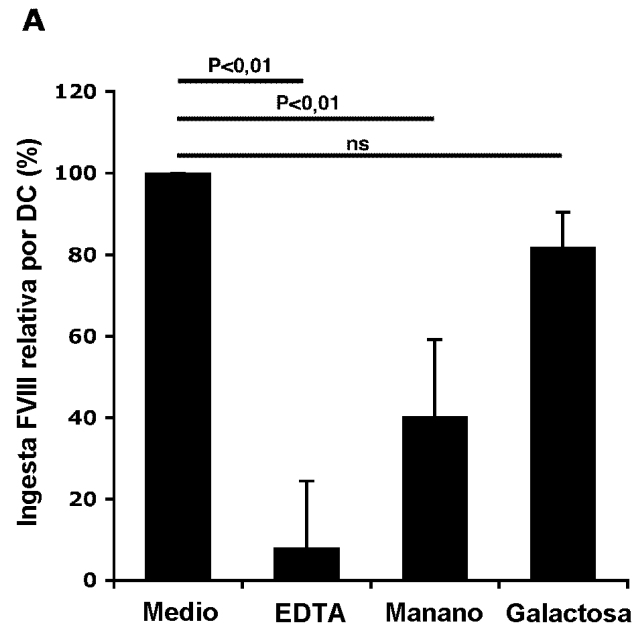
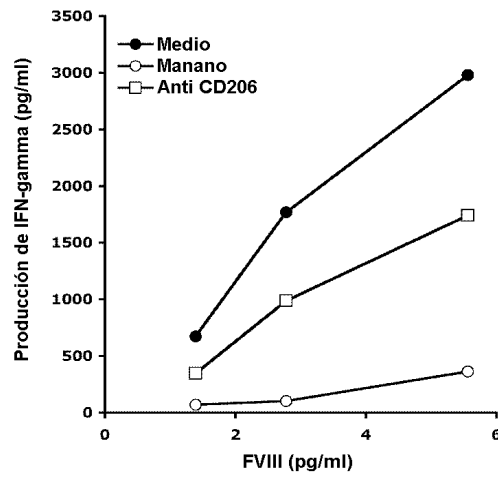
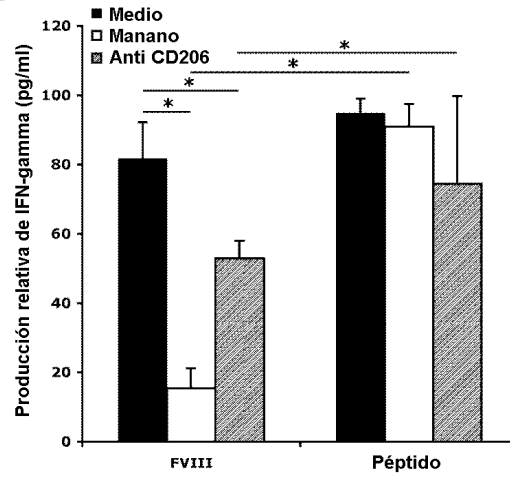


