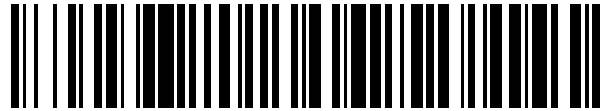


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 464**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/755** (2006.01)

**A61K 38/37** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**G01N 33/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2009 E 09768986 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2291523**

54 Título: **Factor VIII, factor de von Willebrand o sus complejos con semivida in vivo prolongada**

30 Prioridad:

**24.06.2008 EP 08011429**

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

**16.03.2015**

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)  
Emil-von-Behring-Strasse 76  
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**WEIMER, THOMAS;  
SCHULTE, STEFAN;  
METZNER, HUBERT;  
KRONTHALER, ULRICH;  
LIND, HOLGER y  
LANG, WIEGAND**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 531 464 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Factor VIII, factor de von Willebrand o sus complejos con semivida *in vivo* prolongada

**Campo de la invención:**

- 5 La presente invención se refiere a secuencias modificadas de ácido nucleico para el factor de von Willebrand (VWF, por sus siglas en inglés), así como también a sus complejos y sus derivados, a vectores de expresión recombinantes que contienen tales secuencias de ácido nucleico, a células huésped transformadas con tales vectores de expresión recombinantes, a polipéptidos recombinantes y derivados codificados por dichas secuencias de ácido nucleico donde los polipéptidos recombinantes y derivados poseen actividades biológicas junto con una semivida *in vivo* prolongada y/o una recuperación *in vivo* mejorada en comparación con la proteína de origen natural no modificada. La presente invención se refiere además a procesos para la elaboración de tales proteínas recombinantes y sus derivados. La invención también se refiere a un vector de transferencia para su uso en terapia génica humana, que comprende tales secuencias de ácido nucleico.

**Antecedentes de la invención:**

- 15 Existen varios trastornos hemorrágicos provocados por deficiencias de los factores de coagulación de la sangre. Los trastornos más habituales son la hemofilia A y B, que son el resultado de deficiencias del factor de coagulación de la sangre VIII y IX, respectivamente. Otro trastorno hemorrágico conocido es la enfermedad de von Willebrand.

- 20 En plasma, FVIII existe principalmente como un complejo no covalente con VWF y su función coagulante consiste en acelerar la conversión, dependiente del factor IXa, del factor X en Xa. Debido a la formación del complejo de FVIII y VWF, se asumió durante mucho tiempo que las funciones de FVIII y VWF eran dos funciones de la misma molécula. Tan solo en los años 70 resultó obvio que FVIII y VWF eran moléculas diferentes que formaban un complejo en condiciones fisiológicas. A continuación, en los años 80, se determinó la constante de disociación de aproximadamente 0.2 nmol/L (Leyte *et al.*, *Biochem J* 1989, 257: 679-683) y se estudió la secuencia de ADN de ambas moléculas.

- 25 La hemofilia clásica o hemofilia A es un trastorno hemorrágico hereditario. Es el resultado de una deficiencia relacionada con el cromosoma X del factor FVIII de coagulación de la sangre y afecta casi exclusivamente a los hombres con una incidencia comprendida entre uno y dos individuos por cada 10 000. El defecto en el cromosoma X es transmitido por portadores femeninos que no son hemofílicos de por sí. La manifestación clínica de la hemofilia A consiste en una mayor tendencia a sufrir hemorragias. Antes de que se introdujera el tratamiento con concentrados de FVIII, la esperanza de vida media para una persona con hemofilia grave era inferior a 20 años. El uso de concentrados de FVIII procedentes de plasma ha mejorado de forma considerable la situación para los pacientes con hemofilia A, aumentando la esperanza de vida media considerablemente y proporcionando a la mayoría de ellos la posibilidad de vivir una vida más o menos normal. A pesar de ello, han habido ciertos problemas con los concentrados derivados de plasma y su uso, los más serios de los cuales han sido la transmisión de virus. Hasta ahora, los virus que provocan la hepatitis B, hepatitis que no sea de tipo A ni B y el SIDA han provocado estragos en la población. Desde entonces, se han desarrollado recientemente distintos métodos de desactivación de virus y nuevos concentrados de FVIII altamente purificados, los cuales establecen un estándar de seguridad muy elevado también para FVIII derivado de plasma.

- 40 La clonación de ADNc para FVIII (Wood *et al.* 1984. *Nature* 312:330-336; Vehar *et al.* 1984. *Nature* 312:337-342) permitió expresar FVIII de forma recombinante, lo cual llevó al desarrollo de varios productos de FVIII recombinantes, los cuales fueron aprobados por las autoridades reguladoras entre 1992 y 2003. El hecho de que el dominio B central de la cadena polipeptídica de FVIII que reside entre los aminoácidos Arg-740 y Glu-1649 no parece ser necesario para obtener la actividad biológica completa también ha llevado al desarrollo de un FVIII con el dominio B suprimido.

- 45 La molécula de FVIII madura está constituida por 2332 aminoácidos, los cuales se pueden agrupar en tres dominios A homólogos, dos dominios C homólogos y un dominio B, los cuales están dispuestos en el siguiente orden: A1-A2-B-A3-C1-C2. La secuencia de aminoácidos completa de FVIII humano maduro se muestra en la SEQ ID NO:15. Durante su secreción en el plasma, FVIII es procesado intracelularmente para obtener una serie de heterodímeros unidos a iones metálicos a medida que FVIII monocatenario es escindido en la frontera de B-A3 y en diferentes sitios del dominio B. Este procesamiento proporciona moléculas heterogéneas de cadena pesada constituidas por el dominio A1, A2 y varias partes del dominio B, las cuales tienen un tamaño molecular comprendido entre 90 kDa y 200 kDa. Las cadenas pesadas están unidas mediante un ión metálico a las cadenas ligeras, que están constituidas por el dominio A3, C1 y C2 (Saenko *et al.* 2002. *Vox Sang.* 83:89-96). En plasma, este FVIII heterodimérico se une con afinidad elevada al factor de von Willebrand (VWF), el cual lo protege contra un metabolismo prematuro. La semivida de FVIII no activado unido a VWF es de aproximadamente 12 horas en plasma.

El factor FVIII de coagulación se activa mediante la escisión proteolítica por parte de FXa y trombina en los aminoácidos Arg372 y Arg740 de la cadena pesada y en Arg1689 de la cadena ligera, lo cual provoca la liberación del factor de von Willebrand y la generación del heterotrímero de FVIII activado, el cual formará el complejo tenasa sobre superficies de fosfolípidos con FIXa y FX, siempre que haya  $Ca^{2+}$  presente. El heterotrímero está constituido por el dominio A1, un fragmento de 50 kDa, el dominio A2, un fragmento de 43 kDa, y la cadena ligera (A3-C1-C2), un fragmento de 73 kDa. De este modo, la forma activa de FVIII (FVIIIa) está constituida por una subunidad A1 asociada a través de la unión a un ion metálico divalente a una cadena ligera A3-C1-C2 escindida por la trombina y una subunidad A2 libre asociada de forma relativamente débil con el dominio A1 y A3.

Para evitar una coagulación excesiva, FVIIIa debe ser desactivado poco después de su activación. No se considera que la desactivación de FVIIIa por parte de la Proteína C activada (APC, por sus siglas en inglés) mediante la escisión en Arg336 y Arg562 sea un paso limitante de la velocidad importante. En su lugar, se cree que es la disociación de la subunidad A2 unida covalentemente del heterotrímero la que constituye el paso limitante de la velocidad en la desactivación de FVIIIa tras la activación de la trombina (Fay *et al.* 1991. *J. Biol. Chem.* 266 8957, Fay y Smudzin 1992. *J. Biol. Chem.* 267:13246-50). Este es un proceso rápido, lo cual explica la corta semivida de FVIIIa en plasma, que es tan solo de 2.1 minutos (Saenko *et al.* 2002. *Vox Sang.* 83:89-96).

En pacientes con hemofilia A grave sometidos a un tratamiento profiláctico, FVIII debe ser administrado por vía intravenosa (i.v.) aproximadamente 3 veces por semana, debido a la corta semivida en plasma de FVIII de aproximadamente 12 a 14 horas. Cada administración i.v. es molesta, se asocia con dolor y conlleva el riesgo de infección, especialmente debido a que principalmente se la realizan en casa los mismos pacientes o los padres de los niños a los que se les ha diagnosticado hemofilia A.

Por lo tanto, sería muy deseable crear un FVIII con una mayor semivida funcional, lo cual permitiría la elaboración de composiciones farmacéuticas que contuvieran FVIII, las cuales se deberían administrar con menos frecuencia.

Se han realizado varios intentos de prolongar la semivida de FVIII no activado, ya sea reduciendo su interacción con receptores celulares (WO 03/093313A2, WO 02/060951A2), uniendo polímeros covalentemente a FVIII (WO 94/15625, WO 97/11957 y US 4970300), encapsulando FVIII (WO 99/55306), introduciendo sitios de unión a metales novedosos (WO 97/03193), uniendo covalentemente el dominio A2 al dominio A3 ya sea mediante un enlace peptídico (WO 97/40145 y WO 03/087355) o de tipo disulfuro (WO 02/103024A2) o uniendo covalentemente el dominio A1 al dominio A2 (WO2006/108590).

Otra estrategia para mejorar la semivida funcional de FVIII o VWF consiste en la PEGilación de FVIII (WO 2007/126808, WO 2006/053299, WO 2004/075923) o la PEGilación de VWF (WO 2006/071801), donde el VWF pegilado, al tener una mayor semivida, también mejoraría de forma indirecta la semivida de FVIII presente en plasma.

El factor VWF, el cual se encuentra ausente, funcionalmente defectuoso o únicamente disponible en una cantidad reducida en diferentes formas de la enfermedad de von Willebrand (VWD, por sus siglas en inglés), es una glucoproteína adhesiva multimérica presente en el plasma de los mamíferos, que presenta múltiples funciones fisiológicas. Durante la hemostasis primaria, VWF actúa como mediador entre receptores específicos sobre la superficie de las plaquetas y componentes de la matriz extracelular tales como el colágeno. Además, VWF actúa como portador y proteína estabilizante para FVIII procoagulante. El factor VWF se sintetiza en las células endoteliales y megacariocitos como una molécula precursora de 2813 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADNc de VWF de origen natural se describen en Collins *et al.* 1987, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 84:4393-4397. El polipéptido precursor, pre-pro-VWF, está constituido por un péptido señal de 22 residuos, un propéptido de 741 residuos y el polipéptido de 2050 residuos que se encuentra en VWF en plasma maduro (Fischer *et al.*, *FEBS Lett.* 351: 345-348, 1994). Después de la escisión del péptido señal en el retículo endoplasmático, se forma un puente disulfuro C-terminal entre dos monómeros de VWF. Durante el transporte adicional a través de la vía secretora, se añaden 12 cadenas laterales de carbohidratos unidas a N y 10 unidas a O. Cabe destacar que los dímeros de VWF se multimerizan mediante los puentes disulfuro N-terminales y el propéptido de 741 aminoácidos de longitud es escindido por la enzima PACE/furina en el aparato de Golgi tardío. El propéptido, así como también los multímeros de elevado peso molecular de VWF (VWF-HMWM), se almacenan en los cuerpos de Weibel-Pallade de las células endoteliales o en los Gránulos  $\alpha$  de las plaquetas.

Una vez secretada en el plasma, la proteasa ADAMTS13 escinde VWF en el dominio A1 de VWF. Por consiguiente, VWF en plasma está constituido por un intervalo completo de multímeros que van desde dímeros individuales de 500 kDa hasta multímeros constituidos por más de 20 dímeros de un peso molecular superior a 10 000 kDa. En la presente, VWF-HMWM presenta la actividad hemostática más potente, que se puede medir según la actividad del cofactor ristocetina (VWF:RCo). Cuanto mayor sea la proporción de VWF:RCo/antígeno VWF, mayor será la cantidad relativa de multímeros de peso molecular elevado.

Los defectos en VWF provocan la enfermedad de von Willebrand (VWD), la cual se caracteriza por un fenotipo hemorrágico más o menos pronunciado. La VWD de tipo 3 es la forma más grave, en la cual VWF está totalmente

ausente; la VWD de tipo 1 se relaciona con una pérdida cuantitativa de VWF y su fenotipo puede ser muy leve. La VWD de tipo 2 se relaciona con defectos cualitativos de VWF y puede ser tan grave como la VWD de tipo 3. La VWD de tipo 2 presenta muchas subformas, algunas de las cuales se asocian con la pérdida o la reducción de multímeros de peso molecular elevado. La VWD de tipo 2a se caracteriza por una pérdida de multímeros tanto grandes como intermedios. La VWD de tipo 2B se caracteriza por una pérdida de los multímeros de peso molecular más elevado.

La VWD es el trastorno hemorrágico hereditario más frecuente en los seres humanos y se puede tratar mediante una terapia de reemplazo con concentrados que contengan VWF de origen plasmático o recombinante. El factor VWF se puede preparar a partir de plasma humano según se describe, por ejemplo en EP 05503991. El documento EP 0784632 describe un método para aislar VWF recombinante.

En plasma, FVIII se une con una afinidad elevada a VWF, el cual lo protege contra un catabolismo prematuro y, de este modo, desempeña, además de su función en la hemostasis primaria, una función crucial en la regulación de los niveles en plasma de FVIII y, como consecuencia, también constituye un factor central para controlar la hemostasis secundaria. La semivida de FVIII no activado unido a VWF es de aproximadamente 12 a 14 horas en plasma. En la enfermedad de von Willebrand de tipo 3, en la que no hay o casi no hay VWF presente, la semivida de FVIII es de tan solo aproximadamente 6 horas, lo cual provoca síntomas de hemofilia A de leve a moderada en estos pacientes, debido a la reducción de las concentraciones de FVIII. El efecto estabilizador de VWF sobre FVIII también se ha utilizado para propiciar la expresión recombinante de FVIII en células CHO (Kaufman *et al.* 1989, *Mol Cell Biol*).

Hasta el día de hoy, el tratamiento estándar de la hemofilia A y de VWD implica infusiones intravenosas frecuentes de preparados de FVIII y concentrados de VWF o de concentrados que comprenden un complejo de FVIII y VWF que deriva de plasmas de donantes humanos o, en el caso de FVIII, de preparados farmacéuticos basados en FVIII recombinante. Aunque estas terapias de reemplazo son generalmente eficaces, p. ej., en pacientes con hemofilia A grave sometidos a un tratamiento profiláctico, FVIII se debe administrar por vía intravenosa (i.v.) aproximadamente 3 veces por semana debido a la corta semivida en plasma de FVIII de aproximadamente 12 horas. Ya por encima de niveles de un 1% de la actividad de FVIII en personas no hemofílicas, p. ej., para un aumento de los niveles de FVIII de 0.01 U/mL, la hemofilia A grave se convierte en hemofilia A moderada. En la terapia profiláctica, las pautas posológicas están diseñadas de modo que los niveles de base de la actividad de FVIII no se reduzcan por debajo de niveles de un 2-3% de la actividad de FVIII en personas no hemofílicas. Cada administración i.v. es molesta, se asocia con dolor y conlleva el riesgo de infección, especialmente debido a que es realizada principalmente en un tratamiento en casa por parte de los mismos pacientes o los padres de los niños a los que se les ha diagnosticado hemofilia A. Además, las inyecciones i.v. frecuentes provocan inevitablemente la formación de cicatrices, lo cual interfiere con infusiones futuras. Debido a que el tratamiento profiláctico en la hemofilia grave se inicia en etapas tempranas de la vida, teniendo los niños a menudo menos de 2 años de edad, resulta aún más difícil inyectar FVIII 3 veces por semana en las venas de pacientes tan pequeños. Durante un periodo limitado, el implante de sistemas de puerto puede ofrecer una alternativa. A pesar del hecho de que se pueden producir infecciones repetidas y de que los puertos pueden provocar inconvenientes durante el ejercicio físico, normalmente se consideran favorables a pesar de ello en comparación con las inyecciones intravenosas.

La semivida *in vivo* de VWF humano en la circulación humana es de aproximadamente 12 a 20 horas. En el tratamiento profiláctico de VWD, p. ej., de tipo 3, también sería muy deseable encontrar maneras de prolongar la semivida funcional de VWF.

Otra estrategia para mejorar la semivida funcional de VWF consiste en la PEGilación (WO 2006/071801), donde el VWF pegilado, al tener una mayor semivida, también mejoraría de forma indirecta la semivida de FVIII presente en plasma.

Sin embargo, la conjugación química de PEG u otras moléculas con proteínas terapéuticas siempre conlleva el riesgo de que la actividad específica se reduzca debido a que se cubran importantes sitios de interacción con otras proteínas; la conjugación química añade un paso adicional en la producción de tales proteínas, lo cual reduce los rendimientos finales y hace que la producción sea más costosa. Además, no se conocen los efectos a largo plazo sobre la salud humana, ya que las proteínas terapéuticas PEGiladas que se conocen actualmente no se tienen que administrar durante toda la vida, como sería el caso para un VWF que se administrara en la profilaxis de la enfermedad de von Willebrand o para un FVIII que se administrara en la hemofilia A.

Por lo tanto, sería muy deseable obtener un VWF de vida prolongada que no estuviera modificado químicamente.

En la técnica anterior, se han descrito fusiones de factores de coagulación con albúmina (WO 01/79271), alfa-fetoproteína (WO 2005/024044) e inmunoglobulina (WO 2004/101740) como polipéptidos que mejoran la semivida. Se creía que estos estaban unidos al extremo carboxilo o amino o a ambos extremos del resto proteico terapéutico respectivo, ocasionalmente conectados mediante conectores peptídicos, preferentemente mediante conectores constituidos por glicina y serina.

