

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 055**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2009 E 13162174 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2679678**

54 Título: **Polipéptidos de factor VII que se modifican y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**11.04.2008 US 124021 P**

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

**12.07.2016**

73 Titular/es:

**CATALYST BIOSCIENCES, INC. (100.0%)  
260 Littlefield Avenue  
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**MADISON, EDWIN y  
THANOS, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 577 055 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

Polipéptidos de factor VII que se modifican y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

Se proporcionan proteínas terapéuticas modificadas. En particular se proporcionan polipéptidos del Factor VII modificados particulares, que incluyen el Factor VIIa y otras formas del Factor VII.

10 **Antecedentes**

La hemostasia es el proceso fisiológico complejo que conduce al cese del sangrado. Las plaquetas, las proteínas del plasma y los vasos sanguíneos y células endoteliales son los tres componentes de este proceso que desempeñan cada uno un papel importante en los acontecimientos que siguen inmediatamente a la lesión tisular y que, en circunstancias normales, dan como resultado la rápida formación de un coágulo. Es central a esto la cascada de coagulación, una serie de acontecimientos proteolíticos en los que ciertas proteínas del plasma (o factores de coagulación) se activan secuencialmente en una "cascada" por otro factor de coagulación previamente activado, lo que conduce a la rápida generación de trombina. Las grandes cantidades de trombina producidas en esta cascada actúan después para escindir el fibrinógeno en los péptidos de fibrina que se requiere para formación de coágulos.

Los factores de coagulación circulan como zimógenos monocatenarios inactivos, y se activan por escisión en una o más posiciones para generar una forma activada bicatenaria de la proteína. El Factor VII (FVII), una proteína del plasma dependiente de vitamina K, circula inicialmente en la sangre como un zimógeno. El zimógeno de FVII se activa por escisión proteolítica en un único sitio, Arg<sup>152</sup>-Ile<sup>153</sup>, dando como resultado una proteasa bicatenaria ligada a un único enlace disulfuro (FVIIa). FVIIa se une con su cofactor, el factor tisular (FT), para formar un complejo en el que FVIIa puede activar eficazmente el factor X (FX) a FXa, iniciando de este modo la serie de acontecimientos que dan como resultado la formación de fibrina y hemostasia.

Aunque se consigue hemostasia normal en la mayoría de los casos, los defectos en el proceso pueden conducir a trastornos hemorrágicos en los que se prolonga el tiempo que se tarda en la formación del coágulo. Dichos trastornos pueden ser congénitos o adquiridos. Por ejemplo, la hemofilia A y B son enfermedades heredadas caracterizadas por deficiencias en el factor VIII (FVIII) y el factor IX (FIX), respectivamente. La terapia de reemplazo es el tratamiento tradicional para la hemofilia A y B, e implica la administración intravenosa de FVIII o FIX, bien preparada a partir de plasma humano o bien como proteínas recombinantes. En muchos casos, sin embargo, los pacientes desarrollan anticuerpos (también conocidos como inhibidores) contra las proteínas infundidas, que reduce o niega la eficacia del tratamiento. Se ha aprobado FVIIa recombinante (Novoseven® (Factor VIIa de Coagulación (Recombinante))) para el tratamiento de pacientes de hemofilia A o B que tienen inhibidores para FVIII o FIX, y también se usa para detener episodios de sangrado o evitar el sangrado asociado con traumatismo y/o cirugía. El FVIIa recombinante también se ha aprobado para el tratamiento de pacientes con deficiencia en FVII congénita, y se están utilizando crecientemente en usos extraoficiales, tales como el tratamiento de sangrado asociado con otros trastornos de sangrado congénitos o adquiridos, traumatismo, y cirugía en pacientes no hemofílicos.

El uso de FVIIa recombinante para promover la formación de coagulación subraya su importancia creciente como un agente terapéutico. La terapia con FVIIa deja necesidades médicas significativas no satisfechas. Por ejemplo, basándose en los datos de ensayos clínicos, se requiere un promedio de tres dosis de FVIIa durante un periodo de tiempo de 6 horas o más para controlar episodios de hemorragia aguda en pacientes con hemofilia. Son necesarias variantes más eficaces de FVIIa para reducir estos requisitos. Por lo tanto, entre los objetos del presente documento, es un objeto proporcionar polipéptidos de FVII modificados que se diseñan para tener propiedades terapéuticas mejoradas.

Bjelke *et al.* (A loop of coagulation factor VIIa influencing macromolecular substrate specificity. FEBS LETTERS, 2007, vol. 581, n.º. 1. páginas 71-76) describen un polipéptido quimérico FVII-FX modificado, designado FVIIaFXLOOP, en el que el bucle Gly283-Met298 de FVII se reemplaza con el bucle correspondiente del Factor X (FX) para introducir una lisina en la posición correspondiente a 298. El bucle introduce 12 reemplazos de aminoácidos. En virtud de la introducción del bucle, el polipéptido quimérico contiene Q286R, que Bjelke *et al.* indica que es deletéreo. Para compensar la introducción de la mutación Q286R deletérea, así como otras, Bjelke *et al.* describe mutaciones de reparación adicionales fuera del bucle intercambiado en las posiciones 158, 176 y 341. El polipéptido quimérico FVII-FX contiene, por lo tanto, 15 reemplazos de aminoácidos.

La solicitud de patente internacional WO2007/031559 que describe polipéptidos del Factor VII (FVII) modificados, enumera 40 posiciones en FVII que pueden reemplazarse e indica que cada posición enumerada puede reemplazarse con cualquier aminoácido.

El documento WO2007/031559, por lo tanto, proporciona miles de modificaciones posibles. El único polipéptido de FVII con un reemplazo en 286 que se desvela en el documento WO2007/031559 es un polipéptido con el reemplazo Q286A, que el documento WO2007/031559 describe como no deseable.