Figura 2

A



B



C

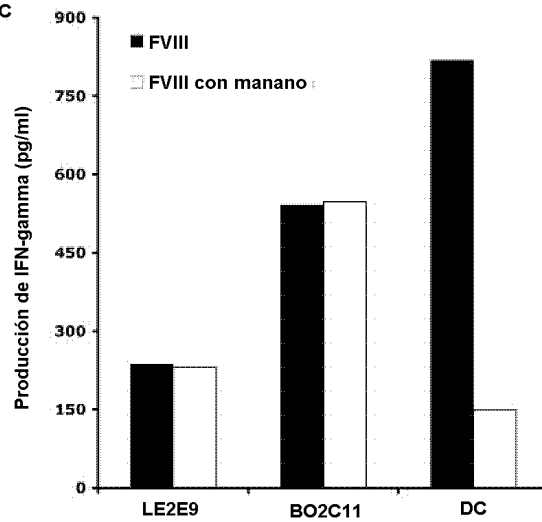


Figura 3

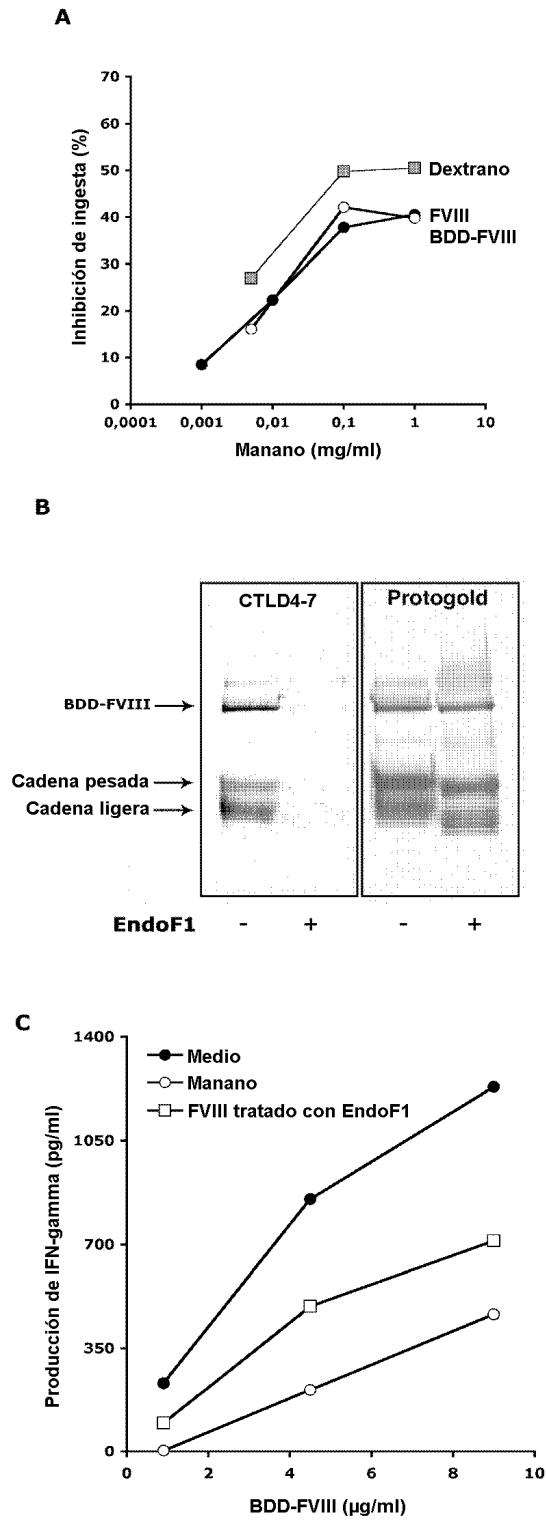


Figura 4

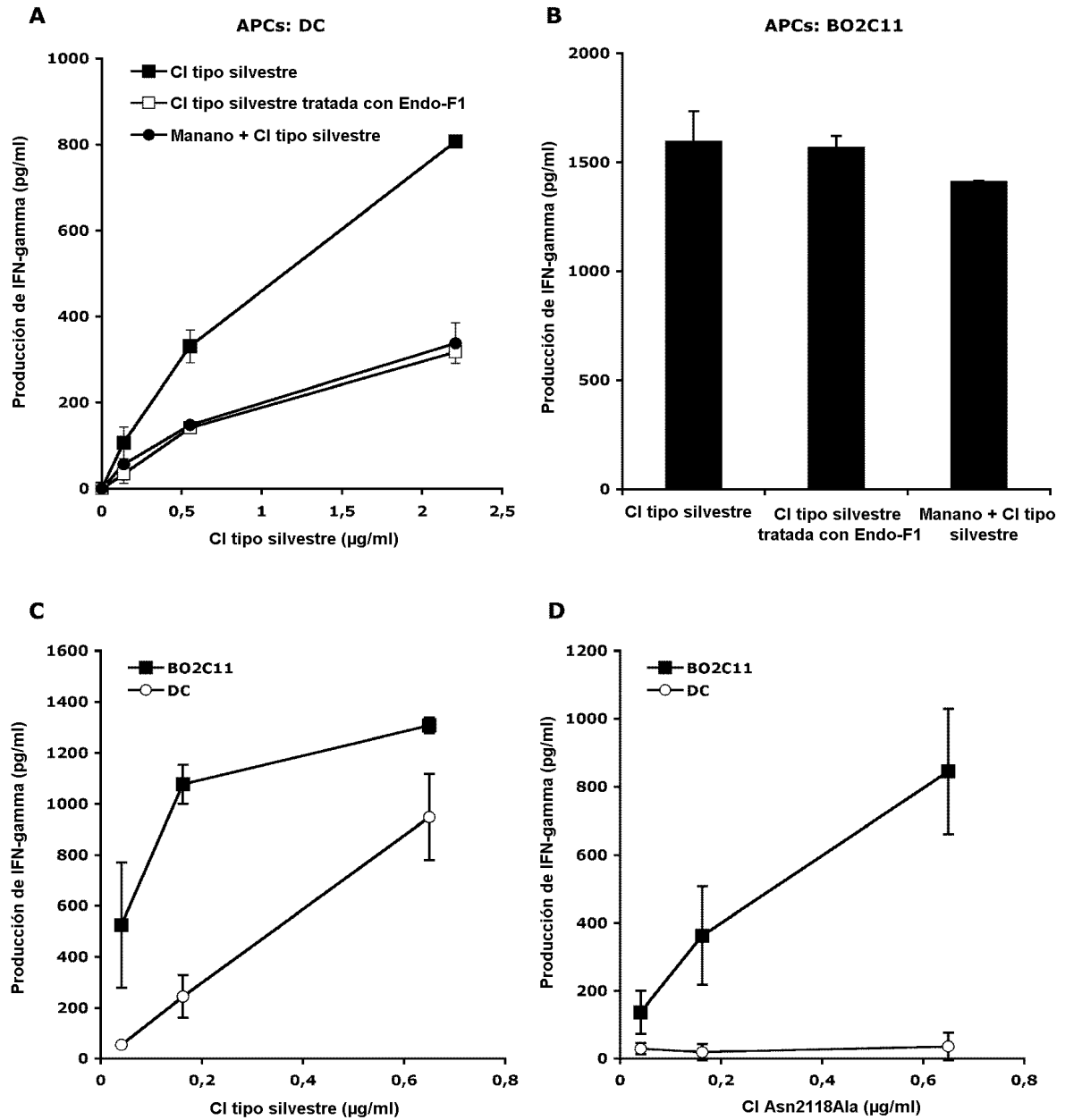


Figura 5

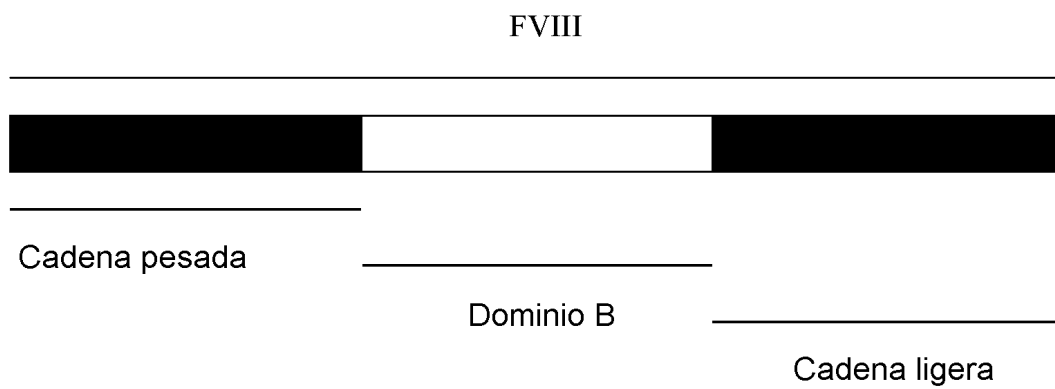


Figura 6

Longitud completa nativa hFVIII (ID SEC. N.º: 1):

```

1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL GELPVDARFP PRVPKSFPFN
61  TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY DTVVITLKNM ASHPVSLHAV
121 GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH
181 VDLVKDLNSG LIGALLVCRE GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD
241 AASARAWPKM HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE EPQLRMKNNE
361 EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA
421 PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL
481 LIIFKNQASR PYNIYPHGIT DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP
541 TKSDPERCLTR YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL HEVAYWYILS
661 IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS MENPGLWLIG CHNSDFRNRG
721 MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL SKNNAIEPRS FSQNSRHPST RQKQFNATTI
781 PENDIEKTD PFAHRTMPK IQNVSSDLL MLLRQSPTPH GLSLSDLQEA KYETFSDDPS
841 PGAIDSNNSL SEMTHFRPQL HHSGDMVFTE ESGQLRLNE KLGTAAATEL KKLDFKVSST
901 SNNLISTIPS DNLAAGTDNT SSLGPPSPMV HYDSQLDTTL FGKKSSPLTE SGGPLSLSEE
961 NNDSKLLSEG LMNSQESSWG KNVSSTESGR LFKGKRAHGP ALLTKDNALF KVSISLLKTN
1021 KTSNNSATNR KTHIDGPSLL IENSPSVWQN ILESDETEFKK VTPLIHDRML MDKNATALRL
1081 NHMSNKTSS KNMEMVQKK EGPIPPDAQN PDMSFFKMLF LPESARWIQR THGKNSLNSG
1141 QGPSFKQLVS LGPEKSVEGQ NFLSEKNKV VGKGEFTKDV GLKEMVFPSS RNLFLTNLDN
1201 LHENNTNQE KKIQEEIEKK ETLIQENNVV PQIHTVTGTK NFMKNLFLS TRQNVESGYD
1261 GAYAPVLQDF RSLNDSTNRT KKHTAHFSKK GEEENLEGLG NQTKQIVEKY ACTTRISPNT
1321 SQQNFVTQRS KRALKQFRLP LEETELEKRI IVDDTSTQWS KNMKHLTPST LTQIDYNEKE
1381 KGAITQSPLS DCLTRSHSIP QANRSPLPIA KVSSFPSIRP IYLTRVLFQD NSSHLPAASY
1441 RKKDSGVQES SHFLQGAKKN NLSLAILTLE MTGDQREVGS LGTSATNSVT YKKVENTVLP
1501 KPDLPKTSGK VELLPKVHIY QKDLFPTETS NGSPGHLDLV EGSLLQGTEG AIKWNEANRP
1561 GKVPFLRVAT ESSAKTPSKL LDPLAWDNHY GTQIPKEEWK SQEKSPEKTA FKKKDTILSL
1621 NACESNHATA AINEGQNKPE IEVTWAKQGR TERLCSQNPP VLKRHQREIT RTTLQSDQEE
1681 IDYDDTISVE MKKEDFDIYD EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR
1741 AQSGSVPPQFK KVVFEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
1801 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD CKAWAYFSDV
1861 DLEKDVHSGI IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT IFDETKSWYF TENMERNARA
1921 PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG LVMAQDQIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH
1981 VFTVRKKEEY KMALYNLYPG VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TFLFLVYSNKC
2041 QTPLGMASGH IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
2101 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRNSTG TLMVFFGNVD SSGIKHNIFN
2161 PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME SKAISDAQIT ASSYFTNMFA
2221 TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL
2281 ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM
2341 EVLGCEAQDL Y

```

Figura 7

BDD-FVIII (ID SEC. N.º: 3):