Ballance *et al.* (WO 01/79271) describieron polipéptidos de fusión N-terminales o C-terminales de una multitud de polipéptidos terapéuticos diferentes fusionados con albúmina de suero humano. Se describen listas exhaustivas de posibles componentes para la fusión sin describir datos experimentales para casi ninguno de estos polipéptidos, tanto si las proteínas de fusión con albúmina respectivas conservan de hecho la actividad biológica y presentan propiedades mejoradas como si no. Entre dicha lista de polipéptidos terapéuticos, también se mencionan FVIII y VWF.

Un experto en la materia no hubiera considerado fusionar albúmina humana con el extremo N-terminal o C-terminal de VWF. En una fusión N-terminal, la parte de la albúmina se escindiría durante el procesamiento del propéptido o, si se omitiera el propéptido, la multimerización no tendría lugar. Como se ha mencionado anteriormente, el extremo C-terminal de VWF es esencial para la dimerización inicial y la secreción, según han demostrado Schneppenheim *et al.* (Schneppenheim R. *et al.* 1996. Defective dimerization of VWF subunits due to a Cys to Arg mutation in VWD type IID. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3581-3586; Schneppenheim R. *et al.* 2001. Expression and characterization of VWF dimerization defects in different types of VWD. *Blood* 97:2059-2066.), Baronciani *et al.* (Baronciani L. *et al.* 2000. Molecular characterization of a multiethnic group of 21 patients with VWD type 3. *Thromb. Haemost* 84:536-540), Enayat *et al.* (Enayat MS *et al.* 2001. Aberrant dimerization of VWF as the result of mutations in the carboxy-terminal region: identification of 3 mutations in members of 3 different families with type 2A (phenotype IID) VWD. *Blood* 98:674-680) y Tjernberg *et al.* 2006. Homozygous C2362F VWF induces intracellular retention of mutant VWF resulting in autosomal recessive severe VWD. *Br J Haematol.* 133:409-418). Por consiguiente, el experto en la técnica no consideraría fusionar una proteína grande como la albúmina humana con el extremo C-terminal o N-terminal de VWF, ya que cabría esperar que la dimerización o multimerización normales de VWF se verían afectadas negativamente. Debido a que los multímeros superiores de VWF son los más activos en la hemostasis primaria, el experto en la técnica hubiera buscado otras formas de prolongar la semivida funcional de VWF.

Se acaba de demostrar que, sorprendentemente, el hecho de fusionar albúmina con la parte C-terminal de VWF no solo permite la expresión y la secreción de proteínas quiméricas de VWF a partir de células de mamífero, sino que también da como resultado moléculas de VWF modificadas que conservan una actividad significativa de VWF y que forman multímeros de peso molecular elevado. Además, tales moléculas de VWF modificadas exhiben una semivida *in vivo* prolongada y/o una recuperación *in vivo* mejorada.

### Descripción de la invención

Un objetivo de esta invención consiste en proporcionar un VWF modificado, así como también complejos de FVIII no modificado con VWF modificado que presenten una semivida *in vivo* mejorada.

La expresión "VWF modificado", en el sentido de la invención, se refiere a polipéptidos de VWF que están fusionados con polipéptidos que mejoran la semivida, los cuales engloban también alelos naturales, variantes, delecciones e inserciones de VWF.

Otro objetivo de esta invención consiste en proporcionar un VWF modificado, así como también complejos de complejos de FVIII no modificado con VWF modificado que presenten una recuperación *in vivo* mejorada.

Otro objetivo de la invención consiste en que este VWF modificado, así como también los complejos de FVIII no modificado con VWF modificado, puedan ser expresados por células de mamífero y conserven sus actividades biológicas respectivas.

En resumen, sorprendentemente el VWF modificado, así como también los complejos de FVIII no modificado con VWF modificado de la invención, han conservado la actividad biológica y han incrementado la semivida *in vivo* y la recuperación *in vivo*.

El VWF modificado, así como también los complejos de FVIII no modificado con moléculas de VWF modificadas de la invención, se pueden generar fusionando un resto de una proteína que mejora la semivida (HLEP, por sus siglas en inglés) con la parte C-terminal de FVIII o la parte C-terminal de VWF.

Las HLEP, en el sentido de la presente invención, se seleccionan a partir de la albúmina.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a VWF modificado, así como también a complejos de FVIII no modificado con VWF modificado, que contienen en la parte C-terminal del VWF modificado una fusión con albúmina, que se caracterizan por que el VWF modificado o el complejo de FVIII no modificado con VWF modificado presenta una semivida funcional prolongada en comparación con la semivida funcional del VWF de origen natural o del complejo de VWF de origen natural y FVIII de origen natural.

Otro aspecto de la invención consiste en polinucleótidos o combinaciones de polinucleótidos que codifican el VWF modificado.

La invención se refiere además a plásmidos o vectores que comprenden un polinucleótido descrito en la presente y a células huésped que comprenden un polinucleótido o un plásmido o vector según se describe en la presente.

Otro aspecto de la invención consiste en un método para producir un VWF modificado o un complejo de FVIII no modificado que comprende:

- 5 (a) cultivar células huésped de la invención en condiciones tales que se exprese el factor de coagulación modificado; y
- (b) opcionalmente recuperar el factor de coagulación modificado a partir de las células huésped o a partir del medio de cultivo.

10 La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden un VWF modificado o un complejo de FVIII no modificado con VWF modificado, un polinucleótido o un plásmido o vector descrito en la presente.

Otro aspecto más de la invención consiste en el uso de un VWF modificado o un complejo de FVIII no modificado con VWF modificado, uno o más polinucleótidos, o uno o más plásmidos o vectores, o de células huésped de acuerdo con esta invención, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno de coagulación de la sangre.

### 15 Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un VWF modificado o un complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado, donde el VWF modificado está fusionado en una parte C-terminal del polipéptido de traducción primario de VWF con el ácido de la parte N-terminal de la albúmina.

20 En realizaciones preferidas, la invención se refiere a un VWF modificado o un complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado, donde

- a. el VWF modificado presenta una semivida funcional prolongada en comparación con la semivida funcional de VWF de origen natural o
- 25 b. el complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado presenta una semivida funcional prolongada en comparación con la semivida funcional del complejo correspondiente que comprende FVIII de origen natural y VWF de origen natural.

30 Una realización preferida de la invención consiste en un polipéptido modificado o un complejo que comprende dicho polipéptido modificado o un complejo que comprende dichos polipéptidos modificados según se han descrito anteriormente, donde el polipéptido modificado presenta un incremento de la semivida funcional de al menos un 25% en comparación con la semivida funcional del polipéptido correspondiente de origen natural o el complejo que comprende dicho polipéptido modificado o un complejo que comprende dichos polipéptidos modificados presenta un incremento de la semivida funcional de al menos un 25% en comparación con el complejo correspondiente de FVIII de origen natural y VWF de origen natural.

Otra realización de la invención consiste en un VWF modificado o un complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado, donde

- 35 a. el VWF modificado presenta una semivida del antígeno prolongada en comparación con la semivida del antígeno de VWF de origen natural o
- b. el complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado presenta una semivida del antígeno prolongada en comparación con la semivida del antígeno del complejo correspondiente de FVIII de origen natural y VWF de origen natural.

40 Una realización preferida de la invención consiste en un polipéptido modificado o un complejo que comprende dicho polipéptido modificado o un complejo que comprende dichos polipéptidos modificados según se han descrito anteriormente, donde el polipéptido modificado presenta un incremento de la semivida del antígeno de al menos un 25% en comparación con la semivida del antígeno del polipéptido correspondiente de origen natural o el complejo que comprende dicho polipéptido modificado o un complejo que comprende dichos polipéptidos modificados

45 presenta un incremento de la semivida del antígeno de al menos un 25% en comparación con el complejo correspondiente de FVIII de origen natural y VWF de origen natural.

Otra realización más de la invención consiste en un VWF modificado o un complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado, donde

- 50 a. el VWF modificado presenta un incremento de la recuperación *in vivo* en comparación con la recuperación *in vivo* de VWF de origen natural o

b. el complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado presenta un incremento de la recuperación *in vivo* en comparación con la recuperación *in vivo* del complejo correspondiente que comprende FVIII de origen natural y VWF de origen natural.

5 Otra realización preferida de la invención consiste en un polipéptido modificado o un complejo que comprende dicho polipéptido modificado o un complejo que comprende dichos polipéptidos modificados según se han descrito anteriormente, donde el polipéptido modificado presenta un incremento de la recuperación *in vivo* de al menos un 10% en comparación con la recuperación *in vivo* del polipéptido correspondiente de origen natural o el complejo que comprende dicho polipéptido modificado o un complejo que comprende dichos polipéptidos modificados presenta un incremento de la recuperación *in vivo* de al menos un 10% en comparación con el complejo correspondiente de FVIII de origen natural y VWF de origen natural.

Otra realización preferida de la invención consiste en

a. un polipéptido modificado o un complejo que comprende dicho polipéptido modificado según se ha descrito anteriormente, donde el componente VWF de dicho complejo está fusionado en el aminoácido C-terminal de su producto de traducción primario con la parte N-terminal de la albúmina.

15 Otra realización preferida de la invención consiste en un polipéptido modificado o un complejo que comprende dicho polipéptido modificado según se ha descrito anteriormente, donde el polipéptido modificado presenta al menos un 10% de la actividad biológica del polipéptido de origen natural o el complejo que comprende el polipéptido modificado presenta al menos un 10% de la actividad biológica del complejo correspondiente de FVIII de origen natural y VWF de origen natural.

20 En la presente invención también se engloba un método para preparar un VWF modificado con una mayor semivida funcional, que comprende fusionar la parte N-terminal de la albúmina con una parte C-terminal del polipéptido de traducción primario del VWF, así como también un método para preparar un complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado mezclando un FVIII de origen natural con un VWF modificado preparado mediante el método descrito anteriormente.

25 En la invención también se engloba el uso de

a. un FVIII de origen natural y un VWF modificado preparado mediante el método descrito anteriormente

para la elaboración de un preparado farmacéutico combinado para su uso simultáneo, secuencial o por separado en la terapia de trastornos hemorrágicos, preferentemente en la terapia de la hemofilia A y/o la enfermedad de von Willebrand.

30 La "semivida funcional", de acuerdo con la presente invención, se refiere a la semivida de la actividad biológica del VWF modificado o de un complejo del FVIII no modificado con VWF modificado una vez se ha administrado a un mamífero y se puede medir *in vitro* en muestras de sangre tomadas en diferentes intervalos de tiempo a partir de dicho mamífero después de haber administrado el VWF modificado o el complejo de FVIII no modificado con VWF modificado.

35 Los términos "fusionar" o "fusionado" se refieren a la adición de aminoácidos a la parte C-terminal de VWF. Cuando en la presente se hace referencia a una "fusión con el aminoácido C-terminal de VWF", esto significa una fusión exactamente con el aminoácido C-terminal de VWF en el aminoácido 2050 de VWF maduro de origen natural. El VWF maduro se refiere al polipéptido respectivo después de la escisión del propéptido. Sin embargo, la invención también engloba una "fusión con la parte C-terminal de VWF", que en el sentido de esta invención también puede incluir una fusión con una molécula de VWF en la cual se han suprimido una o más posiciones aminoacídicas hasta un máximo de n aminoácidos a partir del aminoácido C-terminal de VWF. La cifra n es un número entero que no debería ser superior a un 5%, preferentemente no debería ser superior a un 1% del número total de aminoácidos del VWF. Normalmente, n es 20, preferentemente 15, más preferentemente 10, aún más preferentemente 5 o inferior (p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5).

45 En una realización, el VWF modificado presenta la siguiente estructura:



donde

50 N es una parte N-terminal de VWF,

L1 es un enlace químico o una secuencia conectora

H es albúmina y

C es una parte C-terminal de VWF.

L1 puede ser un enlace químico o una secuencia conectora constituida por uno o más aminoácidos, p. ej., de 1 a 20, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5 o de 1 a 3 (p. ej., 1, 2 o 3) aminoácidos, los cuales pueden ser iguales o diferentes entre sí. Normalmente, las secuencias conectoras no están presentes en la posición correspondiente del factor de coagulación de origen natural. Algunos ejemplos de aminoácidos adecuados presentes en L1 incluyen Gly y Ser.

FVIII puede ser procesado proteolíticamente en varios estadios. Por ejemplo, según se ha mencionado anteriormente, durante su secreción en el plasma, el FVIII monocatenario es escindido intracelularmente en la frontera B-A3 y en diferentes sitios del dominio B. La cadena pesada está unida mediante un ion metálico a la cadena ligera que presenta la estructura de dominios A3-C1-C2. El FVIII se activa mediante la escisión proteolítica en los aminoácidos Arg372 y Arg740 de la cadena pesada y en Arg1689 de la cadena ligera, lo cual genera el heterotrímero de FVIII activado constituido por el dominio A1, el dominio A2 y la cadena ligera (A3-C1-C2), un fragmento de 73 kDa. Por lo tanto, la forma activa de FVIII (FVIIIa) está constituida por una subunidad A1 asociada a través de la unión a un ion metálico divalente a una cadena ligera A3-C1-C2 escindida por la trombina y una subunidad A2 libre asociada de forma relativamente débil con el dominio A1 y el dominio A3.

Preferentemente, N - FVIII - C comprende la secuencia de longitud completa de FVIII. También se engloban deleciones N-terminales, C-terminales o internas de FVIII, siempre que la actividad biológica de FVIII se conserve. La actividad biológica se conserva, en el sentido de la invención, si el FVIII con deleciones conserva al menos un 10%, preferentemente al menos un 25%, más preferentemente al menos un 50%, de la forma preferida al menos un 75% de la actividad biológica de FVIII de origen natural. La actividad biológica de FVIII puede ser determinada por un experto como se describe a continuación.

Una prueba adecuada para determinar la actividad biológica de FVIII consiste, por ejemplo, en el ensayo de coagulación de una etapa o de dos etapas (Rizza *et al.* 1982. Coagulation assay of FVIII:C and FIXa in Bloom ed. The Hemophilias. NY Churchill Livingstone 1992) o el ensayo FVIII:C de sustrato cromogénico (S. Rosen, 1984. *Scand J Haematol* 33: 139-145, supl.). El contenido de estas referencias se incorpora a la presente por referencia.

La secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos de la forma de origen natural madura del FVIII humano de coagulación de la sangre se muestran en la SEQ ID NO:14 y la SEQ ID NO:15, respectivamente. La referencia a una posición aminoacídica de una secuencia específica se refiere a la posición de dicho aminoácido en la proteína FVIII de origen natural y no excluye la presencia de mutaciones, p. ej., deleciones, inserciones y/o sustituciones en otras posiciones de la secuencia a la que se hace referencia. Por ejemplo, una mutación en "Glu2004" referente a la SEQ ID NO:15 no excluye el hecho de que, en el homólogo modificado, falten uno o más aminoácidos en las posiciones 1-2332 de la SEQ ID NO:15.

Las expresiones "Factor VIII de coagulación de la sangre", "Factor VIII" y "FVIII" se utilizan indistintamente en la presente. La expresión "Factor VIII de coagulación de la sangre" incluye el FVIII de coagulación de la sangre de origen natural, así como también derivados del FVIII de coagulación de la sangre de origen natural que posean la actividad procoagulante del FVIII de coagulación de la sangre de origen natural. Los derivados pueden contener deleciones, inserciones y/o adiciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de FVIII de origen natural. El término FVIII incluye formas procesadas proteolíticamente de FVIII, p. ej., la forma antes de la activación, que comprenden la cadena pesada y la cadena ligera.

El término "FVIII" incluye cualesquiera mutantes o variantes de FVIII que contengan al menos un 25%, más preferentemente al menos un 50% y de la forma preferida al menos un 75% de la actividad biológica del factor VIII de origen natural.

A modo de ejemplos no limitantes, las moléculas de FVIII incluyen mutantes de FVIII que previenen o reducen la escisión de APC (Amano 1998. *Thromb. Haemost.* 79:557-563), mutantes de FVIII que estabilizan adicionalmente el dominio A2 (WO 97/40145), mutantes de FVIII que dan como resultado un incremento de la expresión (Swaroop *et al.* 1997. *JBC* 272:24121-24124), mutantes de FVIII que reducen su inmunogenicidad (Lollar 1999. *Thromb. Haemost.* 82:505-508), FVIII reconstituido a partir de cadenas ligeras y pesadas expresadas de forma diferente (Oh *et al.* 1999. *Exp. Mol. Med.* 31:95-100), mutantes de FVIII que reducen la unión a receptores que conducen al catabolismo de FVIII como HSPG (siglas en inglés referentes a proteoglicanos de tipo sulfato de heparán) y/o LRP (siglas en inglés referentes a una proteína relacionada con un receptor lipoproteico de baja densidad) (Ananyeva *et al.* 2001. *TCM*, 11:251-257), variantes de FVIII estabilizadas con un puente disulfuro (Gale *et al.*, 2006. *J. Thromb. Hemost.* 4:1315-1322), mutantes de FVIII con propiedades de secreción mejoradas (Miao *et al.*, 2004. *Blood* 103:3412-3419), mutantes de FVIII con una mayor actividad específica del cofactor (Wakabayashi *et al.*, 2005. *Biochemistry* 44:10298-304), mutantes de FVIII con una biosíntesis y secreción mejoradas, una menor interacción con la chaperona del RE, un transporte mejorado de RE-Golgi, una mayor activación o resistencia a la desactivación



y una semivida mejorada (resumido por Pipe 2004. *Sem. Thromb. Hemost.* 30:227-237). Todos estos mutantes y variantes de FVIII se incorporan a la presente por referencia en su totalidad.