## Sumario

La presente invención proporciona un polipéptido de factor VII (FVII) modificado, que comprende una modificación en un polipéptido de FVII, donde:

5 la modificación están en una posición correspondiente a la posición 286 en un polipéptido de FVII que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o en un resto correspondiente en un locus alineado en un polipéptido de FVII;

10 la modificación en la posición 286 es un reemplazo de aminoácido con una Arg (R);

15 el polipéptido FVII modificado, cuando se activa, muestra actividad coagulante aumentada en comparación con el polipéptido de FVII que no tiene la modificación en la posición 286; el polipéptido FVII modificado comprende solamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 modificaciones de aminoácidos en comparación con un polipéptido no modificado y, opcionalmente, contiene un dominio Gla heterólogo o una parte del mismo; y el polipéptido FVII no modificado comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-3.

20 Se proporciona en el presente documento polipéptidos del Factor VII (FVII) modificados de acuerdo con las presentes reivindicaciones. En particular, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que muestran actividades procoagulantes. Los polipéptidos de FVII de acuerdo con las presentes reivindicaciones se modifican en secuencia primaria en comparación con un polipéptido de FVII no modificado, y pueden incluir inserciones, deleciones y reemplazos de aminoácidos. Se describen además en el presente documento polipéptidos de FVII modificados incluyendo polipéptidos FVII que muestran los que tienen resistencia aumentada a inhibidores tales como antitrombina III (AT-III) e inhibidor de la ruta del factor tisular (IRFT), los que tienen resistencia aumentada a los efectos inhibidores de  $Zn^{2+}$ , los que tienen actividad catalítica aumentada en presencia y/o ausencia de FT, los que tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como semivida aumentada, los que tienen unión y/o afinidad aumentadas para la superficie de plaquetas, los que tienen unión y/o afinidad aumentada con albúmina de suero, y los que tienen unión y/o afinidad aumentada con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Los polipéptidos de FVII modificados pueden contener cualquier combinación de modificaciones descritas en el presente documento, por lo que una o más actividades o propiedades del polipéptido se alteran en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. Típicamente, el polipéptido de FVII modificado conserva la actividad procoagulante. También se proporcionan en el presente documento moléculas de ácido nucleico, vectores y células que codifican/expresan polipéptidos de FVII modificados de acuerdo con las presentes reivindicaciones. Las composiciones farmacéuticas y polipéptidos de FVII modificados de acuerdo con las reivindicaciones para su uso en métodos de tratamiento también se proporcionan en el presente documento. Los polipéptidos de FVII incluyen variantes alélicas y de especie y polipéptidos y otras variantes que tienen modificaciones que afectan a otras actividades y/o propiedades. También se describen fragmentos activos de los polipéptidos de FVII que incluyen una modificación proporcionada en el presente documento. Son ejemplos de polipéptidos de FVII los que incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, así como variantes de los mismos que tienen 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 88 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con la misma.

45 Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de factor VII (FVII) modificados que contienen una modificación en un polipéptido de FVII en la posición Q286 en un polipéptido de FVII que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o en restos correspondientes en un polipéptido de FVII. La modificación es un reemplazo de aminoácidos con Arg (R). La modificación puede realizarse en un polipéptido de FVII no modificado que contiene una secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-3, o una variante alélica o de especie de la misma.

50 Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento contienen un reemplazo de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 286 en un polipéptido de FVII que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o en un resto correspondiente en un polipéptido de FVII, en el que la modificación es reemplazo en la posición 286 por el aminoácido básico Arg(R) que da como resultado un polipéptido de FVII modificado que muestra actividad coagulante aumentada en comparación con el polipéptido de FVII que no tiene la modificación en la posición 286. Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado proporcionado en el presente documento puede contener un reemplazo de Gln (Q) con Arg (R) en la posición 286.

60 En algunos ejemplos, los polipéptidos de FVII modificados tienen solamente la modificación individual en la posición 286. En otros ejemplos, los polipéptidos de FVII modificados también contienen una o más modificaciones adicionales en otra posición en el polipéptido de FVII. La modificación adicional puede ser un reemplazo, una inserción o una deleción de aminoácidos. Por ejemplo, la modificación adicional puede ser un reemplazo de aminoácidos en una posición correspondiente a una posición seleccionada de entre A51, S52, P54, S60, Q66, Y68, K109, S119, A122, G124, T130, E132, V158, K161, A175, D196, K197, K199, R202, H216, S222, G237, T239, H257, L287, R290 A292, A294, E296, M298, L305, S314, G318, P321, K337, K341, Q366, H373, F374, E394, P395 y R396. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen D196K, D196R, D196A, D196Y, D196F, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E,

G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, R290M, R290V, K341E, K341R, K341Q, K341N, K341M, K341D, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA, K197I198insS, T239S, T239N, T239Q, T239V, T239L, T239H, T239I, L287T, M298Q, P321K, P321E, P321Y, P321S, Q366D, Q366E, Q366N, Q366T, Q366S, Q366V, Q366I, Q366L, Q366M, H373D, H373E, H373S, H373L, H373I, H373F, H373A, K161S, K161A, K161V, H216S, H216A, H216K, H216R, S222A, S222K, S222V, S222N, S222E, S222D, H257A, H257S, Intercambio de Gla FIX, {Intercambio de Gla FIX/E40L}, {Intercambio de Gla FIX/K43I}, {Intercambio de Gla FIX/Q44S}, {Intercambio de Gla FIX/M19K}, {Intercambio de Gla FIX/M19K/E40L/K43I/Q44S}, Intercambio de Gla FX, Intercambio de Gla Prot C, Intercambio de Gla Prot S, Intercambio de Gla Trombina, S52A, S60A, E394N, P395A, R396S, R202S, A292N, A294S, G318N, A175S, K109N, A122N, G124S, A51N, T130N, E132S, S52N, P54S, S119N, L121S, T128N, P129A, Q66N, Y68S, S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE, H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE, T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE, S103S111delinsDICLPRWGCLWED, H115S126delinsDICLPRWGCLWED, T128P134delinsDICLPRWGCLWED, P406insIEDICLPRWGCLW, P406insGGGSIEDICLPRWGCLW, P406insDICLPRWGCLWED, P406insGGSDICLPRWGCLWED, S103S111delinsSFGRGDIRNV, H115S126delinsSFGRGDIRNV, T127P134delinsSFGRGDIRNV, P406insCSFGRGDIRNVC, P406insGGGSCSFGRGDIRNVC, V158T, V158D, L287T, E296V, M298K y M298Q.