A	T	R	R	Y	Y	L	G	A	V	E	L	S	W	D	Y	M	Q	18
GCC	ACC	AGA	AGA	TAC	TAC	CTG	GGT	GCA	GTG	GAA	CTG	TCA	TGG	GAC	TAT	ATG	CAA	54
S	D	L	G	E	L	P	V	D	A	R	F	P	P	R	V	P	K	36
AGT	GAT	CTC	GGT	GAG	CTG	CCT	GTG	GAC	GCA	AGA	TTT	CCT	CCT	AGA	GTG	CCA	AAA	108
S	F	P	F	N	T	S	V	V	Y	K	K	T	L	F	V	E	F	54
TCT	TTT	CCA	TTC	AAC	ACC	TCA	GTC	GTG	TAC	AAA	AAG	ACT	CTG	TTT	GTA	GAA	TTC	162
T	V	H	L	F	N	I	A	K	P	R	P	P	W	M	G	L	L	72
ACG	GTT	CAC	CTT	TTC	AAC	ATC	GCT	AAG	CCA	AGG	CCA	CCC	TGG	ATG	GGT	CTG	CTA	216
G	P	T	I	Q	A	E	V	Y	D	T	V	V	I	T	L	K	N	90
GGT	CCT	ACC	ATC	CAG	GCT	GAG	GTT	TAT	GAT	ACA	GTG	GTC	ATT	ACA	CTT	AAG	AAC	270
M	A	S	H	P	V	S	L	H	A	V	G	V	S	Y	W	K	A	108
ATG	GCT	TCC	CAT	CCT	GTC	AGT	CTT	CAT	GCT	GTT	GGT	GTA	TCC	TAC	TGG	AAA	GCT	324
S	E	G	A	E	Y	D	D	Q	T	S	Q	R	E	K	E	D	D	126
TCT	GAG	GGA	GCT	GAA	TAT	GAT	GAT	CAG	ACC	AGT	CAA	AGG	GAG	AAA	GAA	GAT	GAT	378
K	V	F	P	G	G	S	H	T	Y	V	W	Q	V	L	K	E	N	144
AAA	GTC	TTC	CCT	GGT	GGA	AGC	CAT	ACA	TAT	GTC	TGG	CAG	GTC	CTG	AAA	GAG	AAT	432
G	P	M	A	S	D	P	L	C	L	T	Y	S	Y	L	S	H	V	162
GGT	CCA	ATG	GCC	TCT	GAC	CCA	CTG	TGC	CTT	ACC	TAC	TCA	TAT	CTT	TCT	CAT	GTG	486
D	L	V	K	D	L	N	S	G	L	I	G	A	L	L	V	C	R	180
GAC	CTG	GTA	AAA	GAC	TTG	AAT	TCA	GGC	CTC	ATT	GGA	GCC	CTA	CTA	GTA	TGT	AGA	540
E	G	S	L	A	K	E	K	T	Q	T	L	H	K	F	I	L	L	198
GAA	GGG	AGT	CTG	GCC	AAG	GAA	AAG	ACA	CAG	ACC	TTG	CAC	AAA	TTT	ATA	CTA	CTT	594
F	A	V	F	D	E	G	K	S	W	H	S	E	T	K	N	S	L	216
TTT	GCT	GTA	TTT	GAT	GAA	GGG	AAA	AGT	TGG	CAC	TCA	GAA	ACA	AAG	AAC	TCC	TTG	648
M	Q	D	R	D	A	A	S	A	R	A	W	P	K	M	H	T	V	234
ATG	CAG	GAT	AGG	GAT	GCT	GCA	TCT	GCT	CGG	GCC	TGG	CCT	AAA	ATG	CAC	ACA	GTC	702
N	G	Y	V	N	R	S	L	P	G	L	I	G	C	H	R	K	S	252
AAT	GGT	TAT	GTA	AAC	AGG	TCT	CTG	CCA	GGT	CTG	ATT	GGA	TGC	CAC	AGG	AAA	TCA	756
V	Y	W	H	V	I	G	M	G	T	T	P	E	V	H	S	I	F	270
GTC	TAT	TGG	CAT	GTG	ATT	GGA	ATG	GGC	ACC	ACT	CCT	GAA	GTG	CAC	TCA	ATA	TTC	810
L	E	G	H	T	F	L	V	R	N	H	R	Q	A	S	L	E	I	288
CTC	GAA	GGT	CAC	ACA	TTT	CTT	GTG	AGG	AAC	CAT	CGC	CAG	GCG	TCC	TTG	GAA	ATC	864
S	P	I	T	F	L	T	A	Q	T	L	L	M	D	L	G	Q	F	306
TCG	CCA	ATA	ACT	TTC	CTT	ACT	GCT	CAA	ACA	CTC	TTG	ATG	GAC	CTT	GGA	CAG	TTT	918
L	L	F	C	H	I	S	S	H	Q	H	D	G	M	E	A	Y	V	324
CTA	CTG	TTT	TGT	CAT	ATC	TCT	TCC	CAC	CAA	CAT	GAT	GGC	ATG	GAA	GCT	TAT	GTC	972
K	V	D	S	C	P	E	E	P	Q	L	R	M	K	N	N	E	E	342
AAA	GTA	GAC	AGC	TGT	CCA	GAG	GAA	CCC	CAA	CTA	CGA	ATG	AAA	AAT	AAT	GAA	GAA	1026
A	E	D	Y	D	D	D	L	T	D	S	E	M	D	V	V	R	F	360
GCG	GAA	GAC	TAT	GAT	GAT	GAT	CTT	ACT	GAT	TCT	GAA	ATG	GAT	GTG	GTC	AGG	TTT	1080