5 VWF puede ser procesado proteolíticamente en varios estadios. Por ejemplo, según se ha mencionado anteriormente, la proteasa ADAMTS13 escinde VWF en el dominio A2 de VWF. Por consiguiente, la presente invención también engloba un VWF modificado que haya sido escindido proteolíticamente, p. ej., por ADAMTS13. Tal escisión daría como resultado cadenas multiméricas de VWF que comprenderían en sus extremos al menos un o al menos dos monómeros de VWF que habrían sido escindidos por ADAMTS13.

10 Preferentemente, N - VWF - C comprende la secuencia de longitud completa de VWF. También se engloban deleciones N-terminales, C-terminales o internas de VWF, siempre que la actividad biológica de VWF se conserve. La actividad biológica se conserva, en el sentido de la invención, si el VWF con deleciones conserva al menos un 10%, preferentemente al menos un 25%, más preferentemente al menos un 50%, de la forma preferida al menos un 75% de la actividad biológica de VWF de origen natural. La actividad biológica de VWF de origen natural puede ser determinada por un experto utilizando métodos para determinar la actividad del cofactor de ristocetina (Federici AB *et al.* 2004. *Haematologica* 89:77-85), la unión de VWF a GP Iba del complejo glicoproteico de plaquetas Ib-V-IX (Sucker *et al.* 2006. *Clin Appl Thromb Hemost.* 12:305-310) o un ensayo de unión a colágeno (Kallas y Talpsep. 2001. *Annals of Hematology* 80:466-471).

20 Dentro de la definición anterior, "FVIII" y/o "VWF" también incluyen las variaciones alélicas naturales que puedan existir y que se puedan producir de un individuo a otro. Dentro de la definición anterior, "FVIII" y/o "VWF" incluyen además variantes de FVIII y/o VWF. Tales variantes difieren en uno o más residuos aminoácidos de la secuencia de origen natural. Los ejemplos de tales diferencias pueden incluir sustituciones conservativas de aminoácidos, es decir, sustituciones dentro de grupos de aminoácidos con características similares, p. ej., (1) aminoácidos pequeños, (2) aminoácidos ácidos, (3) aminoácidos polares, (4) aminoácidos básicos, (5) aminoácidos hidrófobos y (6) aminoácidos aromáticos. En la tabla siguiente se muestran algunos ejemplos de tales sustituciones conservativas.

**Tabla 1:**

(1)	Alanina	Glicina		
(2)	Ácido aspártico	Ácido glutámico		
(3)	Asparagina	Glutamina	Serina	Treonina
(4)	Arginina	Histidina	Lisina	
(5)	Isoleucina	Leucina	Metionina	Valina
(6)	Fenilalanina	Tirosina	Triptófano	

25 La semivida funcional de acuerdo con otra realización de la invención es la semivida de la función biológica del VWF una vez que se ha administrado a un mamífero y se mide *in vitro*. La semivida funcional del VWF modificado de acuerdo con la invención es superior a la del VWF que carece de la modificación, según se evalúa en la misma especie. La semivida funcional aumenta al menos un 10%, preferentemente aumenta al menos un 25%, más preferentemente al menos un 50% y aún más preferente al menos un 100% en comparación con el VWF que carece de la modificación y/o con la forma de origen natural del VWF.

30 La semivida funcional de un VWF modificado que comprende una modificación de HLEP se puede determinar administrando el VWF modificado respectivo (y en comparación el VWF no modificado) a ratas, conejos u otras especies animales de experimentación por vía intravenosa o subcutánea y siguiendo la eliminación de la actividad biológica de dicho VWF modificado o, respectivamente, no modificado en muestras sanguíneas tomadas en intervalos adecuados tras la aplicación. Algunos métodos de prueba adecuados son las pruebas de actividad que se describen en la presente.

35 Como marcador alternativo para la semivida de la actividad biológica, también se pueden medir los niveles de antígeno del FVIII de origen natural o los niveles de antígeno del VWF modificado o, respectivamente, de origen natural. Por lo tanto, en la invención también se engloban moléculas de VWF modificadas que contienen en la parte C-terminal de VWF una fusión con albúmina, caracterizadas por que el VWF modificado o el complejo del FVIII no modificado con VWF modificado presenta una semivida prolongada del antígeno de VWF en comparación con la semivida del antígeno de VWF que carece de dicha inserción. La "semivida del antígeno de VWF" de acuerdo con la

presente invención es la semivida del antígeno del VWF una vez que se ha administrado a un mamífero y se mide *in vitro*. El experto conocerá métodos de prueba de antígenos basados en anticuerpos específicos en un formato de inmunoensayo enzimático y estos se pueden adquirir de proveedores comerciales (p. ej., Dade Behring, Instrumentation Laboratory, Abbott Laboratories, Diagnostica Stago). Las semividas funcionales y del antígeno se pueden calcular utilizando los puntos de evaluación de la fase beta de eliminación de acuerdo con la fórmula  $t_{1/2} = \ln 2 / k$ , donde  $k$  es la pendiente de la recta de regresión.

En otra realización de la invención, el VWF modificado de la invención exhibe una recuperación *in vivo* mejorada en comparación con el VWF de origen natural. La recuperación *in vivo* se puede determinar *in vivo*, por ejemplo, en modelos de VWF, como ratones en los que se ha suprimido el VWF, en los que cabría esperar la detección de un incremento del porcentaje del VWF modificado de la invención por parte de ensayos de actividad o antígeno en circulación poco después (5 a 10 min) después de la administración i.v. en comparación con el VWF de origen natural correspondiente.

La recuperación *in vivo* aumenta preferentemente al menos un 10%, más preferentemente al menos un 20% y aún más preferentemente al menos un 40% en comparación con VWF de origen natural.

Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar moléculas de VWF de vida prolongada que, después del procesamiento proteolítico *in vivo*, presenten unas propiedades funcionales comparables a las de un VWF no modificado. Esto se puede conseguir manteniendo o insertando ciertos sitios de escisión en el VWF modificado que provoquen una escisión proteolítica, por ejemplo, cuando entren en contacto con factores de coagulación activados, los cuales separan el VWF de la albúmina. Por consiguiente, en una realización, la semivida funcional del VWF modificado procesado proteolíticamente es sustancialmente la misma que la del VWF no modificado que carece de la modificación y/o es sustancialmente la misma que la del VWF de origen natural (p. ej.,  $\pm 15\%$ , preferentemente  $\pm 10\%$ ).

Otra realización preferida de la invención consiste en una coexpresión de VWF de origen natural y un VWF modificado de acuerdo con la invención, lo cual resulta en multímeros de VWF que comprenden monómeros de VWF tanto no modificados como modificados.

#### **Secuencias conectoras**

De acuerdo con esta invención, el resto polipeptídico terapéutico se puede acoplar con el resto de albúmina mediante un conector peptídico. El conector debe ser no inmunogénico y puede ser un conector escindible o no escindible.

Los conectores no escindibles pueden comprender residuos de glicina y serina alternos según se ilustra en WO2007/090584.

En otra realización de la invención, el conector peptídico entre el resto de VWF y el resto de albúmina está constituido por secuencias peptídicas, las cuales sirven como conectores entre dominios naturales en proteínas humanas. Preferentemente, tales secuencias peptídicas en su entorno natural están localizadas cerca de la superficie de la proteína y pueden ser accedidas por el sistema inmunitario, de modo que se puede asumir una tolerancia natural frente a esta secuencia. Se proporcionan ejemplos en WO2007/090584.

Los conectores escindibles deben ser lo suficientemente flexibles para permitir una escisión por parte de proteasas.

En una realización muy preferida, el péptido conector deriva de FVIII en sí y comprende secuencias que engloban los sitios de escisión de la trombina en las posiciones aminoacídicas 372, 740 y 1689 de la SEQ ID NO. 15, respectivamente. En otra realización preferida, el péptido conector deriva de FX, FIX, FVII o FXI.

Los péptidos conectores son escindidos preferentemente por las proteasas del sistema de coagulación, por ejemplo, FIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa y FVIIa.

#### **Polipéptidos que mejoran la semivida (HLEP)**

Un "polipéptido que mejora la semivida", tal como se utiliza en la presente, se selecciona del grupo constituido por la albúmina.

#### **Albúmina como HLEP**

Las expresiones "albúmina de suero humano" (ASH), "albúmina humana" (AH) y "albúmina" (ALB) se utilizan indistintamente en esta solicitud. Las expresiones "albúmina" y "albúmina de suero" son más amplias y engloban la albúmina de suero humano (y sus fragmentos y variantes), así como también albúmina de otras especies (y sus fragmentos y variantes).

El término "albúmina", tal como se utiliza en la presente, se refiere de forma colectiva a una secuencia de aminoácidos o polipeptídica de albúmina, o fragmento o variante de albúmina, con una o más actividades funcionales (p. ej., actividades biológicas) de albúmina. En particular, el término "albúmina" se refiere a albúmina humana o sus fragmentos, especialmente la forma madura de la albúmina humana según se muestra en la SEQ ID NO:16 de la presente, o albúmina de otros vertebrados o sus fragmentos, o análogos o variantes de estas moléculas o sus fragmentos.

En particular, los constructos de fusión de FVIII y/o de fusión de VWF propuestos de la invención pueden incluir variantes polimórficas de origen natural de albúmina humana y fragmentos de albúmina humana. En términos generales, un fragmento o variante de albúmina tendrá una longitud de al menos 10, preferentemente al menos 40 y de la forma más preferida más de 70 aminoácidos. La variante de albúmina puede estar constituida preferentemente o puede comprender de forma alternativa al menos un dominio entero de albúmina o fragmentos de dichos dominios, por ejemplo, los dominios 1 (aminoácidos 1-194 de la SEQ ID NO:16), 2 (aminoácidos 195-387 de la SEQ ID NO: 16), 3 (aminoácidos 388-585 de la SEQ ID NO: 16), 1 + 2 (1-387 de la SEQ ID NO: 16), 2 + 3 (195-585 de la SEQ ID NO: 16) o 1 + 3 (aminoácidos 1-194 de la SEQ ID NO: 16 + aminoácidos 388-585 de la SEQ ID NO: 16). Cada dominio está constituido a su vez por dos subdominios homólogos, a saber 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, con regiones conectoras entre dominios flexibles que comprenden los residuos de Lys106 a Glu119, de Glu292 a Val315 y de Glu492 a Ala511.

La porción de albúmina de los constructos de fusión de VWF propuestos de la invención pueden comprender al menos un subdominio o dominio de AH o modificaciones conservativas de este.

## 20 Polinucleótidos

La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica una variante de VWF modificada según se describe en esta solicitud. El término "polinucleótido(s)" se refiere en general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. El polinucleótido puede ser ADN mono- o bicatenario, o ARN mono- o bicatenario. El término "polinucleótido(s)", tal como se utiliza en la presente, también incluye ADN o ARN que comprenden una o más bases modificadas y/o bases inusuales tales como la inosina. Se apreciará que se pueden realizar varias modificaciones al ADN y ARN con muchos propósitos útiles conocidos por los expertos en la técnica. El término "polinucleótido(s)", tal como se utiliza en la presente, abarca tales formas química, enzimática o metabólicamente modificadas de los polinucleótidos, así como también las formas químicas del ADN y ARN características de virus y células, incluidas, por ejemplo, las células simples y complejas.

El experto comprenderá que, debido a la degeneración del código genético, un polipéptido dado puede ser codificado por diferentes polinucleótidos. Estas "variantes" quedan englobadas en esta invención.

Preferentemente, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido aislado. La expresión polinucleótido "aislado" se refiere a un polinucleótido que está sustancialmente exento de otras secuencias de ácido nucleico tales como, sin carácter limitante, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos. Los polinucleótidos aislados se pueden purificar a partir de una célula huésped. Se pueden utilizar métodos de purificación de ácidos nucleicos convencionales conocidos por los expertos para obtener los polinucleótidos aislados. El término también incluye polinucleótidos recombinantes y polinucleótidos sintetizados químicamente.

La invención se refiere además a un grupo de polinucleótidos que codifican conjuntamente el VWF modificado de la invención. Un primer polinucleótido del grupo puede codificar la parte N-terminal del VWF modificado y un segundo polinucleótido puede codificar la parte C-terminal del VWF modificado.

Otro aspecto más de la invención consiste en un plásmido o vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención. Preferentemente, el plásmido o vector es un vector de expresión. En una realización particular, el vector es un vector de transferencia para su uso en terapia génica humana.

La invención también se refiere a un grupo de plásmidos o vectores que comprenden el grupo anterior de polinucleótidos. Un primer plásmido o vector puede contener dicho primer polinucleótido y un segundo plásmido o vector puede contener dicho segundo polinucleótido.

Otro aspecto más de la invención consiste en una célula huésped que comprende un polinucleótido, un plásmido o vector de la invención o un grupo de polinucleótidos o un grupo de plásmidos o vectores según se describen en la presente.

Las células huésped de la invención se pueden emplear en un método para producir un VWF modificado, el cual forma parte de esta invención. El método comprende:

(a) cultivar células huésped de la invención en condiciones tales que se exprese la proteína de inserción deseada; y

(b) opcionalmente recuperar la proteína de inserción deseada a partir de las células huésped o a partir del medio de cultivo.

Se prefiere purificar el VWF modificado de la presente invención hasta obtener una pureza  $\geq 80\%$ , más preferentemente una pureza  $\geq 95\%$  y se prefiere particularmente un estado farmacéuticamente puro que sea superior a una pureza de un 99.9% respecto a macromoléculas contaminantes, en particular otras proteínas y ácidos nucleicos, y exento de agentes infecciosos y pirógenos. Preferentemente, un VWF modificado aislado o purificado de la invención está sustancialmente exento de otros polipéptidos no relacionados.

Los diferentes productos de la invención son útiles como medicamentos. Por consiguiente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un VWF modificado según se describe en la presente, un polinucleótido de la invención o un plásmido o vector de la invención.

La invención también se refiere a un método para tratar a un individuo que padece un trastorno de coagulación de la sangre tal como la hemofilia A o B. El método comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de un VWF modificado o del complejo de FVIII no modificado con VWF modificado según se describe en la presente. En otra realización, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un polinucleótido de la invención o de un plásmido o vector de la invención. Como alternativa, el método puede comprender administrar al individuo una cantidad eficaz de las células huésped de la invención descritas en la presente.

### Expresión de los mutantes propuestos

La producción de proteínas mutadas recombinantes en niveles elevados en células huésped adecuadas requiere el acoplamiento de los ADNc modificados mencionados anteriormente en unidades de transcripción eficaces junto con elementos reguladores adecuados en un vector de expresión recombinante que se pueda propagar en varios sistemas de expresión de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los elementos reguladores de la transcripción eficaces podrían derivar de virus que tengan células animales como sus huéspedes naturales o del ADN cromosómico de células animales. Preferentemente, se pueden utilizar combinaciones de promotor-potenciador derivadas del virus del simio 40, adenovirus, virus del polioma BK, citomegalovirus humanos o la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, o combinaciones de promotor-potenciador que incluyan genes transcritos de forma fuertemente constitutiva en células animales como la beta-actina o GRP78. Con el fin de conseguir niveles elevados estables de ARNm transcrito a partir de los ADNc, la unidad de transcripción debe contener en su parte 3'-proximal una región de ADN que codifique una secuencia de poliadenilación-terminación de la transcripción. Preferentemente, esta secuencia deriva de la región de transcripción temprana del virus del simio 40, el gen beta-globina de conejo o el gen activador de plasminógeno tisular humano.

A continuación, los ADNc se integran en el genoma de una línea adecuada de células huésped para la expresión de las proteínas VWF. Preferentemente, esta línea celular debe ser una línea celular animal de origen vertebrado con el fin de garantizar un plegamiento correcto, la formación de puentes disulfuro, la glicosilación relacionada con la asparagina y otras modificaciones posteriores a la traducción, así como también la secreción en el medio de cultivo. Algunos ejemplos de otras modificaciones posteriores a la traducción son la O-sulfatación de la tirosina y el procesamiento proteolítico de la cadena polipeptídica naciente. Algunos ejemplos de líneas celulares que se pueden utilizar son células COS de primate, células L de ratón, células C127 de ratón, células BHK-21 de hámster, células 293 de riñón embrionario humano y células CHO de hámster.

El vector de expresión recombinante que codifica los ADNc correspondientes se puede introducir en una línea celular animal de varias formas diferentes. Por ejemplo, se pueden crear vectores de expresión recombinantes a partir de vectores basados en diferentes virus animales. Algunos ejemplos de ellos son vectores basados en baculovirus, virus *vaccinia*, adenovirus, y preferentemente virus del papiloma bovino.

Las unidades de transcripción que codifican los ADN correspondientes también se pueden introducir en células animales junto con otro gen recombinante que pueda actuar como marcador seleccionable dominante en estas células con el fin de facilitar el aislamiento de clones celulares específicos que hayan integrado el ADN recombinante en su genoma. Algunos ejemplos de este tipo de genes marcadores seleccionables dominantes son la aminoglicósido-fosfotransferasa de Tn5, que confiere resistencia a la geneticina (G418), la higromicina-fosfotransferasa, que confiere resistencia a la higromicina, y la puomicina-acetiltransferasa, que confiere resistencia a la puomicina. El vector de expresión recombinante que codifica un marcador seleccionable de este tipo puede residir ya sea en el mismo vector, como codificador del ADNc de la proteína deseada, o puede ser codificado por un vector diferente que se introduzca de forma simultánea y se integre en el genoma de la célula huésped, lo cual da como resultado frecuentemente una conexión física estrecha entre las diferentes unidades de transcripción.