Son ejemplos de los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento los que contienen modificaciones Q286R/M298Q, Q286R/Intercambio de Gla FIX, Q286R/H257A, Q286R/S222A, Q286R/S222A/H257A, Q286R/S222A/Intercambio de Gla FIX, Q286R/H257A/Intercambio de Gla FIX, Q286R/S222A/H257A/Intercambio de Gla FIX, Q286R/M298Q/K341Q, Q286R/M298Q/K199E, Q286R/M298Q/Intercambio de Gla FIX, Q286R/Q366V, Q286R/A292N/A294S/Q366V, A175S/Q286R/Q366V, S222A/Q286R/Q366V, H257S/Q286R, H257S/Q286R/Q366V, S222A/H257A/Q286R/Q366V, Q286R/H373A, S222A/H257A/Q286R/M158Q, Q286R/K341D, Q286R/Q366D, Q286R/Q366N, Q286R/M298Q/Q366D, Q286R/M298Q/Q366N, Q286R/H373F, Q286R/M298Q/H373F, {Intercambio de Gla FIX/E40L}/Q286R/M298Q, {Intercambio de Gla FIX/K43I}/Q286R/M298Q, {Intercambio de Gla FIX/Q44S}/Q286R/M298Q, {Intercambio de Gla FIX/M19K}/Q286R/M298Q, {Intercambio de Gla FIX/M19K/E40L/K43I/Q44S} /Q286R/M298Q, T128N/P129A/Q286R, T128N/P129A/Q286R/M298Q, T128N/P129A/Q286R/H373F, V158D/Q286R/E296V/M298Q, Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/S222A/Q286R, Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/Q286R/M298Q, T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/M298Q, T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F, S52A/S60A/Q286R, Intercambio de Gla FIX/S52A/S60A/S222A/Q286R, S52A/S60A/Q286R/M298Q, Intercambio de Gla FIX/S52A/S60A/Q286R/M298Q, S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M298Q, S52A/S60A/Q286R/H373F/, S52A/S60A/Q286R/M298Q/H373F, T239V/Q286R, Intercambio de Gla FIX/S222A/T239V/Q286R, T239V/Q286R/M298Q, S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q, Intercambio de Gla FIX/T239V/Q286R/M298Q, T239V/Q286R/H373F, T239V/Q286R/M298Q/H373F, T239I/Q286R, Intercambio de Gla FIX/S222A/T239I/Q286R, T239I/Q286R/M298Q, S222A/T239I/H257A/Q286R/M298Q, Intercambio de Gla FIX/T239I/Q286R/M298Q, T239I/Q286R/H373F, T239I/Q286R/M298Q/H373F, Intercambio de Gla FIX/S222A/Q286R/H373F, Intercambio de Gla FIX/S222A/Q286R/M298Q, Intercambio de Gla FIX/S222A/Q286R/M298Q/H373F, V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F, H257A/Q286R/M298Q, H257S/Q286R/M298Q, Intercambio de Gla FIX/S222A/H257S/Q286R/, S222A/H257S/Q286R/M298Q, H257S/Q286R/M298Q/H373F, S222A/Q286R/M298Q/H373F, S222A/Q286R/M298Q, T128N/P129A/A175S/Q286R, A122N/G124S/A175S/Q286R, Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/A175S/S222A/Q286R, Intercambio de Gla FIX/A122N/G124S/A175S/S222A/Q286R, T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q, A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q, T128N/P129A/A75S/S222A/H257A/Q286R/M298Q, A122N/G124S/A75S/S222A/H257A/Q286R/M298Q, T128N/P129A/A75S/Q286R/M298Q/H373F, A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F, {Intercambio de Gla FIX /K43I}/T28N/P129A/Q286R/M298Q, T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N, {Intercambio de Gla FIX/K43I}/T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N, V158D/Q286R/E296V/M298Q, T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F, T239V/Q286R/M298Q/Q366N, T239I/Q286R/M298Q/Q366N, T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q, T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q, T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q/H373F, T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q o T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q/H373F.

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados de acuerdo con las presentes reivindicaciones que contienen dos o más modificaciones en un polipéptido de FVII, variante alélica o de especie del mismo o fragmentos activos del mismo. Al menos una de las modificaciones en dichos polipéptidos está en una posición correspondiente a la posición Q286 en un polipéptido de FVII que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o en restos correspondientes en un polipéptido de FVII, siempre que la modificación en la posición Q286, sola o en combinación con cualquier otra modificación, no dé como resultado la introducción de un nuevo sitio de glucosilación en comparación con el polipéptido de FVII no modificado. La modificación es Q286R. La o las otras modificaciones pueden seleccionarse de entre D196K, D196R, D196A, D196Y, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K199A, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, R290M, R290V, K341E, K341R, K341Q, K341N, K341M, K341D, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS,