ES 2 376 022 T3

D	D	D	N	S	P	S	F	I	Q	I	R	S	V	A	K	K	H	378
GAT	GAT	GAC	AAC	TCT	CCT	TCC	TTT	ATC	CAA	ATT	CGC	TCA	GTT	GCC	AAG	AAG	CAT	1134
P	K	T	W	V	H	Y	I	A	A	E	E	E	D	W	D	Y	A	396
CCT	AAA	ACT	TGG	GTA	CAT	TAC	ATT	GCT	GCT	GAA	GAG	GAG	GAC	TGG	GAC	TAT	GCT	1188
P	L	V	L	A	P	D	D	R	S	Y	K	S	Q	Y	L	N	N	414
CCC	TTA	GTC	CTC	GCC	CCC	GAT	GAC	AGA	AGT	TAT	AAA	AGT	CAA	TAT	TTG	AAC	AAT	1242
G	P	Q	R	I	G	R	K	Y	K	K	V	R	F	M	A	Y	T	432
GGC	CCT	CAG	CGG	ATT	GGT	AGG	AAG	TAC	AAA	AAA	GTC	CGA	TTT	ATG	GCA	TAC	ACA	1296
D	E	T	F	K	T	R	E	A	I	Q	H	E	S	G	I	L	G	450
GAT	GAA	ACC	TTT	AAG	ACT	CGT	GAA	GCT	ATT	CAG	CAT	GAA	TCA	GGA	ATC	TTG	GGA	1350
P	L	L	Y	G	E	V	G	D	T	L	L	I	I	F	K	N	Q	468
CCT	TTA	CTT	TAT	GGG	GAA	GTT	GGA	GAC	ACA	CTG	TTG	ATT	ATA	TTT	AAG	AAT	CAA	1404
A	S	R	P	Y	N	I	Y	P	H	G	I	T	D	V	R	P	L	486
GCA	AGC	AGA	CCA	TAT	AAC	ATC	TAC	CCT	CAC	GGA	ATC	ACT	GAT	GTC	CGT	CCT	TTG	1458
Y	S	R	R	L	P	K	G	V	K	H	L	K	D	F	P	I	L	504
TAT	TCA	AGG	AGA	TTA	CCA	AAA	GGT	GTA	AAA	CAT	TTG	AAG	GAT	TTT	CCA	ATT	CTG	1512
P	G	E	I	F	K	Y	K	W	T	V	T	V	E	D	G	P	T	522
CCA	GGA	GAA	ATA	TTC	AAA	TAT	AAA	TGG	ACA	GTG	ACT	GTA	GAA	GAT	GGG	CCA	ACT	1566
K	S	D	P	R	C	L	T	R	Y	Y	S	S	F	V	N	M	E	540
AAA	TCA	GAT	CCT	CGG	TGC	CTG	ACC	CGC	TAT	TAC	TCT	AGT	TTC	GTT	AAT	ATG	GAG	1620
R	D	L	A	S	G	L	I	G	P	L	L	I	C	Y	K	E	S	558
AGA	GAT	CTA	GCT	TCA	GGA	CTC	ATT	GGC	CCT	CTC	CTC	ATC	TGC	TAC	AAA	GAA	TCT	1674
V	D	Q	R	G	N	Q	I	M	S	D	K	R	N	V	I	L	F	576
GTA	GAT	CAA	AGA	GGA	AAC	CAG	ATA	ATG	TCA	GAC	AAG	AGG	AAT	GTC	ATC	CTG	TTT	1728
S	V	F	D	E	N	R	S	W	Y	L	T	E	N	I	Q	R	F	594
TCT	GTA	TTT	GAT	GAG	AAC	CGA	AGC	TGG	TAC	CTC	ACA	GAG	AAT	ATA	CAA	CGC	TTT	1782
L	P	N	P	A	G	V	Q	L	E	D	P	E	F	Q	A	S	N	612
CTC	CCC	AAT	CCA	GCT	GGA	GTG	CAG	CTT	GAG	GAT	CCA	GAG	TTC	CAA	GCC	TCC	AAC	1836
I	M	H	S	I	N	G	Y	V	F	D	S	L	Q	L	S	V	C	630
ATC	ATG	CAC	AGC	ATC	AAT	GGC	TAT	GTT	TTT	GAT	AGT	TTG	CAG	TTG	TCA	GTT	TGT	1890
L	H	E	V	A	Y	W	Y	I	L	S	I	G	A	Q	T	D	F	648
TTG	CAT	GAG	GTG	GCA	TAC	TGG	TAC	ATT	CTA	AGC	ATT	GGA	GCA	CAG	ACT	GAC	TTC	1944
L	S	V	F	F	S	G	Y	T	F	K	H	K	M	V	Y	E	D	666
CTT	TCT	GTC	TTC	TTC	TCT	GGA	TAT	ACC	TTC	AAA	CAC	AAA	ATG	GTC	TAT	GAA	GAC	1998
T	L	T	L	F	P	F	S	G	E	T	V	F	M	S	M	E	N	684
ACA	CTC	ACC	CTA	TTC	CCA	TTC	TCA	GGA	GAA	ACT	GTC	TTC	ATG	TCG	ATG	GAA	AAC	2052
P	G	L	W	I	L	G	C	H	N	S	D	F	R	N	R	G	M	702
CCA	GGT	CTA	TGG	ATT	CTG	GGG	TGC	CAC	AAC	TCA	GAC	TTT	CGG	AAC	AGA	GGC	ATG	2106
T	A	L	L	K	V	S	S	C	D	K	N	T	G	D	Y	Y	E	720
ACC	GCC	TTA	CTG	AAG	GTT	TCT	AGT	TGT	GAC	AAG	AAC	ACT	GGT	GAT	TAT	TAC	GAG	2160
D	S	Y	E	D	I	S	A	Y	L	L	S	K	N	N	A	I	E	738
GAC	AGT	TAT	GAA	GAT	ATT	TCA	GCA	TAC	TTG	CTG	AGT	AAA	AAC	AAT	GCC	ATT	GAA	2214

ES 2 376 022 T3

P	R	E	I	T	R	T	T	L	Q	S	D	Q	E	E	I	D	Y	756
CCA	AGA	GAA	ATA	ACT	CGT	ACT	ACT	CTT	CAG	TCA	GAT	CAA	GAG	GAA	ATT	GAC	TAT	2268
D	D	T	I	S	V	E	M	K	K	E	D	F	D	I	Y	D	E	774
GAT	GAT	ACC	ATA	TCA	GTT	GAA	ATG	AAG	AAG	GAA	GAT	TTT	GAC	ATT	TAT	GAT	GAG	2322
D	E	N	Q	S	P	R	S	F	Q	K	K	T	R	H	Y	F	I	792
GAT	GAA	AAT	CAG	AGC	CCC	CGC	AGC	TTT	CAA	AAG	AAA	ACA	CGA	CAC	TAT	TTT	ATT	2376
A	A	V	E	R	L	W	D	Y	G	M	S	S	S	P	H	V	L	810
GCT	GCA	GTG	GAG	AGG	CTC	TGG	GAT	TAT	GGG	ATG	AGT	AGC	TCC	CCA	CAT	GTT	CTA	2430
R	N	R	A	Q	S	G	S	V	P	Q	F	K	K	V	V	F	Q	828
AGA	AAC	AGG	GCT	CAG	AGT	GGC	AGT	GTC	CCT	CAG	TTC	AAG	AAA	GTT	GTT	TTC	CAG	2484
E	F	T	D	G	S	F	T	Q	P	L	Y	R	G	E	L	N	E	846
GAA	TTT	ACT	GAT	GGC	TCC	TTT	ACT	CAG	CCC	TTA	TAC	CGT	GGA	GAA	CTA	AAT	GAA	2538
H	L	G	L	L	G	P	Y	I	R	A	E	V	E	D	N	I	M	864
CAT	TTG	GGA	CTC	CTG	GGG	CCA	TAT	ATA	AGA	GCA	GAA	GTT	GAA	GAT	AAT	ATC	ATG	2592
V	T	F	R	N	Q	A	S	R	P	Y	S	F	Y	S	S	L	I	882
GTA	ACT	TTC	AGA	AAT	CAG	GCC	TCT	CGT	CCC	TAT	TCC	TTC	TAT	TCT	AGC	CTT	ATT	2646
S	Y	E	E	D	Q	R	Q	G	A	E	P	R	K	N	F	V	K	900
TCT	TAT	GAG	GAA	GAT	CAG	AGG	CAA	GGA	GCA	GAA	CCT	AGA	AAA	AAC	TTT	GTC	AAG	2700
P	N	E	T	K	T	Y	F	W	K	V	Q	H	H	M	A	P	T	918
CCT	AAT	GAA	ACC	AAA	ACT	TAC	TTT	TGG	AAA	GTG	CAA	CAT	CAT	ATG	GCA	CCC	ACT	2754
K	D	E	F	D	C	K	A	W	A	Y	F	S	D	V	D	L	E	936
AAA	GAT	GAG	TTT	GAC	TGC	AAA	GCC	TGG	GCT	TAT	TTC	TCT	GAT	GTT	GAC	CTG	GAA	2808
K	D	V	H	S	G	L	I	G	P	L	L	V	C	H	T	N	T	954
AAA	GAT	GTG	CAC	TCA	GGC	CTG	ATT	GGA	CCC	CTT	CTG	GTC	TGC	CAC	ACT	AAC	ACA	2862
L	N	P	A	H	G	R	Q	V	T	V	Q	E	F	A	L	F	F	972
CTG	AAC	CCT	GCT	CAT	GGG	AGA	CAA	GTG	ACA	GTA	CAG	GAA	TTT	GCT	CTG	TTT	TTC	2916
T	I	F	D	E	T	K	S	W	Y	F	T	E	N	M	E	R	N	990
ACC	ATC	TTT	GAT	GAG	ACC	AAA	AGC	TGG	TAC	TTC	ACT	GAA	AAT	ATG	GAA	AGA	AAC	2970
C	R	A	P	C	N	I	Q	M	E	D	P	T	F	K	E	N	Y	1008
TGC	AGG	GCT	CCC	TGC	AAT	ATC	CAG	ATG	GAA	GAT	CCC	ACT	TTT	AAA	GAG	AAT	TAT	3024
R	F	H	A	I	N	G	Y	I	M	D	T	L	P	G	L	V	M	1026
CGC	TTC	CAT	GCA	ATC	AAT	GGC	TAC	ATA	ATG	GAT	ACA	CTA	CCT	GGC	TTA	GTA	ATG	3078
A	Q	D	Q	R	I	R	W	Y	L	L	S	M	G	S	N	E	N	1044
GCT	CAG	GAT	CAA	AGG	ATT	CGA	TGG	TAT	CTG	CTC	AGC	ATG	GGC	AGC	AAT	GAA	AAC	3132
I	H	S	I	H	F	S	G	H	V	F	T	V	R	K	K	E	E	1062
ATC	CAT	TCT	ATT	CAT	TTC	AGT	GGA	CAT	GTG	TTC	ACT	GTA	CGA	AAA	AAA	GAG	GAG	3186
Y	K	M	A	L	Y	N	L	Y	P	G	V	F	E	T	V	E	M	1080
TAT	AAA	ATG	GCA	CTG	TAC	AAT	CTC	TAT	CCA	GGT	GTT	TTT	GAG	ACA	GTG	GAA	ATG	3240
L	P	S	K	A	G	I	W	R	V	E	C	L	I	G	E	H	L	1098
TTA	CCA	TCC	AAA	GCT	GGA	ATT	TGG	CGG	GTG	GAA	TGC	CTT	ATT	GGC	GAG	CAT	CTA	3294
H	A	G	M	S	T	L	F	L	V	Y	S	N	K	C	Q	T	P	1116
CAT	GCT	GGG	ATG	AGC	ACA	CTT	TTT	CTG	GTG	TAC	AGC	AAT	AAG	TGT	CAG	ACT	CCC	3348