Otros tipos de genes marcadores seleccionables que se pueden utilizar junto con los ADNc de la proteína deseada se basan en varias unidades de transcripción que codifican la dihidrofolato-reductasa (dhfr). Tras la introducción de este tipo de gen en células que carecen de actividad dhfr endógena, preferentemente células CHO (DUKX-B11, DG-44), este permitirá que dichas células crezcan en medios que carecen de nucleósidos. Un ejemplo de un medio de

este tipo es F12 de Ham sin hipoxantina, timidina ni glicina. Estos genes dhfr se pueden introducir conjuntamente con las unidades de transcripción de ADNc de FVIII en células CHO del tipo anterior, tanto unidos al mismo vector o en vectores diferentes, con lo que se crean líneas celulares dhfr-positivas que producen proteína recombinante.

5 Si las líneas celulares anteriores se cultivan en presencia del inhibidor de dhfr citotóxico metotrexato, emergerán nuevas líneas celulares resistentes al metotrexato. Estas líneas celulares pueden producir proteína recombinante con una mayor tasa, debido al número amplificado de dhfr que se ha unido y las unidades de transcripción de la proteína deseada. Cuando se propagan estas líneas celulares en concentraciones cada vez mayores de metotrexato (1-10000 nM), se pueden obtener nuevas líneas celulares que produzcan la proteína deseada con una tasa muy elevada.

10 Las líneas celulares anteriores que producen la proteína deseada se pueden cultivar a gran escala, ya sea en un cultivo en suspensión o en varios soportes sólidos. Algunos ejemplos de estos soportes son microportadores basados en matrices de dextrano o colágeno, o soportes sólidos en forma de fibras huecas o varios materiales cerámicos. Cuando se cultivan en un cultivo de células en suspensión o en microportadores, el cultivo de las líneas celulares anteriores se puede llevar a cabo ya sea como un cultivo en un baño o como un cultivo en perfusión con la producción continua de medio acondicionado durante periodos de tiempo prolongados. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, las líneas celulares anteriores son adecuadas para el desarrollo de un proceso industrial para la producción de las proteínas mutadas recombinantes deseadas.

### Purificación y formulación

20 La proteína VWF modificada recombinante, la cual se acumula en el medio de células secretoras de los tipos anteriores, se puede concentrar y purificar mediante varios métodos bioquímicos y cromatográficos, que incluyen métodos que emplean diferencias en tamaño, carga, hidrofobicidad, solubilidad, afinidad específica, etc. entre la proteína deseada y otras sustancias en el medio de cultivo celular.

25 Un ejemplo de tal purificación consiste en la adsorción de la proteína mutada recombinante en un anticuerpo monoclonal, dirigido, p. ej., a una HLEP, preferentemente albúmina humana, o dirigido al factor de coagulación respectivo, el cual se inmoviliza sobre un soporte sólido. Tras la adsorción del VWF modificado sobre el soporte, su lavado y desorción, la proteína se puede purificar adicionalmente mediante varias técnicas cromatográficas basadas en las propiedades anteriores. El orden de los pasos de purificación se selecciona, p. ej., de acuerdo con la capacidad y la selectividad de los pasos, la estabilidad del soporte u otros aspectos. Algunos pasos de purificación preferidos, p. ej., son, sin carácter limitante, pasos de cromatografía de intercambio iónico, pasos de cromatografía de afinidad inmunitaria, pasos de cromatografía de afinidad, pasos de cromatografía de interacción hidrófoba, pasos de cromatografía con tintes, pasos de cromatografía con hidroxapatita, pasos de cromatografía multimodal y pasos de cromatografía por exclusión de tamaño.

30 Con el fin de minimizar el riesgo teórico de contaminaciones con virus, se pueden incluir pasos adicionales en el proceso que permitan la desactivación o eliminación eficaz de los virus. Tales pasos son, p. ej., un tratamiento térmico en estado líquido o sólido, un tratamiento con disolventes y/o detergentes, radiación en el espectro visible o UV, radiación gamma o nanofiltración.

35 Los polinucleótidos modificados (p. ej., ADN) de esta invención también se pueden integrar en un vector de transferencia para su uso en terapia génica humana.

40 Las diferentes realizaciones descritas en la presente se pueden combinar entre sí. La presente invención se describirá adicionalmente con más detalle en los ejemplos de esta que se muestran más adelante. Esta descripción de realizaciones específicas de la invención se realizará conjuntamente con las figuras adjuntas.

45 El VWF modificado que se describe en esta invención se puede formular en preparados farmacéuticos para uso terapéutico. La proteína purificada se puede disolver en soluciones tampón acuosas fisiológicamente compatibles convencionales, a las cuales se pueden añadir, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparados farmacéuticos.

50 Tales portadores y excipientes farmacéuticos, así como también las formulaciones farmacéuticas adecuadas, son de uso común en la técnica (remítase, por ejemplo, a "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer *et al.*, Taylor y Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3.<sup>a</sup> edición, Kibbe *et al.*, Pharmaceutical Press (2000)). En particular, la composición farmacéutica que comprende la variante polipeptídica de la invención se puede formular en forma líquida estable o liofilizada. La variante polipeptídica se puede liofilizar mediante varios procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes de su uso mediante la adición de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

55 Las formulaciones de la composición se suministran al individuo mediante cualquier método farmacéuticamente adecuado de administración. Se conocen varios sistemas de suministro y se pueden utilizar para administrar la

composición mediante cualquier vía conveniente. Preferentemente, las composiciones de la invención se administran por vía sistémica. Para el uso sistémico, las proteínas de inserción de la invención se formulan para el suministro parenteral (p. ej., intravenoso, subcutáneo, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmico) o entérico (p. ej., oral, vaginal o rectal) de acuerdo con métodos convencionales. Las vías de administración más preferidas son la administración intravenosa y subcutánea. Las formulaciones se pueden administrar de forma continua por infusión o mediante inyección en bolo. Algunas formulaciones engloban sistemas de liberación lenta.

Las proteínas de inserción de la presente invención se administran a los pacientes con una dosis terapéuticamente eficaz, que se refiere a una dosis que sea suficiente para producir los efectos deseados, de modo que prevengan o reduzcan la gravedad o la propagación de la afección o indicación que se esté tratando sin llegar a una dosis que produzca efectos secundarios adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores como, p. ej., la indicación, formulación, vía de administración, y se debe determinar en ensayos clínicos y preclínicos para cada indicación respectiva.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar sola o combinada con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden incorporar como parte del mismo preparado farmacéutico. Un ejemplo de un agente de este tipo es la combinación de FVIII no modificado con VWF modificado.

### Figuras

**Figura 1:** Niveles de antígeno y actividad de FVIII de origen natural y de polipéptidos de fusión FVIII-C-terminal-albúmina.

**Figura 2:** Comparación de los parámetros farmacocinéticos de FVIII humano:Ag en ratones con supresión de VWF tras la inyección i.v. de 100 U (FVIII:Ag)/kg de FVIII de origen natural y FVIII-FP 1656 VWF (media; n=4/punto de evaluación).

**Figura 3:** Proporciones de VWF:RCo/VWF:Ag de sobrenadantes de cultivos celulares que contienen rVWF de origen natural (1570/1212), rVWF-FP (1572/1212) que contiene albúmina unida al extremo C-terminal, o un cultivo celular de expresión mixta que contiene una mezcla de rVWF de origen natural (1570/1212) y rVWF-FP (1572/1212) transfectada con una proporción de 5:1. Se obtuvieron valores de aproximadamente 0.8 en cada caso, los cuales son próximos a 1, que corresponde a la proporción teórica de NHP de acuerdo con las definiciones de las unidades.

**Figura 4:** Electroforesis en gel de agarosa-SDS de rVWF de origen natural (1570/1212) expresado en células HEK (B) y rVWF-FP (1572/1212) expresado en células HEK (A). Las bandas se detectaron utilizando o bien anticuerpos para VWF o para albúmina (ASH).

**Figura 5:** Comparación de los parámetros farmacocinéticos de rVWF humano de origen natural y rVWF-FP tras la inyección i.v. de 100 IU de VWF:Ag en ratas (media, n=2-3 /punto de evaluación).

### Ejemplos:

**Ejemplo 1: Generación de vectores de expresión para moléculas de FVIII con fusión a albúmina C-terminal (no forma parte de la invención)**

En primer lugar se utilizó un plásmido de expresión basado en pIRESpuo3 (BD Biosciences) que contenía la secuencia de ADNc de FVIII de longitud completa en su sitio de clonación múltiple (pF8-FL) para crear un FVIII con el dominio B suprimido. Con este fin, se utilizaron los oligonucleótidos F8-1 y F8-2 (SEQ ID NO 1 y 2) en un experimento de mutagénesis dirigida al sitio de acuerdo con protocolos estándar (kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange XL, Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.) utilizando pF8-FL como molde para eliminar el dominio B. En un segundo paso, se introdujo una secuencia que codificaba la secuencia de aminoácidos RRGR para conectar R740 del dominio A2 con R1648 del dominio a3. Esto se llevó a cabo en otra ronda de mutagénesis dirigida al sitio utilizando los cebadores F8-3 y F8-4 (SEQ ID NO 3 y 4). El plásmido resultante se denominó pF8-457. Se generó un constructo de fusión FVIII-albúmina por pasos. En primer lugar, se introdujo un sitio de escisión PinAI en el extremo 3'-terminal de FVIII. Con este fin, se generó un fragmento de PCR utilizando pF8-457 como molde, empleando los cebadores de PCR We2827 y We2828 (SEQ ID NO 5 y 6), el cual se purificó mediante gel posteriormente, se cortó con las endonucleasas de restricción BspE1 y NotI, y se ligó en pF8-457 previamente digerido con BspE1 y NotI. El plásmido resultante (pF8-1433) se cortó a continuación con las enzimas PinAI y NotI, y se insertó un fragmento obtenido mediante PCR en un plásmido que contenía ADNc de albúmina humana utilizando los cebadores We 2829 y We 2830 (SEQ ID NO 7 y 8), y posteriormente se digirió con las enzimas PinAI y NotI. El plásmido de expresión resultante (pF8-1434) contenía las secuencias codificantes para un FVIII con el dominio B suprimido seguidas de un sitio PinAI para insertar conectores (que codifica la secuencia de aminoácidos ThrGly) y la secuencia codificante para albúmina humana. La secuencia de aminoácidos codificada por pF8-1434 se representa como SEQ ID NO 9.

A continuación, las secuencias conectoras que separan el resto de FVIII y el resto de albúmina se pudieron insertar fácilmente en el sitio PinAI recién creado descrito anteriormente. A continuación se describe la inserción de dos secuencias conectoras. Además, basándose en pF8-1434, el conector TG se podría eliminar por completo e incluso las delecciones en el extremo C-terminal de FVIII o el extremo N-terminal de la albúmina se pueden llevar a cabo utilizando mutagénesis dirigida al sitio.

Inserción de un conector escindible derivado del sitio de escisión de la trombina del FVIII: en primer lugar, se generó un fragmento de PCR que contenía la secuencia que codifica el sitio de escisión de la trombina en la posición 372 mediante PCR utilizando los cebadores We2979 y We2980 (SEQ ID NO 10 y 11) y pF8-457 como molde. Este fragmento se purificó, se digirió con PinAI y se ligó en pF8-1434 digerido con PinAI. La secuenciación verificó la inserción de la orientación correcta del fragmento y el plásmido resultante se denominó pF8-1563.

Inserción de un conector de glicina/serina flexible: se amplificó un fragmento de PCR que contenía la secuencia codificante para un conector de glicina/serina de 31 aminoácidos mediante PCR a partir de pFVII-937 que se describe en WO2007/090584 utilizando los cebadores We2991 y We2992 (SEQ ID NO 12 y 13). A continuación, este fragmento se purificó, se digirió con la endonucleasa de restricción PinAI y se ligó en pF8-1434 digerido con PinAI. La secuenciación verificó la inserción de la orientación correcta del fragmento y el plásmido resultante se denominó pF8-1568.

Utilizando los protocolos y los plásmidos descritos anteriormente y aplicando técnicas de biología molecular conocidas por los expertos en la técnica (y que se describen, p. ej., en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM *et al.* (eds.) John Wiley & Sons, Inc.; <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>), un experto puede preparar otros constructos para reemplazar la albúmina por otro HLEP o insertar cualquier otro conector en el sitio PinAI descrito. La transferencia del ADNc de FVIII/albumina en vectores adecuados tales como pIRESneo3 (Invitrogen) y pEE12.4 (Lonza) permitió la expresión y la selección de clones que expresaban la proteína de fusión FVIII-albúmina respectiva en células CHO.

#### Ejemplo 2: Transfección y expresión de las proteínas FVIII y VWF

Se cultivaron plásmidos de expresión en *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y se purificaron utilizando protocolos estándar (Qiagen, Hilden, Alemania). Se transfectaron células HEK-293 (Invitrogen) utilizando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se cultivaron en medio exento de suero (Invitrogen 293 Express) en presencia de 4 µg/mL de Puomicina y opcionalmente 0.5 IU/mL de VWF. Se transfectaron células CHO (CHO-S, Invitrogen; CHOK1SV, Lonza) utilizando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se cultivaron en medio exento de suero (Invitrogen CD CHO, glutamina 6 mM para CHO-S y CD-CHO para CHOK1SV) en presencia de 500-1000 µg/mL de Geneticina (CHO-S únicamente). Para la expresión de FVIII, se añadieron opcionalmente 0.5 IU/mL de VWF. Para la expresión de vWF, se cotransfectó un plásmido de expresión que codificaba PACE/furina (pFu-797) según se describe en WO2007/144173. En otro experimento, dos plásmidos que codificaban VWF de origen natural y VWF fusionado en el extremo C-terminal con albúmina se cotransfectaron con pFu-797 para obtener multímeros de VWF con monómeros de VWF de origen natural y monómeros de VWF fusionados con albúmina (remítase a la figura 3). Las poblaciones de células transfectadas se esparcieron mediante frascos para cultivo celular en botellas rotatorias o fermentadores de pequeña escala, de los cuales se recolectaron los sobrenadantes para purificarlos.

La tabla 2 enumera los datos de expresión de HEK-293 para los constructos descritos en el ejemplo 1.

Tabla 2:

Constructo	Actividad [U/mL]
pF8-457	1.54
pF8-457 + 0.5 U/mL de VWF	1.66
pF8-1434	1.59
pF8-1434 + 0.5 U/mL de VWF	1.82
pF8-1563 + 0.5 U/mL de VWF	2.04
pF8-1568 + 0.5 U/mL de VWF	1.21

**Ejemplo 3: Incremento de la tasa de expresión de la proteína de fusión FVIII-albúmina (no forma parte de la invención)**

La figura 1 resume los resultados de un estudio de expresión de una proteína de fusión FVIII-albúmina en un cultivo celular exento de suero. Se transfectaron células HEK-293 por triplicado con pF8-1434 (fusión FVIII-C-terminal-albúmina) y pF8-457 (FVIII de origen natural), respectivamente, se sembraron en frascos T80 con números celulares equivalentes y se cultivaron en ausencia de VWF estabilizante. A continuación, el sobrenadante del cultivo se recolectó después de 96, 120 y 144 horas, y se evaluó para determinar la actividad de FVIII.

Los resultados mostraron un efecto potenciador de la expresión del resto de albúmina cuando está presente como una parte integral de la molécula de FVIII en el cultivo celular. Como consecuencia, se mejoró claramente la productividad en el caso de la proteína de fusión en comparación con el FVIII de origen natural (figura 1).

**Ejemplo 4: Purificación de proteínas FVIII (no forma parte de la invención)**

Se añadió una cantidad suficiente de una resina de afinidad inmunitaria al sobrenadante de expresión que contenía la molécula de FVIII para que se uniera a la actividad de FVIII casi completamente. La resina de afinidad inmunitaria se había preparado uniendo covalentemente un MAb anti-FVIII adecuado a una resina Sephacryl S1000 empleada como soporte. Después de lavar la resina, se introdujo en una columna cromatográfica y se lavó de nuevo. La elución se llevó a cabo utilizando un tampón que contenía  $\text{CaCl}_2$  250 mM y etilenglicol al 50%.

Las fracciones de la cromatografía de afinidad inmunitaria (IAC, por sus siglas en inglés) que contenían actividad FVIII:C se agruparon, se sometieron a diálisis frente a un tampón de formulación (excipientes: cloruro de sodio, sacarosa, histidina, cloruro de calcio y Tween 80) y se concentraron. Las muestras o bien se guardaron congeladas o se liofilizaron utilizando un ciclo de liofilización adecuado.

Como alternativa, el sobrenadante del cultivo celular que contiene el FVIII se concentra/purifica mediante cromatografía de intercambio iónico en primer lugar y a continuación mediante una purificación adicional utilizando cromatografía de afinidad inmunitaria (IAC). En este caso, el material eluido de la cromatografía de intercambio iónico se introduce en una columna de IAC utilizando la resina mencionada anteriormente.