G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA, K197I198insS, T239S, T239N, T239Q, T239V, T239L, T239H, T239I, L287T, P321K, P321E, P321Y, P321S, Q366D, Q366E, Q366N, Q366T, Q366S, Q366V, Q366I, Q366L, Q366M, H373D, H373E, H373S, H373F, H373A, K161S, K161A, K161V, H216S, H216A, H216K, H216R, S222A, S222K, S222V, S222N, S222E, S222D, H257A, H257S, Intercambio de Gla FIX, {Intercambio de Gla FIX/E40L}, {Intercambio de Gla FIX/K43I}, {Intercambio de Gla FIX/Q44S}, {Intercambio de Gla FLX/M19K}, {Intercambio de Gla FIX/M19K/E40L/K43I/Q44S}, Intercambio de Gla FX, Intercambio de Gla Prot C, Intercambio de Gla Prot S, Intercambio de Gla Trombina, S52A, S60A, E394N, P395A, R396S, R202S, A292N, A294S, G318N, A175S, K109N, A122N, G124S, A51N, T130N, E132S, S52N, P54S, S119N, L121S, T128N, P129A, Q66N, Y68S, S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE, H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE, T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE, S103S111delinsDICLPRWGCLWED, H115S126delinsDICLPRWGCLWED, T128P134delinsDICLPRWGCLWED, P406insIEDICLPRWGCLW, P406insGGGSIEDICLPRWGCLW, P406insDICLPRWGCLWED, P406insGGSDICLPRWGCLWED, S103S111delinsSFGRGDIRNV, H115S126delinsSFGRGDIRNV, T127P134delinsSFGRGDIRNV, P406insCSFGRGDIRNVC, P406insGGGSCSFGRGDIRNVC, V158T, V158D, L287T E296V, M298K y M298Q.

En algunos ejemplos descritos en el presente documento, los polipéptidos de FVII modificados contienen una modificación en una posición correspondiente P54, Q66, L121, A122, P129 o E132 en un polipéptido de FVII que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o en restos correspondientes en un polipéptido de FVII. Las modificaciones ejemplares incluyen P54S, Q66N, L121S, A122N, P129A y E132S. En algunos ejemplos, los polipéptidos de FVII modificados que contienen una modificación en una posición correspondiente P54, Q66, L121, A122, P129 o E132 también contienen una o más modificaciones adicionales, incluyendo reemplazos, inserciones o deleciones de aminoácidos en otra posición en el polipéptido de FVII. Dichas modificaciones incluyen P54S, S52N, Y58S, S119N, G124S, T128N, T130N, V158D, A175S, S222A, G241S, E296V, M298Q, E394N, P395A, R396S, G318N y Q366V. Por lo tanto, son ejemplos de las modificaciones de combinación en un polipéptido de FVII descrito en el presente documento S119N/L121S, T128N/P129A, A122N/G124S, A122N/G124S/A175S, A122N/G124S/E394N/P395A/R396S, A122N/G124S/E394N/P395A/R396S, S52N/P54S/A122N/G124S/E394N/P395A/R396S, S52N/P54S, S119N/L121S/A175S, T128N/P129A/A175S, T130N/E132S, Q66N/Y68S, T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q, T128N/P129A/S222A, T128N/P129A/A175S/Q366V, A122N/G124S/A175S/Q366V, T128N/P129A/A175S/S222A, A122N/G124S/A175S/S222A, T128N/P129A/M298Q y T128N/P129A/M298Q/H373F.

También se describen en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen una modificación correspondiente a T239S, T239Q, T239V, T239L, T239H, T239I, P321K, P321E, P321Y, P321S, Q366D, Q366N, Q366V, Q366I, Q366L, Q366M, H373D, H373E, H373S, H373F, H373A, K161S, K161V, H216S, H216K, H216R, S222A, S222K, S222V, S222D, S222N, S222E o H257S en un polipéptido de FVII que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o en restos correspondientes en un polipéptido de FVII. Además, dichos polipéptidos de FVII modificados también pueden contener una o más modificaciones adicionales en otra posición, tal como la posición de aminoácido A51, S52, P54, S60, Q66, Y68, K109, S119, A122, G124, T130, E132, V158, K161, A175, D196, K197, K199, R202, H216, S222, G237, T239, H257, Q286, L287, R290 A292, A294, E296, M298, L305, S314, G318, P321, K337, K341, Q366, H373, F374, E394, P395 y R396. Las modificaciones ejemplares en estas posiciones incluyen Q286N, Q286E, Q286D, Q286S, Q286T, Q286R, Q286K, Q286V, Q286M, Q286L, Q286Y, D196K, D196R, D196A, D196Y, D196F, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, R290M, R290V, K341E, K341R, K341Q, K341N, K341M, K341D, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA, K197I198insS, T239S, T239N, T239Q, T239V, T239L, T239H, T239I, L287T, P321K, P321E, P321Y, P321S, Q366D, Q366E, Q366N, Q366T, Q366S, Q366V, Q366I, Q366L, Q366M, H373D, H373E, H373S, H373F, H373A, K161S, K161A, K161V, H216S, H216A, H216K, H216R, S222A, S222K, S222V, S222N, S222E, S222D, H257A, H257S, Intercambio de Gla FIX, Intercambio de Gla FX, Intercambio de Gla Prot C, Intercambio de Gla Prot S, Intercambio de Gla Trombina, Intercambio de Gla FIX, {Intercambio de Gla FIX/E40L}, {Intercambio de Gla FIX/K43I}, {Intercambio de Gla FIX/Q44S}, {Intercambio de Gla FIX/M19K}, {Intercambio de Gla FIX/M19K/E40L/K43I/Q44S}, S52A, S60A, E394N, P395A, R396S, R202S, A292N, A294S, G318N, A175S, K109N, A122N, G124S, A51N, T130N, E132S, S52N, P54S, S119N, L121S, T128N, P129A, Q66N, Y68S, S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE, H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE, T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE, S103S111delinsDICLPRWGCLWED, H115S126delinsDICLPRWGCLWED, T128P134delinsDICLPRWGCLWED, P406insIEDICLPRWGCLW, P406insGGGSIEDICLPRWGCLW, P406insDICLPRWGCLWED, P406insGGSDICLPRWGCLWED, S103S111delinsSFGRGDIRNV, H115S126delinsSFGRGDIRNV, T127P134delinsSFGRGDIRNV, P406insCSFGRGDIRNVC, P406insGGGSCSFGRGDIRNVC, V158T, V158D, L287T, M298K y M298Q. Las modificaciones de combinación resultantes pueden incluir Q366D/H373E, Q366V/H373V, Q366V/H373L, Q366V/H373I, S222K/H257A, H216A/S222A, S222S/Intercambio de Gla FIX, S222A/H257A/Intercambio de Gla FIX, S222A/M298Q, S222A/H257A/M298Q, S222A/A292N/A294S/Q366V, A175S/S222A/Q366V, S222A/Q366V,