ES 2 376 022 T3

L	G	M	A	S	G	H	I	R	D	F	Q	I	T	A	S	G	Q	1134
CTG	GGA	ATG	GCT	TCT	GGA	CAC	ATT	AGA	GAT	TTT	CAG	ATT	ACA	GCT	TCA	GGA	CAA	3402
Y	G	Q	W	A	P	K	L	A	R	L	H	Y	S	G	S	I	N	1152
TAT	GGA	CAG	TGG	GCC	CCA	AAG	CTG	GCC	AGA	CTT	CAT	TAT	TCC	GGA	TCA	ATC	AAT	3456
A	W	S	T	K	E	P	F	S	W	I	K	V	D	L	L	A	P	1170
GCC	TGG	AGC	ACC	AAG	GAG	CCC	TTT	TCT	TGG	ATC	AAG	GTG	GAT	CTG	TTG	GCA	CCA	3510
M	I	I	H	G	I	K	T	Q	G	A	R	Q	K	F	S	S	L	1188
ATG	ATT	ATT	CAC	GGC	ATC	AAG	ACC	CAG	GGT	GCC	CGT	CAG	AAG	TTC	TCC	AGC	CTC	3564
Y	I	S	Q	F	I	I	M	Y	S	L	D	G	K	K	W	Q	T	1206
TAC	ATC	TCT	CAG	TTT	ATC	ATC	ATG	TAT	AGT	CTT	GAT	GGG	AAG	AAG	TGG	CAG	ACT	3618
Y	R	G	N	S	T	G	T	L	M	V	F	F	G	N	V	D	S	1224
TAT	CGA	GGA	AAT	TCC	ACT	GGA	ACC	TTA	ATG	GTC	TTC	TTT	GGC	AAT	GTG	GAT	TCA	3672
S	G	I	K	H	N	I	F	N	P	P	I	I	A	R	Y	I	R	1242
TCT	GGG	ATA	AAA	CAC	AAT	ATT	TTT	AAC	CCT	CCA	ATT	ATT	GCT	CGA	TAC	ATC	CGT	3726
L	H	P	T	H	Y	S	I	R	S	T	L	R	M	E	L	M	G	1260
TTG	CAC	CCA	ACT	CAT	TAT	AGC	ATT	CGC	AGC	ACT	CTT	CGC	ATG	GAG	TTG	ATG	GGC	3780
C	D	L	N	S	C	S	M	P	L	G	M	E	S	K	A	I	S	1278
TGT	GAT	TTA	AAT	AGT	TGC	AGC	ATG	CCA	TTG	GGA	ATG	GAG	AGT	AAA	GCA	ATA	TCA	3834
D	A	Q	I	T	A	S	S	Y	F	T	N	M	F	A	T	W	S	1296
GAT	GCA	CAG	ATT	ACT	GCT	TCA	TCC	TAC	TTT	ACC	AAT	ATG	TTT	GCC	ACC	TGG	TCT	3888
P	S	K	A	R	L	H	L	Q	G	R	S	N	A	W	R	P	Q	1314
CCT	TCA	AAA	GCT	CGA	CTT	CAC	CTC	CAA	GGG	AGG	AGT	AAT	GCC	TGG	AGA	CCT	CAG	3942
V	N	N	P	K	E	W	L	Q	V	D	F	Q	K	T	M	K	V	1332
GTG	AAT	AAT	CCA	AAA	GAG	TGG	CTG	CAA	GTG	GAC	TTC	CAG	AAG	ACA	ATG	AAA	GTC	3996
T	G	V	T	T	Q	G	V	K	S	L	L	T	S	M	Y	V	K	1350
ACA	GGA	GTA	ACT	ACT	CAG	GGA	GTA	AAA	TCT	CTG	CTT	ACC	AGC	ATG	TAT	GTG	AAG	4050
E	F	L	I	S	S	S	Q	D	G	H	Q	W	T	L	F	F	Q	1368
GAG	TTC	CTC	ATC	TCC	AGC	AGT	CAA	GAT	GGC	CAT	CAG	TGG	ACT	CTC	TTT	TTT	CAG	4104
N	G	K	V	K	V	F	Q	G	N	Q	D	S	F	T	P	V	V	1386
AAT	GGC	AAA	GTA	AAG	GTT	TTT	CAG	GGA	AAT	CAA	GAC	TCC	TTC	ACA	CCT	GTG	GTG	4158
N	S	L	D	P	P	L	L	T	R	Y	L	R	I	H	P	Q	S	1404
AAC	TCT	CTA	GAC	CCA	CCG	TTA	CTG	ACT	CGC	TAC	CTT	CGA	ATT	CAC	CCC	CAG	AGT	4212
W	V	H	Q	I	A	L	R	M	E	V	L	G	C	E	A	Q	D	1422
TGG	GTG	CAC	CAG	ATT	GCC	CTG	AGG	ATG	GAG	GTT	CTG	GGC	TGC	GAG	GCA	CAG	GAC	4266
L	Y	*																1425
CTC	TAC	TGA																4275

Figura 8

HC FVIII (A1a1A2a2) Asn239Ala:

A	T	R	R	Y	Y	L	G	A	V	E	L	S	W	D	Y	M	Q	18
GCC	ACC	AGA	AGA	TAC	TAC	CTG	GGT	GCA	GTG	GAA	CTG	TCA	TGG	GAC	TAT	ATG	CAA	54
S	D	L	G	E	L	P	V	D	A	R	F	P	P	R	V	P	K	36
AGT	GAT	CTC	GGT	GAG	CTG	CCT	GTG	GAC	GCA	AGA	TTT	CCT	CCT	AGA	GTG	CCA	AAA	108
S	F	P	F	N	T	S	V	V	Y	K	K	T	L	F	V	E	F	54
TCT	TTT	CCA	TTC	AAC	ACC	TCA	GTC	GTG	TAC	AAA	AAG	ACT	CTG	TTT	GTA	GAA	TTC	162
T	V	H	L	F	N	I	A	K	P	R	P	P	W	M	G	L	L	72
ACG	GTT	CAC	CTT	TTC	AAC	ATC	GCT	AAG	CCA	AGG	CCA	CCC	TGG	ATG	GGT	CTG	CTA	216
G	P	T	I	Q	A	E	V	Y	D	T	V	V	I	T	L	K	N	90
GGT	CCT	ACC	ATC	CAG	GCT	GAG	GTT	TAT	GAT	ACA	GTG	GTC	ATT	ACA	CTT	AAG	AAC	270
M	A	S	H	P	V	S	L	H	A	V	G	V	S	Y	W	K	A	108
ATG	GCT	TCC	CAT	CCT	GTC	AGT	CTT	CAT	GCT	GTT	GGT	GTA	TCC	TAC	TGG	AAA	GCT	324
S	E	G	A	E	Y	D	D	Q	T	S	Q	R	E	K	E	D	D	126
TCT	GAG	GGA	GCT	GAA	TAT	GAT	GAT	CAG	ACC	AGT	CAA	AGG	GAG	AAA	GAA	GAT	GAT	378
K	V	F	P	G	G	S	H	T	Y	V	W	Q	V	L	K	E	N	144
AAA	GTC	TTC	CCT	GGT	GGA	AGC	CAT	ACA	TAT	GTC	TGG	CAG	GTC	CTG	AAA	GAG	AAT	432
G	P	M	A	S	D	P	L	C	L	T	Y	S	Y	L	S	H	V	162
GGT	CCA	ATG	GCC	TCT	GAC	CCA	CTG	TGC	CTT	ACC	TAC	TCA	TAT	CTT	TCT	CAT	GTG	486
D	L	V	K	D	L	N	S	G	L	I	G	A	L	L	V	C	R	180
GAC	CTG	GTA	AAA	GAC	TTG	AAT	TCA	GGC	CTC	ATT	GGA	GCC	CTA	CTA	GTA	TGT	AGA	540
E	G	S	L	A	K	E	K	T	Q	T	L	H	K	F	I	L	L	198
GAA	GGG	AGT	CTG	GCC	AAG	GAA	AAG	ACA	CAG	ACC	TTG	CAC	AAA	TTT	ATA	CTA	CTT	594
F	A	V	F	D	E	G	K	S	W	H	S	E	T	K	N	S	L	216
TTT	GCT	GTA	TTT	GAT	GAA	GGG	AAA	AGT	TGG	CAC	TCA	GAA	ACA	AAG	AAC	TCC	TTG	648
M	Q	D	R	D	A	A	S	A	R	A	W	P	K	M	H	T	V	234
ATG	CAG	GAT	AGG	GAT	GCT	GCA	TCT	GCT	CGG	GCC	TGG	CCT	AAA	ATG	CAC	ACA	GTC	702
N	G	Y	V	A	R	S	L	P	G	L	I	G	C	H	R	K	S	252
AAT	GGT	TAT	GTA	GCC	AGG	TCT	CTG	CCA	GGT	CTG	ATT	GGA	TGC	CAC	AGG	AAA	TCA	756
V	Y	W	H	V	I	G	M	G	T	T	P	E	V	H	S	I	F	270
GTC	TAT	TGG	CAT	GTG	ATT	GGA	ATG	GGC	ACC	ACT	CCT	GAA	GTG	CAC	TCA	ATA	TTC	810
L	E	G	H	T	F	L	V	R	N	H	R	Q	A	S	L	E	I	288
CTC	GAA	GGT	CAC	ACA	TTT	CTT	GTG	AGG	AAC	CAT	CGC	CAG	GCG	TCC	TTG	GAA	ATC	864
S	P	I	T	F	L	T	A	Q	T	L	L	M	D	L	G	Q	F	306
TCG	CCA	ATA	ACT	TTC	CTT	ACT	GCT	CAA	ACA	CTC	TTG	ATG	GAC	CTT	GGA	CAG	TTT	918
L	L	F	C	H	I	S	S	H	Q	H	D	G	M	E	A	Y	V	324
CTA	CTG	TTT	TGT	CAT	ATC	TCT	TCC	CAC	CAA	CAT	GAT	GGC	ATG	GAA	GCT	TAT	GTC	972
K	V	D	S	C	P	E	E	P	Q	L	R	M	K	N	N	E	E	342
AAA	GTA	GAC	AGC	TGT	CCA	GAG	GAA	CCC	CAA	CTA	CGA	ATG	AAA	AAT	AAT	GAA	GAA	1026
A	E	D	Y	D	D	D	L	T	D	S	E	M	D	V	V	R	F	360
GCG	GAA	GAC	TAT	GAT	GAT	GAT	CTT	ACT	GAT	TCT	GAA	ATG	GAT	GTG	GTC	AGG	TTT	1080