**Ejemplo 5: Análisis de la actividad y el antígeno de FVIII (no forma parte de la invención)**

Para determinar la actividad de FVIII:C *in vitro*, se llevó a cabo o bien un ensayo de coagulación (p. ej., plasma deficiente en FVIII y reactivo Pathromtin SL suministrado por Dade Behring, Alemania) o un ensayo cromogénico (p. ej., ensayo Coamatic FVIII:C suministrado por Haemochrom). Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El antígeno de FVIII (FVIII:Ag) se determinó mediante ELISA, cuyo rendimiento es conocido por los expertos en la técnica. Resumiendo, se incubaron microplacas con 100  $\mu\text{L}$  por pocillo del anticuerpo de captura (IgG anti-FVIII humano de oveja, Cedarlane CL20035K-C, con un factor de dilución 1:200 en Tampón A [Sigma C3041]) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las placas tres veces con tampón B (Sigma P3563), se incubaron diluciones en serie de la muestra de prueba en tampón diluyente para la muestra (Cedarlane), así como también diluciones en serie de un preparado de FVIII (CSL Behring; 200 - 2 mU/mL) en tampón diluyente para la muestra (volúmenes por pocillo: 100  $\mu\text{L}$ ), durante dos horas a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado con tampón B, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:2 en tampón B del anticuerpo de detección (IgG anti-FVIII humano de oveja, Cedarlane CL20035K-D, marcada con peroxidasa) a cada pocillo y se incubaron durante otra hora a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado con tampón B, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de solución de sustrato (1:10 (v/v) TMB OUVF : tampón de TMB OUVG, Dade Behring) por pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100  $\mu\text{L}$  de solución de detención (Dade Behring, OSFA) preparó las muestras para su lectura en un lector de microplacas adecuado a una longitud de onda de 450 nm. A continuación, se calcularon las concentraciones de las muestras de prueba utilizando la curva patrón con el preparado de FVIII como referencia.

**Ejemplo 6: Evaluación de los parámetros farmacocinéticos de FVIII-FP en ratones en los que se ha suprimido VWF tras una única inyección i.v. (no forma parte de la invención)**

Con el fin de comparar los parámetros farmacocinéticos de FVIII de origen natural (ADN 457) y FVIII-FP C-terminal (ADN 1656), ambas variantes de FVIII se administraron por vía intravenosa a ratones. Se seleccionó una cepa de ratón en la que se había suprimido VWF (Denis C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, Vol. 95, 9524-9529) ya que, entre otras funciones, VWF actúa como portador y proteína estabilizante para FVIII, de este modo protege a FVIII frente a su degradación prematura, p. ej., por parte de proteasas, y frente a su eliminación prematura de la circulación. Para un FVIII no modificado, es esencial una interacción sin perturbaciones con VWF, según ilustran los casos de hemofilia A, provocados por una mutación en la región C-terminal, que provoca una reducción de la unión a VWF. En el caso de FVIII modificado, tal unión puede ser, a pesar de ello, incluso indeseada, con el fin de examinar o conseguir unos parámetros farmacocinéticos mejorados. Por consiguiente, se inyectaron ambos



5 productos por vía i.v. con una dosis de 100 U (FVIII:Ag)/kg en bolo a dos grupos de ratones (tabla 3). Se tomaron muestras de sangre de forma retroorbital en intervalos adecuados, empezando 5 minutos después de la aplicación de las sustancias de prueba y hasta las 24 horas. Se tomó una muestra de sangre / ratón, se procesó hasta obtener el plasma y se guardó congelada a -20 °C hasta el análisis. Se cuantificó la concentración de FVIII:Ag humano  
 10 utilizando un ensayo ELISA específico para FVIII humano o mediante un ELISA mixto específico para FVIII y albúmina humana, respectivamente. La concentración en plasma media de las muestras agrupadas para cada punto de evaluación se utilizó para calcular los parámetros farmacocinéticos. La semivida se calculó utilizando los puntos de evaluación de la fase beta de la eliminación de acuerdo con la fórmula  $t_{1/2} = \ln 2 / k$ , donde k es la pendiente de la recta de regresión. El resultado se representa en la figura 2. Sorprendentemente, FVIII-FP 1656 ( $t_{1/2} = 3.06$  h, entre 5 y 960 min) presentó una semivida terminal aproximadamente 3-4 veces más prolongada en comparación con FVIII de origen natural ( $t_{1/2} = 0.8$  h, entre 5 y 240 min). Además, la recuperación de FVIII-FP 1656 se incrementó aproximadamente un 20% en comparación con FVIII de origen natural (tabla 4).

**Tabla 3:** Grupos de tratamiento para la comparación de los parámetros farmacocinéticos de FVIII en ratones en los que se ha suprimido VWF

Tratamiento	Dosis (FVIII:C) / volumen / programa / vía	N
FVIII de origen natural	100 U (FVIII:Ag)/kg / 0.2 mL/20 g de peso corporal / t=0 h / i.v.	24
FVIII-FP 1656	100 U (FVIII:Ag)/kg / 0.2 mL/20 g de peso corporal / t=0 h / i.v.	24

15

**Tabla 4:** Biodisponibilidad (%) de FVIII de origen natural y FVIII modificado, FVIII-FP 1656, tras la inyección i.v. en ratones en los que se ha suprimido VWF

Tratamiento	Biodisponibilidad (%)
FVIII de origen natural	100
FVIII-FP 1656	120.4

20 **Ejemplo 7: Generación de vectores de expresión para VWF de origen natural y proteínas de fusión VWF-albúmina**

En primer lugar se generó un plásmido de expresión que contenía la secuencia de ADNc de VWF de longitud completa en su sitio de clonación múltiple. Para ello, la secuencia codificante de VWF se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el conjunto de cebadores VWF+ y VWF- (SEQ ID NO. 17 y 18) en las condiciones estándar conocidas por los expertos en la técnica (y según se describe, p. ej., en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM *et al.* (eds.) John Wiley & Sons, Inc.; <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>) a partir de un plásmido que contenía ADNc de VWF (que se puede obtener de proveedores comerciales, p. ej., pMT2-VWF de ATCC, N.º 67122). El fragmento de PCR resultante se digirió con la endonucleasa de restricción EcoRI y se ligó en el vector de expresión pIRESpuo3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) que había sido linealizado con EcoRI. El plásmido de expresión resultante que contenía el ADNc de origen natural de VWF después del promotor CMV se denominó pVWF-1570.

Un fragmento de PCR que contenía la secuencia codificante para un conector de glicina/serina de 31 aminoácidos y el ADNc de albúmina humana se amplificó a partir de pFVII-937 que se describe en WO2007/090584 utilizando los cebadores We2994 y We1335 (SEQ ID NO. 19 y 20). A continuación, este fragmento de PCR se digirió con la endonucleasa de restricción NotI y se ligó en pVWF-1570 digerido con NotI. El plásmido resultante que contenía las secuencias codificantes de VWF de origen natural, la secuencia conectora y albúmina humana se denominó pVWF-1574.

35

Con el fin de conseguir la expresión de una proteína de fusión, se tuvieron que eliminar varias bases entre VWF y la secuencia conectora. Esto se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida al sitio de acuerdo con protocolos estándar (kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange XL, Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.) utilizando los oligonucleótidos We2995 y We2996 (SEQ ID NO 21 y 22). El plásmido de expresión resultante denominado pVWF-1572 contenía las secuencias codificantes de VWF en fase con la de un conector de glicina/serina de 31 aminoácidos y albúmina humana. La secuencia de aminoácidos de rVWF-FP expresada se expone como SEQ ID No. 25. La secuencia de aminoácidos de la preproteína VWF humana se expone como SEQ ID NO. 24.

Utilizando los plásmidos y protocolos descritos anteriormente y aplicando técnicas de biología molecular conocidas por los expertos en la técnica (y según se describe, p. ej., en *Current Protocols in Molecular Biology*, *ibid*), un experto puede preparar otros constructos para reemplazar la secuencia de albúmina por otra secuencia de HLEP o la secuencia conectora por otra secuencia conectora.

#### **Ejemplo 8: Purificación de VWF y proteínas de fusión VWF-albúmina**

Se filtraron de forma estéril sobrenadantes de cultivos celulares que contenían VWF de origen natural (rVWF de origen natural) o proteína de fusión VWF-albúmina (rVWF-FP) a través de un filtro de 0.2 µm y se sometieron a diálisis frente a un tampón de equilibración (EB: Tris-HCl 10mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM, pH 7.0). A continuación, este material se aplicó a una columna de Heparina Fractogel equilibrada con EB. La columna se lavó con EB y las proteínas VWF se eluyeron con NaCl 500mM en EB. El pico de elución se concentró y se sometió a diálisis frente a un tampón de FB (3 g/L de cloruro de sodio, 20 g/L de glicina, 5.5 g/L de citrato de trisodio dihidratado, pH 7.0). Finalmente, el material se filtró de forma estéril y se congeló en alícuotas. Cuando procedió, se aplicaron pasos de purificación adicionales que comprendieron cromatografía de intercambio aniónico y/o catiónico, HIC y SEC.

#### **Ejemplo 9: análisis de la actividad y el antígeno de VWF**

Las muestras se analizaron mediante la determinación inmunoturbidimétrica de VWF:Ag (OPAB03, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania) y para determinar la unión a colágeno (ELISA VWF:CBA de Technozym, Ref. 5450301 con el conjunto de calibración 5450310 y el conjunto de control 5450312, Technoclone, Viena, Austria) según describe el fabricante.

La evaluación de VWF:RCo se llevó a cabo utilizando el reactivo BC VWF de Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania, de acuerdo con la descripción del fabricante. Se utilizó el patrón internacional de concentrado como preparado patrón principal para calibrar un preparado patrón obtenido internamente para uso diario.

Se calculan las relaciones de los ensayos de VWF:RCo y VWF:Ag con el fin de comparar este parámetro para diferentes constructos evaluados. Según se muestra en la figura 3, la relación VWF:RCo/VWF:Ag fue comparable para rVWF de origen natural y la proteína de fusión rVWF-C-terminal-albúmina.

Para los análisis farmacocinéticos, se determinó el antígeno de VWF mediante ELISA, cuyo rendimiento es conocido por los expertos en la técnica. Resumiendo, se incubaron microplacas con 100 µL por pocillo del anticuerpo de captura (IgG anti-VWF humano de conejo, Dako A0082 [Dako, Hamburg, Alemania], con un factor de dilución 1:2000 en tampón A [Sigma C3041, Sigma-Aldrich, Munich, Alemania]) durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas tres veces con tampón B (Sigma P3563), cada pocillo se incubó con 200 µL de tampón C (Sigma P3688) durante 1.5 horas a temperatura ambiente (bloqueo). Después de otros tres pasos de lavado con tampón B, se incubaron diluciones en serie de la muestra de prueba en tampón B, así como también diluciones en serie de plasma humano patrón (ORKL21; 20 - 0.2 mU/mL; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania) en tampón B (volúmenes por pocillo: 100 µL), durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado con tampón B, se añadieron 100 µL de una dilución 1:16 000 en tampón B del anticuerpo de detección (IgG anti-VWF humano de conejo, Dako P0226, marcada con peroxidasa) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado con tampón B, se añadieron 100 µL de solución de sustrato (OUVF, Siemens Healthcare Diagnostics) por pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µL de solución de detención no diluida (OSFA, Siemens Healthcare Diagnostics) preparó las muestras para su lectura en un lector de microplacas adecuado a una longitud de onda de 450 nm. A continuación, se calcularon las concentraciones de las muestras de prueba utilizando la curva patrón con el plasma humano patrón como referencia.

#### **Ejemplo 10: Análisis de los multímeros de VWF y de las proteínas de fusión VWF-albúmina**

El análisis de los multímeros de VWF se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa-SDS según se ha descrito recientemente (Tatewaki *et al.*, *Thromb. Res.* 52: 23-32 (1988) y Metzner *et al.*, *Haemophilia* 4 (Supl. 3): 25-32 (1998)) con modificaciones minoritarias. Resumiendo, tras la equilibración en tampón de análisis listo para usar, se utilizaron minigeles de agarosa al 1% (BioRad) para estandarizar el método en la medida de lo posible. Se sometieron cantidades comparables del antígeno de VWF a electroforesis en geles de agarosa-SDS. Tras la inmunotransferencia de Western, las bandas de proteína VWF se detectaron utilizando los anticuerpos anti-VWF

(DAKO, N.º de prod. 0854) o anti-albúmina seguidos de los anticuerpos anti-IgG marcados con fosfatasa alcalina (SIGMA, N.º de prod 1305) y el color de la reacción se cuantificó por densitometría.

5 Utilizando rVWF de origen natural (1570/797) y rVWF-FP (1572/797), se pudo demostrar mediante inmunotransferencia de Western y detección utilizando anticuerpos anti-albúmina o anti-VWF que rVWF-FP forma una distribución regular de multímeros detectada tanto por anticuerpos anti-albúmina como anti-VWF (figura 4). Esto confirma que, aunque cada subunidad del VWF multimérico contiene albúmina, se forma un patrón regular de multímeros de VWF. Obviamente, el resto de albúmina no inhibe la dimerización N-terminal ni la multimerización C-terminal de las moléculas de VWF.

10 **Ejemplo 11: Evaluación de los parámetros farmacocinéticos de VWF y la proteína de fusión VWF-albúmina en ratas tras una única inyección i.v.**

Se administraron rVWF-FP y rVWF de origen natural por vía intravenosa a un total de cuatro ratas CD. La dosis fue de 100 U (VWF:Ag)/kg de peso corporal, con un volumen de inyección de 4 mL/kg.

15 Se tomaron muestras de sangre de forma retroorbital en intervalos adecuados, empezando 5 minutos después de la aplicación de las sustancias de prueba, utilizando un esquema de muestreo alterno, que proporcionó muestras de 2 animales/punto de evaluación (t = 0, 5, 30, 90 min, 4 h, 1 d para el subconjunto N.º 1 y 0, 15 min, 1, 2, 8 h y 2 d para el subconjunto N.º 2). El esquema se diseñó para que minimizara los posibles efectos de la toma de muestras de sangre sobre la concentración en plasma que se debía cuantificar. La sangre se procesó para obtener el plasma y este se guardó ultracongelado hasta el análisis. Posteriormente, se cuantificó el nivel de VWF:Ag en plasma por ELISA según se ha descrito en el ejemplo 9. Para calcular los parámetros farmacocinéticos, se utilizó la concentración media en plasma. La semivida se calculó utilizando los puntos de evaluación de la fase beta de la eliminación de acuerdo con la fórmula  $t_{1/2} = \ln 2 / k$ , donde k es la pendiente de la recta de regresión.

20 Los resultados se representan en la figura 5 (n = 2/punto de evaluación; media). Se calculó que las semividas terminales eran de 32.4 min para rVWF-FP y 2.6 min para rVWF de origen natural. También se mejoró la recuperación para rVWF-FP, siendo de un 42.1%, en comparación con un 16.1% para rVWF de origen natural.

25 LISTA DE SECUENCIAS

<110> CSL BEHRING GMBH CSL BEHRING GMBH

<120> Factor VIII con semivida prolongada

<130> 2008\_M004\_A145

<150> EP 08011429.1

30 < 151>24-06-2008

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

< 211> 36

35 < 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> Cebador

<400> 1

40 caatgccatt gaaccaagac gagaaataac tcgtac 36

<210> 2

< 211> 36

< 212> ADN

< 213> Artificial

45 <220>

< 223> Cebador

<400> 2

gtacgagtta ttctcgtct tggttcaatg gcattg 36

ES 2 531 464 T3

<210> 3  
< 211> 48  
< 212> ADN  
< 213> Artificial

5 <220>  
< 223> Cebador

<400> 3  
caatgccatt gaaccaagac gtcgtggtcg acgagaaata actcgtac 48

10 <210> 4  
< 211> 48  
< 212> ADN  
< 213> Artificial

<220>  
< 223> Cebador

15 <400> 4  
gtacgagtta ttctcgtcg accacgacgt ctgggtcaa tggcattg 48

<210> 5  
< 211> 23  
< 212> ADN  
< 213> Artificial

20 <220>  
< 223> Cebador

<400> 5  
cattattccg gatcaatcaa tgc 23

25 <210> 6  
< 211> 38  
< 212> ADN  
< 213> Artificial

<220>  
< 223> Cebador

30 <400> 6  
acgcgccgc ggtaccggtg tagaggctct gtgcctcg 38

<210> 7  
< 211> 31  
< 212> ADN  
< 213> Artificial

<220>  
< 223> Cebador

35 <400> 7  
gtgaccggtg atgcacacaa gagtgaggtt g 31

<210> 8  
< 211> 32  
< 212> ADN  
< 213> Artificial

45 <220>  
< 223> Cebador

<400> 8  
cacgcgccg cctataagcc taaggcagct tg 32

ES 2 531 464 T3

<210> 9  
< 211> 2016  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

5 <400> 9

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



ES 2 531 464 T3

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  
 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

ES 2 531 464 T3

610				615				620					
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	Thr 645	Asp	Phe	Leu Ser	Val 650	Phe	Phe	Ser	Gly	Tyr 655
Thr	Phe	Lys	His 660	Lys	Met	Val	Tyr	Glu 665	Asp	Thr	Leu	Thr	Leu Phe Pro 670
Phe	Ser	Gly 675	Glu	Thr	Val	Phe	Met 680	Ser	Met	Glu	Asn	Pro 685	Gly Leu Trp
Ile	Leu 690	Gly	Cys	His	Asn	Ser 695	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg 700	Gly	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 725	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu 730	Leu	Ser	Lys	Asn Asn Ala 735
Ile	Glu	Pro	Arg 740	Arg	Arg	Gly	Arg	Arg 745	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr Thr Leu 750
Gln	Ser	Asp 755	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp 760	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile 765	Ser Val Glu
Met	Lys 770	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp 775	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp 780	Glu	Asn Gln Ser
Pro 785	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys 790	Lys	Thr	Arg	His	Tyr 795	Phe	Ile	Ala Ala Val 800
Glu	Arg	Leu	Trp	Asp 805	Tyr	Gly	Met	Ser	Ser 810	Ser	Pro	His	Val Leu Arg 815
Asn	Arg	Ala	Gln 820	Ser	Gly	Ser	Val	Pro 825	Gln	Phe	Lys	Lys	Val Val Phe 830
Gln	Glu	Phe 835	Thr	Asp	Gly	Ser	Phe 840	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr 845	Arg Gly Glu
Leu 850	Asn	Glu	His	Leu	Gly	Leu 855	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile 860	Arg	Ala Glu Val
Glu 865	Asp	Asn	Ile	Met	Val 870	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln 875	Ala	Ser	Arg Pro Tyr 880
Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg Gln Gly