H257S/Q366V, S222A/H373A, M298Q/H373F, S52A/S60A/S222A, S222A/T239V, V158D/T239V/E296V/M298Q, S222A/T239I, V158D/E296V/M298Q/H373F, Intercambio de Gla FIX/Q366V, M298Q/Q366N/H373F, T239V/M298Q/H373F y T239I/M298Q/H373F.

5 Se describen en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen dos o más modificaciones en un polipéptido de FVII, variante alélicas y de especie del mismo o fragmentos activos del mismo, en el que las dos o más modificaciones de aminoácidos se seleccionan de entre modificaciones de aminoácidos correspondientes a H216A, H257A, E394N, P395A, R396S, K109N, A292N, A175S, H257A e Intercambio de Gla FIX. Por ejemplo, los polipéptidos de FVII modificados descritos en el presente documento incluyen los que tienen modificaciones seleccionadas de entre H216A/H257A, E394N/P395A/R396S y K109N/A175S. Además, también puede incluirse una modificación correspondiente a M298Q o A294S. Por lo tanto, también se describen en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen modificaciones seleccionadas de entre H216A/H257A, E394N/P395A/R396S y K109N/A175S. En algunos ejemplos, los polipéptidos de FVII modificados también contienen una modificación correspondiente a M298Q o A294S. Esto puede dar como resultado, por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado que contiene las modificaciones H257A/M298Q o K109N/A292N/A294S. También se describen polipéptidos de FVII modificados que contienen modificaciones correspondientes a S52A/S60A/V158D/E296V/M298Q o V158D/T239I/E296V/M298.

20 En algunos ejemplos, los polipéptidos de FVII modificados descritos en el presente documento contienen una secuencia de unión a albúmina de suero, tal como una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 103-109, o una parte suficiente de la misma para efectuar unión a albúmina de suero. Dichos polipéptidos de FVII modificados pueden mostrar afinidad por o unión con albúmina de suero aumentada en comparación con el polipéptido de FVII no modificado. Por ejemplo, los polipéptidos de FVII modificados que contienen una secuencia de unión a albúmina de suero pueden mostrar al menos aproximadamente o 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más afinidad por o unión con albúmina de suero aumentada. La secuencia de unión a albúmina de suero puede reemplazar una secuencia contigua de restos de aminoácidos del polipéptido de FVII no modificado. Los polipéptidos de FVII modificados que contienen una secuencia de unión a albúmina de suero pueden contener una modificación seleccionada de entre S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, S1035111delinsIEDICLPRWGCLWE, H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE, T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE, S103S111delinsDICLPRWGCLWED, H115S126delinsDICLPRWGCLWED, T128P134delinsDICLPRWGCLWED, P406insIEDICLPRWGCLW, P406insGGGSIEDICLPRWGCLW, P406insDICLPRWGCLWED y P406insGGGSDICLPRWGCLWED.

35 También se describen en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen una secuencia de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Dichos polipéptidos de FVII modificados pueden mostrar afinidad por unión con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  aumentada en comparación con el polipéptido de FVII no modificado. Por ejemplo, los polipéptidos de FVII modificados que contienen una secuencia de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  pueden mostrar al menos aproximadamente o 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más afinidad por o unión con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  aumentada en comparación con el polipéptido de FVII no modificado. Los ejemplos de secuencias de unión a albúmina de suero incluyen las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de SEQ ID NO: 110-112, o una parte suficiente de las mismas para efectuar unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , lo que puede reemplazar una secuencia contigua de restos de aminoácidos del polipéptido de FVII no modificado. Los polipéptidos de FVII modificados contienen una modificación seleccionada de entre S103S111delinsSFGRGDIRNV, H115S126delinsSFGRGDIRNV, T127P134delinsSFGRGDIRNV, P406insCSFGRGDIRNVC y P406insGGGSCSFGRGDIRNVC.

50 Los polipéptidos de FVII modificados que contienen una albúmina de suero o secuencia de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  también pueden contener una o más modificaciones adicionales en otra posición en el polipéptido de FVII, tal como reemplazo de aminoácidos en una posición correspondiente a una posición G237V. También se describen por lo tanto en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen una modificación seleccionada de entre S1035111delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V, S103S111delinsDICLPRWGCLWED/G237V, H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V, H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V, H115S126delinsDICLPRWGCLWED/G237V, T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V, T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V, S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V y T128P134delinsDICLPRWGCLWED/G237V.