ES 2 376 022 T3

D	D	D	N	S	P	S	F	I	Q	I	R	S	V	A	K	K	H	378
GAT	GAT	GAC	AAC	TCT	CCT	TCC	TTT	ATC	CAA	ATT	CGC	TCA	GTT	GCC	AAG	AAG	CAT	1134
P	K	T	W	V	H	Y	I	A	A	E	E	E	D	W	D	Y	A	396
CCT	AAA	ACT	TGG	GTA	CAT	TAC	ATT	GCT	GCT	GAA	GAG	GAG	GAC	TGG	GAC	TAT	GCT	1188
P	L	V	L	A	P	D	D	R	S	Y	K	S	Q	Y	L	N	N	414
CCC	TTA	GTC	CTC	GCC	CCC	GAT	GAC	AGA	AGT	TAT	AAA	AGT	CAA	TAT	TTG	AAC	AAT	1242
G	P	Q	R	I	G	R	K	Y	K	K	V	R	F	M	A	Y	T	432
GGC	CCT	CAG	CGG	ATT	GGT	AGG	AAG	TAC	AAA	AAA	GTC	CGA	TTT	ATG	GCA	TAC	ACA	1296
D	E	T	F	K	T	R	E	A	I	Q	H	E	S	G	I	L	G	450
GAT	GAA	ACC	TTT	AAG	ACT	CGT	GAA	GCT	ATT	CAG	CAT	GAA	TCA	GGA	ATC	TTG	GGA	1350
P	L	L	Y	G	E	V	G	D	T	L	L	I	I	F	K	N	Q	468
CCT	TTA	CTT	TAT	GGG	GAA	GTT	GGA	GAC	ACA	CTG	TTG	ATT	ATA	TTT	AAG	AAT	CAA	1404
A	S	R	P	Y	N	I	Y	P	H	G	I	T	D	V	R	P	L	486
GCA	AGC	AGA	CCA	TAT	AAC	ATC	TAC	CCT	CAC	GGA	ATC	ACT	GAT	GTC	CGT	CCT	TTG	1458
Y	S	R	R	L	P	K	G	V	K	H	L	K	D	F	P	I	L	504
TAT	TCA	AGG	AGA	TTA	CCA	AAA	GGT	GTA	AAA	CAT	TTG	AAG	GAT	TTT	CCA	ATT	CTG	1512
P	G	E	I	F	K	Y	K	W	T	V	T	V	E	D	G	P	T	522
CCA	GGA	GAA	ATA	TTC	AAA	TAT	AAA	TGG	ACA	GTG	ACT	GTA	GAA	GAT	GGG	CCA	ACT	1566
K	S	D	P	R	C	L	T	R	Y	Y	S	S	F	V	N	M	E	540
AAA	TCA	GAT	CCT	CGG	TGC	CTG	ACC	CGC	TAT	TAC	TCT	AGT	TTC	GTT	AAT	ATG	GAG	1620
R	D	L	A	S	G	L	I	G	P	L	L	I	C	Y	K	E	S	558
AGA	GAT	CTA	GCT	TCA	GGA	CTC	ATT	GGC	CCT	CTC	CTC	ATC	TGC	TAC	AAA	GAA	TCT	1674
V	D	Q	R	G	N	Q	I	M	S	D	K	R	N	V	I	L	F	576
GTA	GAT	CAA	AGA	GGA	AAC	CAG	ATA	ATG	TCA	GAC	AAG	AGG	AAT	GTC	ATC	CTG	TTT	1728
S	V	F	D	E	N	R	S	W	Y	L	T	E	N	I	Q	R	F	594
TCT	GTA	TTT	GAT	GAG	AAC	CGA	AGC	TGG	TAC	CTC	ACA	GAG	AAT	ATA	CAA	CGC	TTT	1782
L	P	N	P	A	G	V	Q	L	E	D	P	E	F	Q	A	S	N	612
CTC	CCC	AAT	CCA	GCT	GGA	GTG	CAG	CTT	GAG	GAT	CCA	GAG	TTC	CAA	GCC	TCC	AAC	1836
I	M	H	S	I	N	G	Y	V	F	D	S	L	Q	L	S	V	C	630
ATC	ATG	CAC	AGC	ATC	AAT	GGC	TAT	GTT	TTT	GAT	AGT	TTG	CAG	TTG	TCA	GTT	TGT	1890
L	H	E	V	A	Y	W	Y	I	L	S	I	G	A	Q	T	D	F	648
TTG	CAT	GAG	GTG	GCA	TAC	TGG	TAC	ATT	CTA	AGC	ATT	GGA	GCA	CAG	ACT	GAC	TTC	1944
L	S	V	F	F	S	G	Y	T	F	K	H	K	M	V	Y	E	D	666
CTT	TCT	GTC	TTC	TTC	TCT	GGA	TAT	ACC	TTC	AAA	CAC	AAA	ATG	GTC	TAT	GAA	GAC	1998
T	L	T	L	F	P	F	S	G	E	T	V	F	M	S	M	E	N	684
ACA	CTC	ACC	CTA	TTC	CCA	TTC	TCA	GGA	GAA	ACT	GTC	TTC	ATG	TCG	ATG	GAA	AAC	2052
P	G	L	W	I	L	G	C	H	N	S	D	F	R	N	R	G	M	702
CCA	GGT	CTA	TGG	ATT	CTG	GGG	TGC	CAC	AAC	TCA	GAC	TTT	CGG	AAC	AGA	GGC	ATG	2106
T	A	L	L	K	V	S	S	C	D	K	N	T	G	D	Y	Y	E	720
ACC	GCC	TTA	CTG	AAG	GTT	TCT	AGT	TGT	GAC	AAG	AAC	ACT	GGT	GAT	TAT	TAC	GAG	2160
D	S	Y	E	D	I	S	A	Y	L	L	S	K	N	N	A	I	E	738
GAC	AGT	TAT	GAA	GAT	ATT	TCA	GCA	TAC	TTG	CTG	AGT	AAA	AAC	AAT	GCC	ATT	GAA	2214

P R
CCA AGA

Figura 9

LC FVIII (A3C1C2) Asn2118Ala:

S	F	Q	K	K	T	R	H	Y	F	I	A	A	V	E	R	L	W	18
AGC	TTT	CAA	AAG	AAA	ACA	CGA	CAC	TAT	TTT	ATT	GCT	GCA	GTG	GAG	AGG	CTC	TGG	54
D	Y	G	M	S	S	S	P	H	V	L	R	N	R	A	Q	S	G	36
GAT	TAT	GGG	ATG	AGT	AGC	TCC	CCA	CAT	GTT	CTA	AGA	AAC	AGG	GCT	CAG	AGT	GGC	108
S	V	P	Q	F	K	K	V	V	F	Q	E	F	T	D	G	S	F	54
AGT	GTC	CCT	CAG	TTC	AAG	AAA	GTT	GTT	TTC	CAG	GAA	TTT	ACT	GAT	GGC	TCC	TTT	162
T	Q	P	L	Y	R	G	E	L	N	E	H	L	G	L	L	G	P	72
ACT	CAG	CCC	TTA	TAC	CGT	GGA	GAA	CTA	AAT	GAA	CAT	TTG	GGA	CTC	CTG	GGG	CCA	216
Y	I	R	A	E	V	E	D	N	I	M	V	T	F	R	N	Q	A	90
TAT	ATA	AGA	GCA	GAA	GTT	GAA	GAT	AAT	ATC	ATG	GTA	ACT	TTC	AGA	AAT	CAG	GCC	270
S	R	P	Y	S	F	Y	S	S	L	I	S	Y	E	E	D	Q	R	108
TCT	CGT	CCC	TAT	TCC	TTC	TAT	TCT	AGC	CTT	ATT	TCT	TAT	GAG	GAA	GAT	CAG	AGG	324
Q	G	A	E	P	R	K	N	F	V	K	P	N	E	T	K	T	Y	126
CAA	GGA	GCA	GAA	CCT	AGA	AAA	AAC	TTT	GTC	AAG	CCT	AAT	GAA	ACC	AAA	ACT	TAC	378
F	W	K	V	Q	H	H	M	A	P	T	K	D	E	F	D	C	K	144
TTT	TGG	AAA	GTG	CAA	CAT	CAT	ATG	GCA	CCC	ACT	AAA	GAT	GAG	TTT	GAC	TGC	AAA	432
A	W	A	Y	F	S	D	V	D	L	E	K	D	V	H	S	G	L	162
GCC	TGG	GCT	TAT	TTC	TCT	GAT	GTT	GAC	CTG	GAA	AAA	GAT	GTG	CAC	TCA	GGC	CTG	486
I	G	P	L	L	V	C	H	T	N	T	L	N	P	A	H	G	R	180
ATT	GGA	CCC	CTT	CTG	GTC	TGC	CAC	ACT	AAC	ACA	CTG	AAC	CCT	GCT	CAT	GGG	AGA	540
Q	V	T	V	Q	E	F	A	L	F	F	T	I	F	D	E	T	K	198
CAA	GTG	ACA	GTA	CAG	GAA	TTT	GCT	CTG	TTT	TTC	ACC	ATC	TTT	GAT	GAG	ACC	AAA	594
S	W	Y	F	T	E	N	M	E	R	N	C	R	A	P	C	N	I	216
AGC	TGG	TAC	TTC	ACT	GAA	AAT	ATG	GAA	AGA	AAC	TGC	AGG	GCT	CCC	TGC	AAT	ATC	648
Q	M	E	D	P	T	F	K	E	N	Y	R	F	H	A	I	N	G	234
CAG	ATG	GAA	GAT	CCC	ACT	TTT	AAA	GAG	AAT	TAT	CGC	TTC	CAT	GCA	ATC	AAT	GGC	702
Y	I	M	D	T	L	P	G	L	V	M	A	Q	D	Q	R	I	R	252
TAC	ATA	ATG	GAT	ACA	CTA	CCT	GGC	TTA	GTA	ATG	GCT	CAG	GAT	CAA	AGG	ATT	CGA	756
W	Y	L	L	S	M	G	S	N	E	N	I	H	S	I	H	F	S	270
TGG	TAT	CTG	CTC	AGC	ATG	GGC	AGC	AAT	GAA	AAC	ATC	CAT	TCT	ATT	CAT	TTC	AGT	810
G	H	V	F	T	V	R	K	K	E	E	Y	K	M	A	L	Y	N	288
GGA	CAT	GTG	TTC	ACT	GTA	CGA	AAA	AAA	GAG	GAG	TAT	AAA	ATG	GCA	CTG	TAC	AAT	864
L	Y	P	G	V	F	E	T	V	E	M	L	P	S	K	A	G	I	306
CTC	TAT	CCA	GGT	GTT	TTT	GAG	ACA	GTG	GAA	ATG	TTA	CCA	TCC	AAA	GCT	GGA	ATT	918
W	R	V	E	C	L	I	G	E	H	L	H	A	G	M	S	T	L	324
TGG	CGG	GTG	GAA	TGC	CTT	ATT	GGC	GAG	CAT	CTA	CAT	GCT	GGG	ATG	AGC	ACA	CTT	972
F	L	V	Y	S	N	K	C	Q	T	P	L	G	M	A	S	G	H	342
TTT	CTG	GTG	TAC	AGC	AAT	AAG	TGT	CAG	ACT	CCC	CTG	GGA	ATG	GCT	TCT	GGA	CAC	1026
I	R	D	F	Q	I	T	A	S	G	Q	Y	G	Q	W	A	P	K	360
ATT	AGA	GAT	TTT	CAG	ATT	ACA	GCT	TCA	GGA	CAA	TAT	GGA	CAG	TGG	GCC	CCA	AAG	1080