ES 2 531 464 T3

885					890					895					
Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr	Tyr
			900					905					910		
Phe	Trp	Lys	Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu	Phe	Asp
		915					920					925			
Cys	Lys	Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val
	930					935					940				
His	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu
945					950					955					960
Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu	Phe
				965					970					975	
Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met
			980					985					990		
Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr
		995					1000					1005			
Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	
	1010					1015					1020				
Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	
	1025					1030					1035				
Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	
	1040					1045					1050				
His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	
	1055					1060					1065				
Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	
	1070					1075					1080				
Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	
	1085					1090					1095				
Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	
	1100					1105					1110				
Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	
	1115					1120					1125				
Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	
	1130					1135					1140				
Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	

ES 2 531 464 T3

1145	1150	1155
Trp Ser 1160	Thr Lys Glu Pro Phe 1165	Ser Trp Ile Lys Val 1170
Ala Pro 1175	Met Ile Ile His Gly 1180	Ile Lys Thr Gln Gly 1185
Lys Phe 1190	Ser Ser Leu Tyr Ile 1195	Ser Gln Phe Ile Ile 1200
Leu Asp 1205	Gly Lys Lys Trp Gln 1210	Thr Tyr Arg Gly Asn 1215
Thr Leu 1220	Met Val Phe Phe Gly 1225	Asn Val Asp Ser Ser 1230
His Asn 1235	Ile Phe Asn Pro Pro 1240	Ile Ile Ala Arg Tyr 1245
His Pro 1250	Thr His Tyr Ser Ile 1255	Arg Ser Thr Leu Arg 1260
Met Gly 1265	Cys Asp Leu Asn Ser 1270	Cys Ser Met Pro Leu 1275
Ser Lys 1280	Ala Ile Ser Asp Ala 1285	Gln Ile Thr Ala Ser 1290
Thr Asn 1295	Met Phe Ala Thr Trp 1300	Ser Pro Ser Lys Ala 1305
Leu Gln 1310	Gly Arg Ser Asn Ala 1315	Trp Arg Pro Gln Val 1320
Lys Glu 1325	Trp Leu Gln Val Asp 1330	Phe Gln Lys Thr Met 1335
Gly Val 1340	Thr Thr Gln Gly Val 1345	Lys Ser Leu Leu Thr 1350
Val Lys 1355	Glu Phe Leu Ile Ser 1360	Ser Ser Gln Asp Gly 1365
Thr Leu 1370	Phe Phe Gln Asn Gly 1375	Lys Val Lys Val Phe 1380
Gln Asp 1385	Ser Phe Thr Pro Val 1390	Val Asn Ser Leu Asp 1395
Leu Thr	Arg Tyr Leu Arg Ile	His Pro Gln Ser Trp Val His Gln

ES 2 531 464 T3

1400	1405	1410
Ile Ala 1415	Leu Arg Met Glu Val 1420	Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu 1425
Tyr Thr 1430	Gly Asp Ala His Lys 1435	Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys 1440
Asp Leu 1445	Gly Glu Glu Asn Phe 1450	Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe 1455
Ala Gln 1460	Tyr Leu Gln Gln Cys 1465	Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu 1470
Val Asn 1475	Glu Val Thr Glu Phe 1480	Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu 1485
Ser Ala 1490	Glu Asn Cys Asp Lys 1495	Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp 1500
Lys Leu 1505	Cys Thr Val Ala Thr 1510	Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met 1515
Ala Asp 1520	Cys Cys Ala Lys Gln 1525	Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe 1530
Leu Gln 1535	His Lys Asp Asp Asn 1540	Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg 1545
Pro Glu 1550	Val Asp Val Met Cys 1555	Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu 1560
Thr Phe 1565	Leu Lys Lys Tyr Leu 1570	Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro 1575
Tyr Phe 1580	Tyr Ala Pro Glu Leu 1585	Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys 1590
Ala Ala 1595	Phe Thr Glu Cys Cys 1600	Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys 1605
Leu Leu 1610	Pro Lys Leu Asp Glu 1615	Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser 1620
Ser Ala 1625	Lys Gln Arg Leu Lys 1630	Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly 1635
Glu Arg 1640	Ala Phe Lys Ala Trp 1645	Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg 1650
Phe Pro	Lys Ala Glu Phe Ala	Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp

ES 2 531 464 T3

1655		1660		1665
Leu Thr 1670	Lys Val His Thr	Glu 1675	Cys Cys His Gly	Asp 1680
Cys Ala 1685	Asp Asp Arg Ala	Asp 1690	Leu Ala Lys Tyr	Ile 1695
Gln Asp 1700	Ser Ile Ser Ser	Lys 1705	Leu Lys Glu Cys	Cys 1710
Leu Leu 1715	Glu Lys Ser His	Cys 1720	Ile Ala Glu Val	Glu 1725
Met Pro 1730	Ala Asp Leu Pro	Ser 1735	Leu Ala Ala Asp	Phe 1740
Lys Asp 1745	Val Cys Lys Asn	Tyr 1750	Ala Glu Ala Lys	Asp 1755
Gly Met 1760	Phe Leu Tyr Glu	Tyr 1765	Ala Arg Arg His	Pro 1770
Val Val 1775	Leu Leu Leu Arg	Leu 1780	Ala Lys Thr Tyr	Glu 1785
Glu Lys 1790	Cys Cys Ala Ala	Ala 1795	Asp Pro His Glu	Cys 1800
Val Phe 1805	Asp Glu Phe Lys	Pro 1810	Leu Val Glu Glu	Pro 1815
Ile Lys 1820	Gln Asn Cys Glu	Leu 1825	Phe Glu Gln Leu	Gly 1830
Phe Gln 1835	Asn Ala Leu Leu	Val 1840	Arg Tyr Thr Lys	Lys 1845
Val Ser 1850	Thr Pro Thr Leu	Val 1855	Glu Val Ser Arg	Asn 1860
Val Gly 1865	Ser Lys Cys Cys	Lys 1870	His Pro Glu Ala	Lys 1875
Cys Ala 1880	Glu Asp Tyr Leu	Ser 1885	Val Val Leu Asn	Gln 1890
Leu His 1895	Glu Lys Thr Pro	Val 1900	Ser Asp Arg Val	Thr 1905
Thr Glu	Ser Leu Val Asn Arg	Arg Pro Cys Phe Ser	Ala Leu Glu	

ES 2 531 464 T3

	1910		1915		1920	
	Val Asp 1925	Glu Thr Tyr	Val Pro 1930	Lys Glu Phe Asn	Ala 1935	Glu Thr Phe
	Thr Phe 1940	His Ala Asp Ile	Cys 1945	Thr Leu Ser Glu	Lys 1950	Glu Arg Gln
	Ile Lys 1955	Lys Gln Thr Ala	Leu 1960	Val Glu Leu Val	Lys 1965	His Lys Pro
	Lys Ala 1970	Thr Lys Glu Gln	Leu 1975	Lys Ala Val Met	Asp 1980	Asp Phe Ala
	Ala Phe 1985	Val Glu Lys Cys	Cys 1990	Lys Ala Asp Asp	Lys 1995	Glu Thr Cys
	Phe Ala 2000	Glu Glu Gly Lys	Lys 2005	Leu Val Ala Ala	Ser 2010	Gln Ala Ala
	Leu Gly 2015	Leu				

5 <210> 10  
 < 211> 31  
 < 212> ADN  
 < 213> Artificial

<220>  
 < 223> Cebador

<400> 10  
 gcgaccggtg atgacaactc tccttcctt a 31

10 <210> 11  
 < 211> 31  
 < 212> ADN  
 < 213> Artificial

15 <220>  
 < 223> Cebador

<400> 11  
 gcgaccggtc caagtttag gatgctctt g 31

20 <210> 12  
 < 211> 27  
 < 212> ADN  
 < 213> Artificial

<220>  
 < 223> Cebador

25 <400> 12  
 gcgaccggtt cgagcggggg atctggc 27

<210> 13  
 < 211> 28

ES 2 531 464 T3

< 212> ADN  
 < 213> Artificial

<220>  
 < 223> Cebador

5 <400> 13  
 gcgaccggtg gatcccgacc ctccagag 28

<210> 14  
 < 211> 7020  
 < 212> ADN

10 < 213> Homo sapiens

<400> 14

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60  
 accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120  
 ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180  
 acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240  
 gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat 300  
 gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctggt 360  
 ggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420  
 gagaaagaag atgataaagt ctccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg 480  
 aaagagaatg gtccaatggc ctctgacca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540  
 gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa 600  
 gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660  
 tttgatgaag ggaaaagtgg gcaactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat 720  
 gctgcatctg ctctgggctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aacacaggtct 780  
 ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc 840  
 accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat 900  
 cgccaggcgt ccttggaat ctgcgcaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960  
 gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa 1020  
 gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080  
 gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat 1140  
 gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact 1200  
 tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtctctgcc 1260  
 cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg 1320  
 aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380  
 attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaaagtgg agacacactg 1440  
 ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500  
 gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt gaaggatttt 1560

ES 2 531 464 T3

ccaattctgc caggagaaat attcaaataat aatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620  
 actaaatcag atcctcgggtg cctgacccgc tattactcta gtttcgtaa tatggagaga 1680  
 gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740  
 agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800  
 aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg 1860  
 cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt 1920  
 tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980  
 attggagcac agactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040  
 atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100  
 atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgcacaaact cagactttctg gaacagaggc 2160  
 atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac 2220  
 agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaaca atgccattga accaagaagc 2280  
 ttctcccaga attcaagaca ccctagcact aggcaaaagc aatttaatgc caccacaatt 2340  
 ccagaaaatg acatagagaa gactgaccct tggtttgac acagaacacc tatgcctaaa 2400  
 atacaaaatg tctcctctag tgatttgttg atgctcttgc gacagagtcc tactccacat 2460  
 gggctatcct tatctgatct ccaagaagcc aatatgaga ctttttctga tgatccatca 2520  
 cctggagcaa tagacagtaa taacagcctg tctgaaatga cacacttcag gccacagctc 2580  
 catcacagtg gggacatggt atttaccctt gagtcaggcc tccaattaag attaaatgag 2640  
 aaactgggga caactgcagc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttctagtaca 2700  
 tcaataatc tgatttcaac aattccatca gacaatttgg cagcaggtagc tgataatata 2760  
 agttccttag gacccccaag tatgccagtt cattatgata gtcaattaga taccactcta 2820  
 tttggcaaaa agtcatctcc cttactgag tctggtggac ctctgagctt gagtgaagaa 2880  
 aataatgatt caaagttggt agaatcaggt ttaatgaata gccaaagaaag ttcattgggga 2940  
 aaaaatgtat cgtcaacaga gagtggtagg ttattttaaag ggaaaagagc tcatggacct 3000  
 gctttgttga ctaaagataa tgccttattc aaagttagca tctctttgtt aaagacaaac 3060  
 aaaacttcca ataattcagc aactaataga aagactcaca ttgatggccc atcattatta 3120  
 attgagaata gtccatcagt ctggcaaaat atattagaaa gtgacactga gtttaaaaaa 3180  
 gtgacacctt tgattcatga cagaatgctt atggacaaaa atgctacagc tttgaggcta 3240  
 aatcatatgt caaataaaac tacttcatca aaaaacatgg aatgggtcca acagaaaaaa 3300  
 gagggcccca ttccaccaga tgcacaaaat ccagatatgt cgttctttaa gatgctattc 3360  
 ttgccagaat cagcaaggtg gatacaaagg actcatggaa agaactctct gaactctggg 3420  
 caaggcccca gtccaaagca attagtatcc ttaggaccag aaaaatctgt ggaaggtcag 3480  
 aatttcttgt ctgagaaaaa caaagtggta gtaggaaagg gtgaatttac aaaggacgta 3540  
 ggactcaaag agatggtttt tccaagcagc agaaacctat ttcttactaa cttggataat 3600

ES 2 531 464 T3

ttacatgaaa ataatacaca caatcaagaa aaaaaaattc aggaagaaat agaaaagaag 3660  
 gaaacattaa tccaagagaa tgtagttttg cctcagatac atacagtgcac tggcactaag 3720  
 aatttcatga agaacctttt cttactgagc actaggcaaa atgtagaagg ttcatatgac 3780  
 ggggcatatg ctccagtact tcaagatttt aggtcattaa atgattcaac aaatagaaca 3840  
 aagaaacaca cagctcattt ctcaaaaaaa ggggaggaag aaaacttgggaggcttggga 3900  
 aatcaaacca agcaaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatatac tcctaataca 3960  
 agccagcaga attttgtcac gcaacgtagt aagagagcctt tgaacaatt cagactccca 4020  
 ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acacctcaac ccagtggctc 4080  
 aaaaacatga aacatttgac cccgagcacc ctcacacaga tagactaca tgagaaggag 4140  
 aaaggggcca ttactcagtc tcccttatca gattgcctta cgaggagtca tagcatccct 4200  
 caagcaaata gatctccatt acccattgca aaggtatcat catttccatc tattagacct 4260  
 atatatctga ccagggctc attccaagac aactcttctc atcttccagc agcatcttat 4320  
 agaaagaaag attctgggggt ccaagaaagc agtcatttct tacaaggagc caaaaaaat 4380  
 aacctttctt tagccattct aaccttggag atgactggtg atcaaagaga ggttggctcc 4440  
 ctggggacaa gtgccacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctccc 4500  
 aaaccagact tgcccaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaaagt tcacatttat 4560  
 cagaaggacc tattccctac ggaaactagc aatgggtctc ctggccatct ggatctcgtg 4620  
 gaagggagcc ttcttcaggg aacagagggg gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct 4680  
 ggaaaagttc cttttctgag agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta 4740  
 ttgatcctc ttgcttggga taaccactat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa 4800  
 tccaagaga agtcaccaga aaaaacagct ttaagaaaa aggataccat tttgtccctg 4860  
 aacgcttgg aaagcaatca tgcaatagca gcaataaatg agggacaaaa taagcccga 4920  
 atagaagtca cctgggcaaa gcaaggtagg actgaaaggc tgtgctctca aaaccacca 4980  
 gtcttgaac gccatcaacg ggaaataact cgtactactc ttcagtcaga tcaagaggaa 5040  
 attgactatg atgataccat atcagttgaa atgaagaagg aagattttga catttatgat 5100  
 gaggatgaaa atcagagccc ccgcagctt caaaagaaa cacgacacta ttttattgct 5160  
 gcagtggaga ggctctggga ttatgggatg agtagctccc cacatgttct aagaaacagg 5220  
 gctcagagtg gcagtgtccc tcagttcaag aaagttgtt tccaggaatt tactgatggc 5280  
 tcctttactc agcccttata ccgtggagaa ctaaataaac atttgggact cctggggcca 5340  
 tatataagag cagaagttga agataatatac atggtaactt tcagaaatca ggctctcgt 5400  
 ccctattcct tctattctag ccttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa 5460  
 cctagaaaaa actttgtcaa gcctaataag accaaaactt acttttgaa agtgcaacat 5520  
 catatggcac cactaaaga tgagtttgac tgcaaagcct gggcttattt ctctgatgtt 5580  
 gacctgaaa aagatgtgca ctcaggcctg attggacccc ttctggtctg ccacactaac 5640



ES 2 531 464 T3

aactgaacc ctgctcatgg gagacaagtg acagtacagg aatttgctct gtttttcacc 5700  
 atctttgatg agaccaaag ctggtacttc actgaaaata tggaaagaaa ctgcagggtc 5760  
 ccctgcaata tccagatgga agatcccact tttaaagaga attatcgctt ccatgcaatc 5820  
 aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctcaggatca aaggattcga 5880  
 tggtatctgc tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat 5940  
 gtgttctctg tacgaaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccaggt 6000  
 gtttttgaga cagtggaaat gttaccatcc aaagctggaa tttggcgggt ggaatgcctt 6060  
 attggcgagc atctacatgc tgggatgagc aactttttc tgggtgtacag caataagtgt 6120  
 cagactcccc tgggaatggc ttctggacac attagagatt ttcagattac agcttcagga 6180  
 caatatggac agtgggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc 6240  
 tggagcacca aggagccctt ttcttggatc aaggtggatc tgttggcacc aatgattatt 6300  
 cacggcatca agaccaggg tgcccgtcag aagttctcca gcctctacat ctctcagttt 6360  
 atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt atcgaggaaa ttccactgga 6420  
 accttaatgg tcttctttgg caatgtggat tcctctggga taaaacacaa tatttttaac 6480  
 cctccaatta ttgctcgata catccgtttg cacccaactc attatagcat tcgcagcact 6540  
 cttcgcatgg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaatggag 6600  
 agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcacctt actttaccaa tatgtttgcc 6660  
 acctggtctc cttcaaaagc tcgacttcac ctccaagggg ggagtaatgc ctggagacct 6720  
 caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca 6780  
 ggagtaacta ctcaggagtg aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttcctc 6840  
 atctccagca gtcaagatgg ccatcagtg actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag 6900  
 gtttttcagg gaaatcaaga ctcttcaca cctgtggtga actctctaga cccaccgtta 6960  
 ctgactcgct accttcaat tcacccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg 7020

<210> 15  
 < 211> 2332  
 < 212> PRT  
 5 < 213> Homo sapiens

<400> 15

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

ES 2 531 464 T3

50	55	60													
Arg 65	Pro	Pro	Trp	Met	Gly 70	Leu	Leu	Gly	Pro	Thr 75	Ile	Gln	Ala	Glu	Val 80
Tyr	Asp	Thr	Val	Val 85	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn 90	Met	Ala	Ser	His	Pro 95	Val
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	Met 300	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	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Arg