60 Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden contener 2, 3, 4, 5, 6 o 7 modificaciones. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden contener un dominio Gla heterólogo, o una parte suficiente del mismo para efectuar unión a fosfolípidos. Dichos polipéptidos pueden mostrar afinidad aumentada por o unión con fosfolípidos en comparación con el polipéptido de FVII no modificado, tal como al menos aproximadamente o 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más afinidad por o unión con fosfolípidos en comparación con el polipéptido de FVII no modificado.

- 300 %, 400 %, 500 % o más afinidad aumentada por o unión con fosfolípidos. El dominio Gla heterólogo puede seleccionarse de entre un dominio Gla en el Factor IX (FIX), Factor X (FX), protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína Gla de matriz, proteína 6 específica de detención del crecimiento (Gas6) y proteína Z y, en algunos ejemplos, puede tener una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 83-91, 93 y 94, o una parte suficiente de la misma para efectuar unión a fosfolípidos. Todo o una parte contigua del dominio Gla de FVII nativo, que puede incluir los aminoácidos 1-45 en un polipéptido de FVII que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, o en restos correspondientes en un polipéptido de FVII, puede retirarse o reemplazarse con el dominio Gla heterólogo, o una parte suficiente del mismo para efectuar unión a fosfolípidos.
- 10 Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden mostrar resistencia aumentada a antitrombina III en comparación con el polipéptido de FVII no modificado. Dicho polipéptido de FVII modificado puede mostrar al menos o aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más resistencia a antitrombina III en comparación con el polipéptido de FVII no modificado.
- 15 Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento también pueden mostrar actividad catalítica o coagulante aumentada en comparación con el polipéptido de FVII no modificado, tal como un aumento de al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. Además, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden mostrar resistencia aumentada a IRFT en comparación con el polipéptido de FVII no modificado. Dichos polipéptidos de FVII modificados pueden ser de al menos o aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más resistentes a IRFT en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento también pueden mostrar resistencia aumentada a los efectos inhibidores de Zn<sup>2+</sup> en comparación con el polipéptido de FVII no modificado. Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado puede ser al menos o aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más resistente a los efectos inhibidores de Zn<sup>2+</sup> en comparación con un polipéptido de FVII no modificado.

En algunos ejemplos, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento contienen una o más modificaciones que introducen y/o eliminan uno o más sitios de glucosilación en comparación con el polipéptido de FVII no modificado. Por ejemplo, pueden introducirse o eliminarse 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más sitios de glucosilación. Los sitios de glucosilación que pueden introducirse o eliminarse incluyen sitios de N-glucosilación y sitios de O-glucosilación. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden contener una o más modificaciones de aminoácidos adicionales que aumentan la resistencia a antitrombina III, aumentan la unión y/o afinidad para fosfolípidos, aumentan la afinidad por el factor tisular, aumentan la actividad intrínseca, aumentan la actividad dependiente de FT, aumentan la actividad coagulante, alteran la conformación del polipéptido para alterar la zimogenidad, aumentan la actividad catalítica o coagulante desplazando el equilibrio entre conformaciones de FVIIa altamente activas y menos activas en favor de las conformaciones altamente activas, aumentan la resistencia a proteasas, reducen la glucosilación, aumentan la glucosilación, reducen la inmunogenicidad, aumentan la estabilidad y/o facilitan el enlace de grupos químicos. En algunos ejemplos, la zimogenidad alterada confiere una forma más de tipo zimógeno o una forma menos de tipo zimógeno.

En algunos ejemplos, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento contienen una o más modificaciones de aminoácidos adicionales seleccionadas de entre S279C/V302C, L280C/N301C, V281C/V302C, S282C/V299C, inserción de una tirosina en la posición 4, F4S, F4T, P10Q, P10E, P10D, P10N, Q21N, R28F, R28E, I30C, I30D, I30E, K32D, K32Q, K32E, K32G, K32H, K32T, K32C, K32A, K32S, D33C, D33F, D33E, D33K, A34C, A34E, A34D, A34I, A34L, A34M, A34V, A34F, A34W, A34Y, R36D, R36E, T37C, T37D, T37E, K38C, K38E, K38T, K38D, K38L, K38G, K38A, K38S, K38N, K38H, L39E, L39Q, L39H, W41N, W41C, W41E, W41D, I42R, I42N, I42S, I42A, I42Q, I42N, I42S, I42A, I42Q, I42K, S43Q, S43N, Y44K, Y44C, Y44D, Y44E, S45C, S45D, S45E, D46C, A51N, S53N, G58N, G59S, G59T, K62E, K62R, K62D, K62N, K62Q, K62T, L65Q, L65S, L65N, F71D, F71Y, F71E, F71Q, F71N, P74S, P74A, A75E, A75D, E77A, E82Q, E82N, E82S, E82T T83K, N95S, N95T, G97S, G97T, Y101N, D104N, T106N, K109N, E116D, G117N, G124N, S126N, T128N, L141C, L141D, L141E, E142D, E142C, K143C, K143D, K143E, R144E, R144C, R144D, N145Y, N145G, N145F, N145M, N145S, N145I, N145L, N145T, N145V, N145P, N145K, N145H, N145Q, N145E, N145R, N145W, N145D, N145C, N157V, K157L, K157I, K157M, K157F, K157W, K157P, K157G, K157S, K157T, K157C, K157Y, K157N, K157E, K157R, K157H, K157D, K157Q, V158L, V158I, V158M, V158F, V158W, V158P, V158G, V158S, V158T, V158C, V158Y, V158N, V158E, V158R, V158K, V158H, V158D, V158Q, A175S, A175T, G179N, I186S, I186T, V188N, R202S, R202T, I205S, I205T, D212N, E220N, I230N, P231N, P236N, G237N, Q250C, V253N, E265N, T267N, E270N, A274M, A274L, A274K, A274R, A274D, A274V, A274I, A274F, A274W, A274P, A274G, A274T, A274C, A274Y, A274N, A274E, A274H, A274S, A274Q, F275H, R277N, F278S, F278A, F278N, F278Q, F278G, L280N, L288K, L288C, L288D, D289C, D289K, L288E, R290C, R290G, R290A, R290S, R290T, R290K, R290D, R290E, G291E, G291D, G291C, G291N, G291K, A292C, A292K, A292D, A292E, T293K, E296V, E296L, E296I, E296M, E296F, E296W, E296P, E296G, E296S, E296T, E296C, E296Y, E296N, E296K, E296R, E296H, E296D, E296Q, M298Q, M298V,