ES 2 376 022 T3

L	A	R	L	H	Y	S	G	S	I	N	A	W	S	T	K	E	P	378
CTG	GCC	AGA	CTT	CAT	TAT	TCC	GGA	TCA	ATC	AAT	GCC	TGG	AGC	ACC	AAG	GAG	CCC	1134
F	S	W	I	K	V	D	L	L	A	P	M	I	I	H	G	I	K	396
TTT	TCT	TGG	ATC	AAG	GTG	GAT	CTG	TTG	GCA	CCA	ATG	ATT	ATT	CAC	GGC	ATC	AAG	1188
T	Q	G	A	R	Q	K	F	S	S	L	Y	I	S	Q	F	I	I	414
ACC	CAG	GGT	GCC	CGT	CAG	AAG	TTC	TCC	AGC	CTC	TAC	ATC	TCT	CAG	TTT	ATC	ATC	1242
M	Y	S	L	D	G	K	K	W	Q	T	Y	R	G	A	S	T	G	432
ATG	TAT	AGT	CTT	GAT	GGG	AAG	AAG	TGG	CAG	ACT	TAT	CGA	GGA	GCC	TCC	ACT	GGA	1296
T	L	M	V	F	F	G	N	V	D	S	S	G	I	K	H	N	I	450
ACC	TTA	ATG	GTC	TTC	TTT	GGC	AAT	GTG	GAT	TCA	TCT	GGG	ATA	AAA	CAC	AAT	ATT	1350
F	N	P	P	I	I	A	R	Y	I	R	L	H	P	T	H	Y	S	468
TTT	AAC	CCT	CCA	ATT	ATT	GCT	CGA	TAC	ATC	CGT	TTG	CAC	CCA	ACT	CAT	TAT	AGC	1404
I	R	S	T	L	R	M	E	L	M	G	C	D	L	N	S	C	S	486
ATT	CGC	AGC	ACT	CTT	CGC	ATG	GAG	TTG	ATG	GGC	TGT	GAT	TTA	AAT	AGT	TGC	AGC	1458
M	P	L	G	M	E	S	K	A	I	S	D	A	Q	I	T	A	S	504
ATG	CCA	TTG	GGA	ATG	GAG	AGT	AAA	GCA	ATA	TCA	GAT	GCA	CAG	ATT	ACT	GCT	TCA	1512
S	Y	F	T	N	M	F	A	T	W	S	P	S	K	A	R	L	H	522
TCC	TAC	TTT	ACC	AAT	ATG	TTT	GCC	ACC	TGG	TCT	CCT	TCA	AAA	GCT	CGA	CTT	CAC	1566
L	Q	G	R	S	N	A	W	R	P	Q	V	N	N	P	K	E	W	540
CTC	CAA	GGG	AGG	AGT	AAT	GCC	TGG	AGA	CCT	CAG	GTG	AAT	AAT	CCA	AAA	GAG	TGG	1620
L	Q	V	D	F	Q	K	T	M	K	V	T	G	V	T	T	Q	G	558
CTG	CAA	GTG	GAC	TTC	CAG	AAG	ACA	ATG	AAA	GTC	ACA	GGA	GTA	ACT	ACT	CAG	GGA	1674
V	K	S	L	L	T	S	M	Y	V	K	E	F	L	I	S	S	S	576
GTA	AAA	TCT	CTG	CTT	ACC	AGC	ATG	TAT	GTG	AAG	GAG	TTC	CTC	ATC	TCC	AGC	AGT	1728
Q	D	G	H	Q	W	T	L	F	F	Q	N	G	K	V	K	V	F	594
CAA	GAT	GGC	CAT	CAG	TGG	ACT	CTC	TTT	TTT	CAG	AAT	GGC	AAA	GTA	AAG	GTT	TTT	1782
Q	G	N	Q	D	S	F	T	P	V	V	N	S	L	D	P	P	L	612
CAG	GGA	AAT	CAA	GAC	TCC	TTC	ACA	CCT	GTG	GTG	AAC	TCT	CTA	GAC	CCA	CCG	TTA	1836
L	T	R	Y	L	R	I	H	P	Q	S	W	V	H	Q	I	A	L	630
CTG	ACT	CGC	TAC	CTT	CGA	ATT	CAC	CCC	CAG	AGT	TGG	GTG	CAC	CAG	ATT	GCC	CTG	1890
R	M	E	V	L	G	C	E	A	Q	D	L	Y	*					644
AGG	ATG	GAG	GTT	CTG	GGC	TGC	GAG	GCA	CAG	GAC	CTC	TAC	TGA					1932

Figura 10

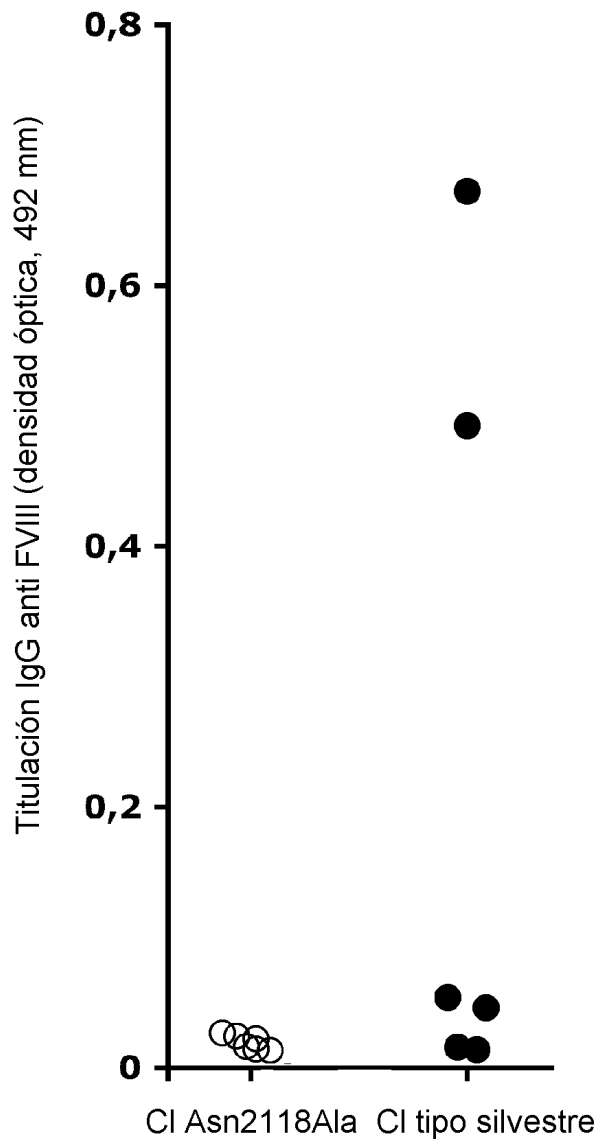


Figura 11