ES 2 531 464 T3

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				

ES 2 531 464 T3

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	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Arg	Ser	Thr	Arg
			740					745					750		
Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Glu	Asn	Asp	Ile	Glu	Lys
		755					760					765			
Thr	Asp	Pro	Trp	Phe	Ala	His	Arg	Thr	Pro	Met	Pro	Lys	Ile	Gln	Asn
	770					775					780				
Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Gln	Ser	Pro	Thr	Pro
785					790					795					800
His	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Tyr	Glu	Thr	Phe
				805					810					815	
Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Ile	Asp	Ser	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser
			820					825					830		
Glu	Met	Thr	His	Phe	Arg	Pro	Gln	Leu	His	His	Ser	Gly	Asp	Met	Val
		835					840					845			
Phe	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Leu	Gln	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu	Lys	Leu	Gly
	850					855					860				
Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	Val	Ser	Ser

ES 2 531 464 T3

865		870		875		880
Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala						
		885		890		895
Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His		900		905		910
Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro		915		920		925
Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp		930		935		940
Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp		945		950		955
						960
Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys		965		970		975
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						

ES 2 531 464 T3

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

ES 2 531 464 T3

1385	1390	1395
Ile Arg 1400	Pro Ile Tyr Leu Thr 1405	Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser 1410
Ser His 1415	Leu Pro Ala Ala Ser 1420	Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val 1425
Gln Glu 1430	Ser Ser His Phe Leu 1435	Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu 1440
Ser Leu 1445	Ala Ile Leu Thr Leu 1450	Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu 1455
Val Gly 1460	Ser Leu Gly Thr Ser 1465	Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys 1470
Lys Val 1475	Glu Asn Thr Val Leu 1480	Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr 1485
Ser Gly 1490	Lys Val Glu Leu Leu 1495	Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys 1500
Asp Leu 1505	Phe Pro Thr Glu Thr 1510	Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu 1515
Asp Leu 1520	Val Glu Gly Ser Leu 1525	Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile 1530
Lys Trp 1535	Asn Glu Ala Asn Arg 1540	Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg 1545
Val Ala 1550	Thr Glu Ser Ser Ala 1555	Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp 1560
Pro Leu 1565	Ala Trp Asp Asn His 1570	Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu 1575
Glu Trp 1580	Lys Ser Gln Glu Lys 1585	Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys 1590
Lys Lys 1595	Asp Thr Ile Leu Ser 1600	Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His 1605
Ala Ile 1610	Ala Ala Ile Asn Glu 1615	Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu 1620
Val Thr 1625	Trp Ala Lys Gln Gly 1630	Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln 1635
Asn Pro	Pro Val Leu Lys Arg	His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr

ES 2 531 464 T3

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



ES 2 531 464 T3

1895	1900	1905
Asp Pro 1910	Thr Phe Lys Glu	Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly 1915 1920
Tyr Ile 1925	Met Asp Thr Leu	Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln 1930 1935
Arg Ile 1940	Arg Trp Tyr Leu	Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile 1945 1950
His Ser 1955	Ile His Phe Ser	Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys 1960 1965
Glu Glu 1970	Tyr Lys Met Ala	Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe 1975 1980
Glu Thr 1985	Val Glu Met Leu	Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val 1990 1995
Glu Cys 2000	Leu Ile Gly Glu	His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu 2005 2010
Phe Leu 2015	Val Tyr Ser Asn	Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala 2020 2025
Ser Gly 2030	His Ile Arg Asp	Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr 2035 2040
Gly Gln 2045	Trp Ala Pro Lys	Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser 2050 2055
Ile Asn 2060	Ala Trp Ser Thr	Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val 2065 2070
Asp Leu 2075	Leu Ala Pro Met	Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly 2080 2085
Ala Arg 2090	Gln Lys Phe Ser	Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile 2095 2100
Met Tyr 2105	Ser Leu Asp Gly	Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn 2110 2115
Ser Thr 2120	Gly Thr Leu Met	Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser 2125 2130
Gly Ile 2135	Lys His Asn Ile	Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr 2140 2145
Ile Arg	Leu His Pro Thr His	Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg



ES 2 531 464 T3

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys  
 50 55 60  
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro  
 85 90 95  
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu  
 100 105 110  
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His  
 115 120 125  
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg  
 130 135 140  
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg  
 145 150 155 160  
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala  
 165 170 175  
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser  
 180 185 190  
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu  
 195 200 205  
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro  
 210 215 220  
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp  
 245 250 255  
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser  
 260 265 270  
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His  
 275 280 285  
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser  
 290 295 300  
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala  
 305 310 315 320

ES 2 531 464 T3

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg  
 325 330 335  
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr  
 340 345 350  
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu  
 355 360 365  
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro  
 370 375 380  
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu  
 385 390 395 400  
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro  
 405 410 415  
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys  
 420 425 430  
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys  
 435 440 445  
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His  
 450 455 460  
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser  
 465 470 475 480  
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr  
 485 490 495  
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp  
 500 505 510  
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
 515 520 525  
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu  
 530 535 540  
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys  
 545 550 555 560  
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val  
 565 570 575  
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
 580 585

<210> 17  
 < 211> 30  
 < 212> ADN  
 < 213> Artificial

5

<220>  
 < 223> Cebador

# ES 2 531 464 T3

<400> 17  
ttcgaattcc cgcagccctc attgcaggg 30

<210> 18  
< 211> 31  
5 < 212> ADN  
< 213> Artificial

<220>  
< 223> Cebador

<400> 18  
10 tccgaattcc ggcagcagca ggcacccatg c 31

<210> 19  
< 211> 25  
< 212> ADN  
< 213> Artificial

15 <220>  
< 223> Cebador

<400> 19  
gcggcggccg cgagcccat ttccc 25

<210> 20  
20 < 211> 18  
< 212> ADN  
< 213> Artificial

<220>  
< 223> Cebador

25 <400> 20  
gagaggagt actcaccc 18

<210> 21  
< 211> 27  
30 < 212> ADN  
< 213> Artificial

<220>  
< 223> Cebador

<400> 21  
ggaagtgcag caagtcgagc gggggat 27

35 <210> 22  
< 211> 27  
< 212> ADN  
< 213> Artificial

<220>  
40 < 223> Cebador

<400> 22  
atccccgct cgactgctg cacttcc 27

ES 2 531 464 T3

<210> 23  
 < 211> 585  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

5 <400> 23

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

ES 2 531 464 T3

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys  
 225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp  
 245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser  
 260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His  
 275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser  
 290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala  
 305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg  
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr  
 340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu  
 355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro  
 370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu  
 385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro  
 405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys  
 420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys  
 435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His  
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser  
 465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr  
 485 490 495

ES 2 531 464 T3

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp  
 500 505 510  
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
 515 520 525  
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu  
 530 535 540  
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys  
 545 550 555 560  
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val  
 565 570 575  
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
 580 585

<210> 24  
 <211> 2813  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

5

<400> 24

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



ES 2 531 464 T3

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly  
 145 150 155 160  
 Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln  
 165 170 175  
 Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala  
 180 185 190  
 Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser  
 195 200 205  
 Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln  
 210 215 220  
 Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu  
 225 230 235 240  
 Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu  
 245 250 255  
 Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala  
 260 265 270  
 Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His  
 275 280 285  
 Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys  
 290 295 300  
 Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met  
 305 310 315 320  
 Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu  
 325 330 335  
 Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His  
 340 345 350  
 Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn  
 355 360 365  
 Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys  
 370 375 380  
 Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp  
 385 390 395 400  
 Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg  
 405 410 415

ES 2 531 464 T3

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys  
 420 425 430  
 Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu  
 435 440 445  
 Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val  
 450 455 460  
 Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu  
 465 470 475 480  
 Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu  
 485 490 495  
 Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu  
 500 505 510  
 Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn  
 515 520 525  
 Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro  
 530 535 540  
 Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln  
 545 550 555 560  
 Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met  
 565 570 575  
 Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe  
 580 585 590  
 Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys  
 595 600 605  
 Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly  
 610 615 620  
 Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val  
 625 630 635 640  
 Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln  
 645 650 655  
 Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu  
 660 665 670  
 Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe  
 675 680 685

ES 2 531 464 T3

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys  
 690 695 700  
 Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp  
 705 710 715 720  
 Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met  
 725 730 735  
 His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val  
 740 745 750  
 Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg  
 755 760 765  
 Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu  
 770 775 780  
 Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met  
 785 790 795 800  
 Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg  
 805 810 815  
 His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln  
 820 825 830  
 Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr  
 835 840 845  
 Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp  
 850 855 860  
 Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly  
 865 870 875 880  
 Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp  
 885 890 895  
 Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys  
 900 905 910  
 Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu  
 915 920 925  
 Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys  
 930 935 940  
 Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg  
 945 950 955 960

ES 2 531 464 T3

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg  
 965 970 975  
 His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val  
 980 985 990  
 Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr  
 995 1000 1005  
 Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn  
 1010 1015 1020  
 Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro  
 1025 1030 1035  
 Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln  
 1040 1045 1050  
 Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe  
 1055 1060 1065  
 Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val  
 1070 1075 1080  
 Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala  
 1085 1090 1095  
 Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln  
 1100 1105 1110  
 His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln  
 1115 1120 1125  
 Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu  
 1130 1135 1140  
 Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln  
 1145 1150 1155  
 His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys  
 1160 1165 1170  
 His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln  
 1175 1180 1185  
 Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly  
 1190 1195 1200  
 Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp  
 1205 1210 1215

ES 2 531 464 T3

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr  
 1220 1225 1230  
 Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr  
 1235 1240 1245  
 Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser  
 1250 1255 1260  
 Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu  
 1265 1270 1275  
 Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe  
 1280 1285 1290  
 Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg  
 1295 1300 1305  
 Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp  
 1310 1315 1320  
 Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser  
 1325 1330 1335  
 Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln  
 1340 1345 1350  
 Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile  
 1355 1360 1365  
 Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu  
 1370 1375 1380  
 Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val  
 1385 1390 1395  
 Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro  
 1400 1405 1410  
 Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile  
 1415 1420 1425  
 Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val  
 1430 1435 1440  
 Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys  
 1445 1450 1455  
 Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met  
 1460 1465 1470

ES 2 531 464 T3

Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu  
1475 1480 1485

Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu  
1490 1495 1500

Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys  
1505 1510 1515

Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp  
1520 1525 1530

Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val  
1535 1540 1545

Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln  
1550 1555 1560

Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr  
1565 1570 1575

Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser  
1580 1585 1590

Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr  
1595 1600 1605

Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile  
1610 1615 1620

Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu  
1625 1630 1635

Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp  
1640 1645 1650

Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg  
1655 1660 1665

Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala  
1670 1675 1680

Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly  
1685 1690 1695

Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe  
1700 1705 1710

Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr  
1715 1720 1725

ES 2 531 464 T3

Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val  
 1730 1735 1740

Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val  
 1745 1750 1755

Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala  
 1760 1765 1770

Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala  
 1775 1780 1785

Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val  
 1790 1795 1800

Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn  
 1805 1810 1815

Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala  
 1820 1825 1830

Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val  
 1835 1840 1845

Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu  
 1850 1855 1860

Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile  
 1865 1870 1875

Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp  
 1880 1885 1890

Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly  
 1895 1900 1905

Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu  
 1910 1915 1920

Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu  
 1925 1930 1935

Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser  
 1940 1945 1950

Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu  
 1955 1960 1965

Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp  
 1970 1975 1980

ES 2 531 464 T3

Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg  
 1985 1990 1995  
 Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser  
 2000 2005 2010  
 Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu  
 2015 2020 2025  
 Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr  
 2030 2035 2040  
 Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile  
 2045 2050 2055  
 Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser  
 2060 2065 2070  
 Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys  
 2075 2080 2085  
 Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val  
 2090 2095 2100  
 Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg  
 2105 2110 2115  
 Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys Leu Val  
 2120 2125 2130  
 Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala  
 2135 2140 2145  
 Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys  
 2150 2155 2160  
 Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala  
 2165 2170 2175  
 Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp  
 2180 2185 2190  
 Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val  
 2195 2200 2205  
 Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn  
 2210 2215 2220  
 Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro  
 2225 2230 2235



ES 2 531 464 T3

Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala  
 2240 2245 2250  
 Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu  
 2255 2260 2265  
 Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys  
 2270 2275 2280  
 Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr  
 2285 2290 2295  
 Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg  
 2300 2305 2310  
 Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp  
 2315 2320 2325  
 Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly  
 2330 2335 2340  
 Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe  
 2345 2350 2355  
 Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro  
 2360 2365 2370  
 Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys  
 2375 2380 2385  
 Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val  
 2390 2395 2400  
 Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys  
 2405 2410 2415  
 Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His  
 2420 2425 2430  
 Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys  
 2435 2440 2445  
 Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu  
 2450 2455 2460  
 Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg  
 2465 2470 2475  
 Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg  
 2480 2485 2490

ES 2 531 464 T3

Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly  
 2495 2500 2505

Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser  
 2510 2515 2520

Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu  
 2525 2530 2535

Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu  
 2540 2545 2550

Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser  
 2555 2560 2565

Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met  
 2570 2575 2580

Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp  
 2585 2590 2595

Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser  
 2600 2605 2610

Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro  
 2615 2620 2625

Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg  
 2630 2635 2640

Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile  
 2645 2650 2655

Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr  
 2660 2665 2670

His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys  
 2675 2680 2685

Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala  
 2690 2695 2700

Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr  
 2705 2710 2715

Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr  
 2720 2725 2730

Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His  
 2735 2740 2745

ES 2 531 464 T3

Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp  
 2750 2755 2760  
 Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg  
 2765 2770 2775  
 Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val  
 2780 2785 2790  
 Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro  
 2795 2800 2805  
 Arg Lys Cys Ser Lys  
 2810

<210> 25  
 <211> 3429  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la preproteína de fusión VWF-albúmina

<400> 25

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

10

ES 2 531 464 T3

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

ES 2 531 464 T3

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu  
 435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val  
 450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu  
 465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu  
 485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu  
 500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn  
 515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro  
 530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln  
 545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met  
 565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe  
 580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys  
 595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly  
 610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val  
 625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln  
 645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu  
 660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe  
 675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys  
 690 695 700

ES 2 531 464 T3

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp  
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met  
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val  
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg  
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu  
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met  
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg  
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln  
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr  
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp  
850 855 860

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly  
865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp  
885 890 895

Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys  
900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu  
915 920 925

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys  
930 935 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg  
945 950 955 960

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg  
965 970 975

ES 2 531 464 T3

His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val  
 980 985 990

Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr  
 995 1000 1005

Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn  
 1010 1015 1020

Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro  
 1025 1030 1035

Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln  
 1040 1045 1050

Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe  
 1055 1060 1065

Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val  
 1070 1075 1080

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala  
 1085 1090 1095

Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln  
 1100 1105 1110

His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln  
 1115 1120 1125

Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu  
 1130 1135 1140

Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln  
 1145 1150 1155

His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys  
 1160 1165 1170

His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln  
 1175 1180 1185

Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly  
 1190 1195 1200

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp  
 1205 1210 1215

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr  
 1220 1225 1230

ES 2 531 464 T3

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



ES 2 531 464 T3

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

ES 2 531 464 T3

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

ES 2 531 464 T3

Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser  
 2000 2005 2010

Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu  
 2015 2020 2025

Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr  
 2030 2035 2040

Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile  
 2045 2050 2055

Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser  
 2060 2065 2070

Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys  
 2075 2080 2085

Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val  
 2090 2095 2100

Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg  
 2105 2110 2115

Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys Leu Val  
 2120 2125 2130

Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala  
 2135 2140 2145

Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys  
 2150 2155 2160

Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala  
 2165 2170 2175

Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp  
 2180 2185 2190

Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val  
 2195 2200 2205

Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn  
 2210 2215 2220

Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro  
 2225 2230 2235

Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala  
 2240 2245 2250

ES 2 531 464 T3

Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu  
 2255 2260 2265  
 Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys  
 2270 2275 2280  
 Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr  
 2285 2290 2295  
 Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg  
 2300 2305 2310  
 Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp  
 2315 2320 2325  
 Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly  
 2330 2335 2340  
 Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe  
 2345 2350 2355  
 Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro  
 2360 2365 2370  
 Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys  
 2375 2380 2385  
 Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val  
 2390 2395 2400  
 Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys  
 2405 2410 2415  
 Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His  
 2420 2425 2430  
 Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys  
 2435 2440 2445  
 Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu  
 2450 2455 2460  
 Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg  
 2465 2470 2475  
 Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg  
 2480 2485 2490  
 Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly  
 2495 2500 2505

ES 2 531 464 T3

Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser  
 2510 2515 2520  
 Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu  
 2525 2530 2535  
 Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu  
 2540 2545 2550  
 Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser  
 2555 2560 2565  
 Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met  
 2570 2575 2580  
 Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp  
 2585 2590 2595  
 Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser  
 2600 2605 2610  
 Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro  
 2615 2620 2625  
 Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg  
 2630 2635 2640  
 Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile  
 2645 2650 2655  
 Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr  
 2660 2665 2670  
 His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys  
 2675 2680 2685  
 Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala  
 2690 2695 2700  
 Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr  
 2705 2710 2715  
 Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr  
 2720 2725 2730  
 Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His  
 2735 2740 2745  
 Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp  
 2750 2755 2760

ES 2 531 464 T3

Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg  
 2765 2770 2775

Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val  
 2780 2785 2790

Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro  
 2795 2800 2805

Arg Lys Cys Ser Lys Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly  
 2810 2815 2820