M298L, M298I, M298F, M298W, M298P, M298G, M298S, M298T, M298C, M298Y, M298N, M298K, M298R, M298H, M298E, M298D, P303S, P303T, R304Y, R304F, R304L, R304M, R304G, R304T, R304A, R304S, R304N, L305V, L305Y, L305I, L305F, L305A, L305M, L305W, L305P, L305G, L305S, L305T, L305C, L305N, L305E, L305K, L305R, L305H, L305D, L305Q, M306D, M306N, D309S, D309T, Q312N, Q313K, Q313D, Q313E, S314A, S314V, S314I, S314M, S314F, S314W, S314P, S314G, S314L, S314T, S314C, S314Y, S314N, S314E, S314K, S314R, S314H, S314D, S314Q, R315K, R315G, R315A, R315S, R315T, R315Q, R315C, R315D, R315E, K316D, K316C, K316E, V317C, V317K, V317D, V317E, G318N, N322Y, N322G, N322F, N322M, N322S, N322I, N322L, N322T, N322V, N322P, N322K, N322H, N322Q, N322E, N322R, N322W, N322C, G331N, Y332S, Y332A, Y332N, Y332Q, Y332G, D334G, D334E, D334A, D334V, D334I, D334M, D334F, D334W, D334P, D334L, D334T, D334C, D334Y, D334N, D334K, D334R, D334H, D334S, D334Q, S336G, S336E, S336A, S336V, S336I, S336M, S336F, S336W, S336P, S336L, S336T, S336C, S336Y, S336N, S336K, S336R, S336H, S336D, S336Q, K337L, K337V, K337I, K337M, K337F, K337W, K337P, K337G, K337S, K337T, K337C, K337Y, K337N, K337E, K337R, K337H, K337D, K337Q, K341E, K341Q, K341G, K341T, K341A, K341S, G342N, H348N, R353N, Y357N, I361N, F374P, F374A, F374V, F374I, F374L, F374M, F374W, F374G, F374S, F374T, F374C, F374E, F374N, F374K, F374R, F374H, F374D, F374Q, V376N, R379N, L390C, L390K, L390D, L390E, M391D, M391C, M391K, M391N, M391E, R392C, R392D, R392E, S393D, S393C, S393K, S393E, E394K, P395K, E394C, P395D, P395C, P395E, R396K, R396C, R396D, R396E, P397D, P397K, P397C, P397E, G398K, G398C, G398D, G398E, V399C, V399D, V399K, V399E, L400K, L401K, L401C, L401D, L401E, R402D, R402C, R402K, R402E, A403K, A403C, A403D, A403E, P404E, P404D, P404C, P404K, F405K, P406C, K32N/A34S, K32N/A34T, F31N/D33S, F31N/D33T, I30N/K32S, I30N/K32T, A34N/R36S, A34N/R36T, K38N/F40S, K38N/F40T, T37N/L39S, T37N/L39T, R36N/K38S, R36N/K38T, L39N/W41S, L39N/W41T, F40N/I42S, F40N/I42T, I42N/Y44S, I42N/Y44T, Y44N/D46S, Y44N/D46T, D46N/D48S, D46N/D48T, G47N/Q49S, G47N/Q49T, K143N/N145S, K143N/N145T, E142N/R144S, E142N/R144T, L141N/K143S, L141N/K143T, I140N/E142S, I140N/E142T, R144N/A146S, R144N/A146T, A146N/K148S, A146N/K148T, S147N/P149S, S147N/P149T, R290N/A292S, R290N/A292T, D289N/G291S, D289N/G291T, L288N/R290S, L288N/R290T, L287N/D289S, L287N/D289T, A292N/A294S, A292N/A294T, T293N/L295S, T293N/L295T, R315N/V317S, R315N/V317T, S314N/ K316S, S314N/ K316T, Q313N/ R315S, Q313N/ R315T, K316N/G318S, K316N/G318T, V317N/D319S, V317N/D319T, K341N/ D343S, K341N/ D343T, S339N/K341S, S339N/K341T, D343N/G345S, D343N/G345T, R392N/E394S, R392N/E394T, L390N/ R392S, L390N/ R392T, K389N/M391S, K389N/M391T, S393N/P395S, S393N/P395T, E394N/R396S, E394N/R396T, P395N/P397S, P395N/P397T, R396N/G398S, R396N/G398T, P397N/V399S, P397N/V399T, G398N/L400S, G398N/L400T, V399N/L401S, V399N/L401T, L400N/R402S, L400N/R402T, L401N/A403S, L401N/A403T, R402N/P404S, R402N/P404T, A403N/F405S, A403N/F405T, P404N/P406S y P404N/P406T. En algunos ejemplos, los polipéptidos de FVII modificados también contienen una sustitución de posiciones 300-322, 305-322, 300-312 o 305-312 con los aminoácidos correspondientes de tripsina, trombina y FX, o sustituciones de las posiciones 310-329, 311-322 o 233-329 con los aminoácidos correspondientes de tripsina.