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly  
 2825 2830 2835

Ser Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His  
 2840 2845 2850

Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu  
 2855 2860 2865

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His  
 2870 2875 2880

Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val  
 2885 2890 2895

Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu  
 2900 2905 2910

Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr  
 2915 2920 2925

Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn  
 2930 2935 2940

Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg  
 2945 2950 2955

Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp  
 2960 2965 2970

Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg  
 2975 2980 2985

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys  
 2990 2995 3000

Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys  
 3005 3010 3015

ES 2 531 464 T3

Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly  
 3020 3025 3030

Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln  
 3035 3040 3045

Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu  
 3050 3055 3060

Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu  
 3065 3070 3075

Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp  
 3080 3085 3090

Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile  
 3095 3100 3105

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys  
 3110 3115 3120

Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu  
 3125 3130 3135

Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe  
 3140 3145 3150

Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp  
 3155 3160 3165

Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro  
 3170 3175 3180

Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu  
 3185 3190 3195

Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys  
 3200 3205 3210

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro  
 3215 3220 3225

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly  
 3230 3235 3240

Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys  
 3245 3250 3255

Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn  
 3260 3265 3270

ES 2 531 464 T3

Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys  
 3275 3280 3285  
 Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln  
 3290 3295 3300  
 Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr  
 3305 3310 3315  
 Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser  
 3320 3325 3330  
 Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala  
 3335 3340 3345  
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys  
 3350 3355 3360  
 Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys  
 3365 3370 3375  
 His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp  
 3380 3385 3390  
 Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys  
 3395 3400 3405  
 Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser  
 3410 3415 3420  
 Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
 3425



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un factor de von Willebrand (VWF) modificado o un complejo que comprende factor VIII (FVIII) no modificado y VWF modificado, donde el VWF modificado está fusionado en una parte C-terminal del polipéptido de traducción primario de VWF con la parte N-terminal de un polipéptido que mejora la semivida (HLEP), donde el HLEP es albúmina y donde
- a. el VWF modificado presenta un incremento de la semivida funcional de al menos un 25% en comparación con la semivida funcional del correspondiente VWF de origen natural o
- 10 el complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado presenta un incremento de la semivida funcional de al menos un 25% en comparación con el complejo correspondiente de FVIII de origen natural y VWF de origen natural.
2. El VWF modificado o el complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado de acuerdo con la reivindicación 1, donde
- a. el VWF modificado presenta un incremento de la semivida del antígeno de al menos un 25% en comparación con la semivida del antígeno del correspondiente VWF de origen natural o
- 15 b. el complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado presenta un incremento de la semivida del antígeno de al menos un 25% en comparación con el complejo correspondiente de FVIII de origen natural y VWF de origen natural.
3. El VWF modificado o el complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde
- 20 a. el VWF modificado presenta un incremento de la recuperación *in vivo* en comparación con la recuperación *in vivo* de VWF de origen natural o
- b. el complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado presenta un incremento de la recuperación *in vivo* en comparación con la recuperación *in vivo* del complejo correspondiente que comprende FVIII de origen natural y VWF de origen natural.
- 25 4. El VWF modificado o el complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado de acuerdo con la reivindicación 3, donde el VWF modificado presenta un incremento de la recuperación *in vivo* de al menos un 10% en comparación con la recuperación *in vivo* del correspondiente VWF de origen natural o el complejo que comprende dicho VWF modificado presenta un incremento de la recuperación *in vivo* de al menos un 10% en comparación con el complejo correspondiente de FVIII de origen natural y VWF de origen natural.
- 30 5. El VWF modificado o el complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el VWF modificado presenta al menos un 10% de la actividad biológica del VWF de origen natural o el complejo que comprende el VWF modificado presenta al menos un 10% de la actividad biológica del complejo correspondiente de FVIII de origen natural y VWF de origen natural.
- 35 6. El VWF modificado o el complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el HLEP está fusionado con un aminoácido de VWF situado a una distancia del aminoácido C-terminal de un máximo de un 5% de la longitud total del polipéptido de traducción primario de VWF, basándose en el número total de aminoácidos en el polipéptido de traducción primario de VWF.
- 40 7. El polipéptido modificado o el complejo de acuerdo con la reivindicación 6, donde se han eliminado 1-20 aminoácidos en el extremo C-terminal natural del polipéptido de traducción primario de VWF y donde el aminoácido C-terminal resultante del polipéptido VWF está fusionado con el aminoácido N-terminal de HLEP.
8. El polipéptido modificado o el complejo de acuerdo con la reivindicación 7, donde se ha eliminado el aminoácido C-terminal natural del polipéptido de traducción primario de VWF y donde el aminoácido C-terminal resultante del polipéptido VWF está fusionado con el aminoácido N-terminal de HLEP.
- 45 9. Un polinucleótido o un grupo de polinucleótidos que codifican un polipéptido o un complejo que comprende dicho VWF modificado o un complejo que comprende dicho VWF modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. Un plásmido o vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 9, o un grupo de plásmidos o vectores, donde dicho grupo comprende el grupo de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9.
- 50 11. Una célula huésped que comprende un polinucleótido o un grupo de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9 o un plásmido o vector o un grupo de plásmidos o vectores de acuerdo con la reivindicación 10.

12. Un método para producir un VWF modificado, que comprende:
- (a) cultivar células huésped de acuerdo con la reivindicación 11 en condiciones en las que se exprese el VWF modificado; y
  - (b) opcionalmente recuperar el VWF modificado de las células huésped o del medio de cultivo.
- 5 13. Una composición farmacéutica que comprende un VWF modificado o un complejo que comprende dicho VWF modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, un polinucleótido o grupo de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9, o un plásmido o vector o un grupo de plásmidos o vectores de acuerdo con la reivindicación 10.
- 10 14. El uso de un VWF o un complejo que comprende dicho VWF modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, un polinucleótido o un grupo de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9, o un plásmido o vector o grupo de plásmidos o vectores de acuerdo con la reivindicación 10, o de una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 11 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno de coagulación de la sangre.
15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, donde el trastorno de coagulación de la sangre es la hemofilia A.
- 15 16. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, donde el trastorno de coagulación de la sangre es la enfermedad de von Willebrand.
17. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 15 y 16, donde el tratamiento comprende terapia génica humana.
18. Un método para preparar un VWF modificado con un incremento de la semivida funcional, que comprende fusionar la parte N-terminal de un polipéptido que mejora la semivida con una parte C-terminal del polipéptido de traducción primario de VWF.
- 20 19. Un método para preparar un complejo que comprende FVIII no modificado y VWF modificado mezclando FVIII de origen natural con un VWF modificado preparado mediante el método de la reivindicación 18.

**Figura 1: Niveles de antígeno y actividad de FVIII de origen natural (457) y de polipéptidos de fusión FVIII-C-terminal-albúmina (1434)**

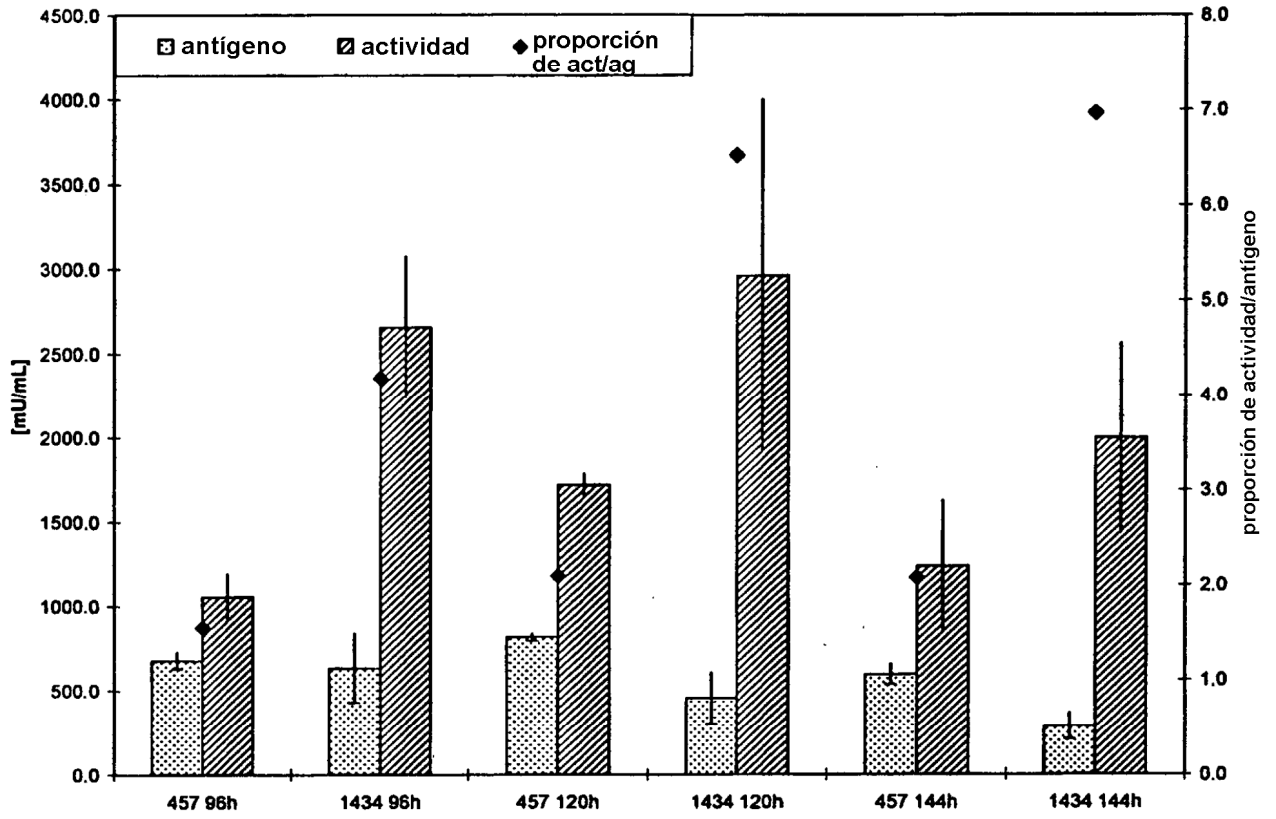


Figura 2: Comparación de los parámetros farmacocinéticos de FVIII humano: Ag en ratones con supresión de VWF tras la inyección i.v. de 100 U (FVIII:Ag)/kg de FVIII de origen natural y FVIII-FP 1656 VWF (media; n=4/punto de evaluación)

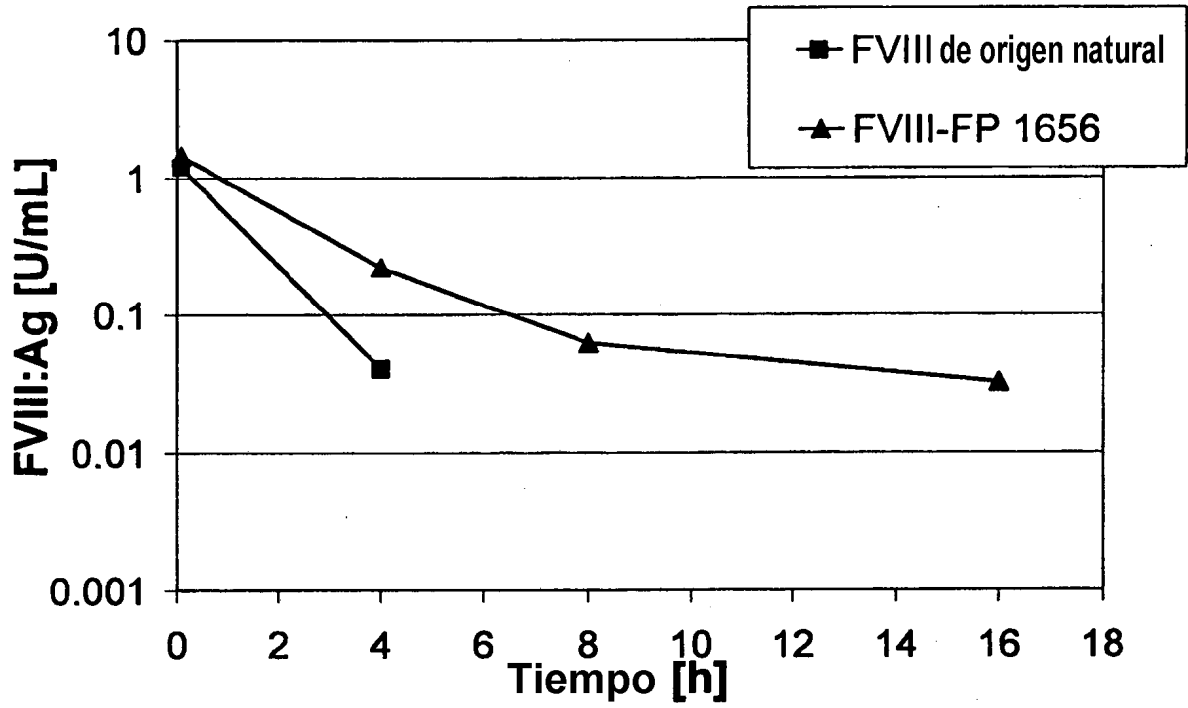
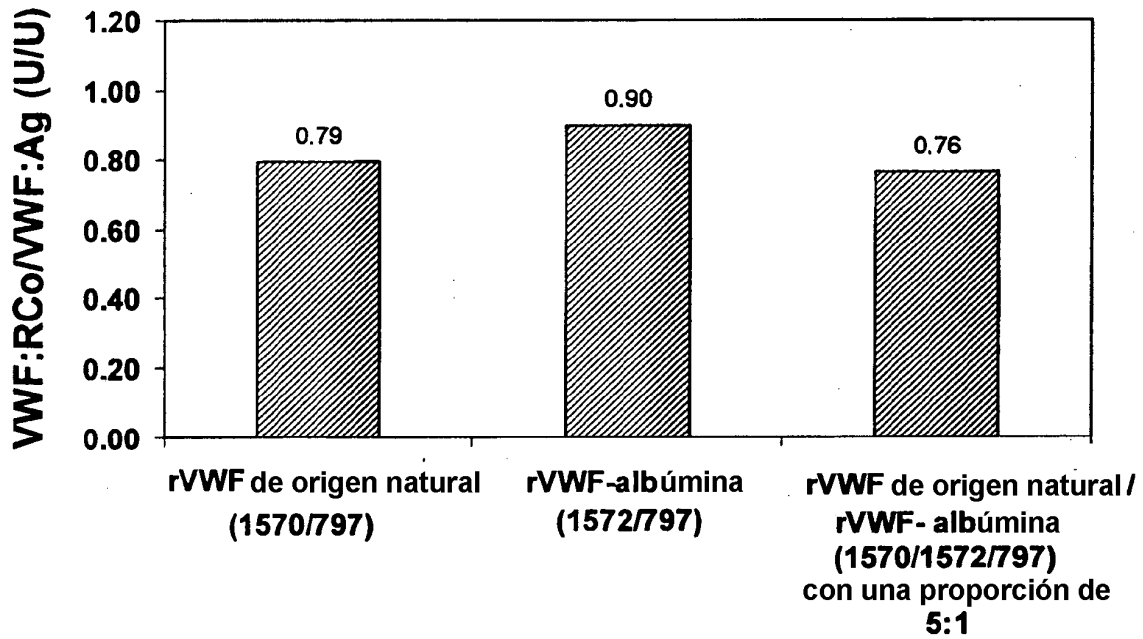
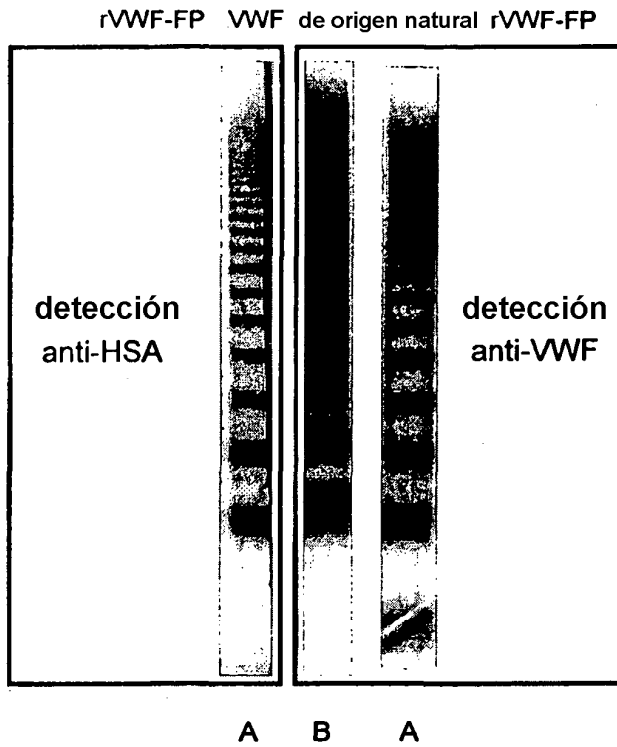


Figura 3: Proporciones de VWF:RCo/VWF:Ag de sobrenadantes de cultivos celulares que contienen rVWF de origen natural (1570/797), rVWF-FP (1572/797) que contiene albúmina unida al extremo C-terminal, o un cultivo celular de expresión mixta que contiene una mezcla de rVWF de origen natural (1570/797) y rVWF-FP (1572/797) transfectada con una proporción de 5:1. Se obtuvieron valores de aproximadamente 0.8 en cada caso, los cuales son próximos a 1, que corresponde a la proporción teórica de NHP de acuerdo con las definiciones de las unidades.



**Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa-SDS de rVWF de origen natural (1570/797) (B) y rVWF-FP (1572/797), ambos expresados en células HEK (A). Las bandas se detectaron utilizando o bien anticuerpos para VWF o para albúmina (ASH).**



A = rVWF-FP (expresado en presencia de furina)

B = VWF de origen natural (expresado en presencia de furina)

Figura 5: Análisis FC de rVWF de origen natural y rVWF-FP en ratas basado en la determinación de VWF:Ag.