Son ejemplos de polipéptidos de FVII modificados descritos en el presente documento los que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 113-273. En algunos ejemplos, las modificaciones se realizan en un polipéptido de FVII no modificado que es una variante alélica o de especie del polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3. La variante alélica o de especie u otra puede tener 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con el polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3, excluyendo la modificación o las modificaciones de aminoácidos. El polipéptido de FVII modificado descrito en el presente documento puede ser un polipéptido humano, un polipéptido no humano y/o un polipéptido maduro. En algunos ejemplos, solamente se modifica la secuencia primaria. En otros ejemplos, también se incluye una modificación química o una modificación postraduccional. Por ejemplo, el polipéptido de FVII modificado puede estar glucosilado, carboxilado, hidroxilado, sulfatado, fosforilado, albuminado o conjugado con un resto de polietilenglicol (PEG).

Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden ser polipéptidos monocatenarios, un polipéptido bicatenario y/o activos o activados. La activación puede efectuarse por escisión proteolítica por autoactivación, escisión por el Factor IX (FIXa), escisión por el Factor X (FXa), escisión por el Factor XII (FXIIa) o escisión por trombina.

Los polipéptidos de FVII modificados descritos en el presente documento pueden conservar una o más actividades del polipéptido de FVII no modificado. Por ejemplo, los polipéptidos de FVII modificados pueden contener modificaciones en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 60 posiciones de aminoácidos siempre que el polipéptido conserve al menos una actividad de FVII del polipéptido de FVII no modificado. Dichos polipéptidos de FVII modificados pueden conservar al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más de una actividad del polipéptido de FVII no modificado. En algunos ejemplos, se seleccionan una o más actividades de entre la unión a factor tisular (FT), activación de factor X (FX), activación de Factor IX (FIX), unión a fosfolípidos y actividad de coagulación. Además, las actividades que se conservan pueden aumentarse o reducirse en comparación con el polipéptido de FVII no modificado. En algunos ejemplos, la actividad de coagulación se aumenta en comparación con el polipéptido de FVII no modificado, tal como al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más de la actividad de coagulación del polipéptido de FVII no



modificado. Las actividades pueden medirse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

Se proporcionan en el presente documento moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento. También se proporcionan vectores que contienen dichas moléculas de ácido nucleico, incluyendo vectores procariotas, vectores virales o vectores eucariotas, tales como un vector de mamífero. Los vectores virales pueden seleccionarse de entre un adenovirus, un virus adenoasociado, un retrovirus, un virus del herpes, un lentivirus, un poxvirus y un citomegalovirus. Se proporcionan en el presente documento células que contienen estos vectores, incluyendo células eucariotas, tales como células de mamífero. Son ejemplos de células de mamífero células de riñón de cría de hámster (BHK-21) o células 293 o células CHO. En algunos ejemplos, las células expresan el polipéptido de FVII modificado. Por lo tanto, también se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que se producen por estas células.

Se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que contienen una concentración o cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier polipéptido de FVII modificado de acuerdo con las presentes reivindicaciones, molécula de ácido nucleico, vector o célula proporcionada en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica se formula para administración local, sistémica o tópica, tal como administración oral, nasal, pulmonar, bucal, transdérmica, subcutánea, intraduodenal, entérica, parenteral, intravenosa o intramuscular. Las composiciones farmacéuticas también pueden formularse para administración de liberación controlada y/o dosificación individual.

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados de acuerdo con las presentes reivindicaciones para su uso en métodos para tratar a un sujeto administrando una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento, en los que el sujeto tiene una enfermedad o afección que se trata por la administración de FVII o un procoagulante, tal como por la administración de FVII activo (FVIIa). En algunos ejemplos, el tratamiento con la composición farmacéutica alivia o mejora los síntomas asociados con la enfermedad o afección. En ejemplos adicionales, los métodos descritos en el presente documento también incluyen controlar al sujeto con respecto a cambios en los síntomas asociados con enfermedad o afección que se trata por la administración de FVII o un procoagulante. La enfermedad o afección para tratar usando los métodos proporcionados en el presente documento puede seleccionarse de entre trastornos de la coagulación sanguínea, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilia, (tal como hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C, hemofilia congénita o adquirida), deficiencia del factor VII y trastornos de sangrado, incluyendo complicación de sangrado debido a cirugía (tal como cirugía cardíaca, angioplastia, cirugía pulmonar, cirugía abdominal, cirugía espinal, cirugía cerebral, cirugía vascular, cirugía dental o cirugía de trasplante de órganos) o traumatismo. En algunos ejemplos, el sangrado se manifiesta como hemartrosis aguda, artropatía hemofílica crónica, hematomas, hematuria, sangrados del sistema nervioso central, sangrados gastrointestinales o hemorragia cerebral. En ejemplos adicionales, el sangrado se debe a extracción dental. La cirugía de trasplante puede seleccionarse de entre trasplante de médula ósea, corazón, pulmón, páncreas e hígado.

En algunos ejemplos, el método descrito en el presente documento puede usarse para tratar a un sujeto que tiene autoanticuerpos para el factor VIII o factor IX. Los métodos descritos en el presente documento también pueden incluir administrar uno o más factores de coagulación adicionales, tales como factores de coagulación recombinantes o purificados de plasma, procoagulantes, tales como vitamina K, derivado de vitamina K e inhibidores de proteína C, plasma, plaquetas, glóbulos rojos y corticosteroides, o tratamientos.

También se describen en el presente documento artículos de fabricación que contienen material de envasado y una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento contenida dentro del material de envasado. En algunos ejemplos, el polipéptido de FVII modificado en la composición farmacéutica es eficaz para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno mediado por FVII, y el material envasado incluye un marcador que indica que el polipéptido de FVII modificado se usa para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno mediado por FVII. También se describen en el presente documento kits, que comprenden una composición farmacéutica descrita en el presente documento, un dispositivo para administración de la composición y, opcionalmente, instrucciones para su administración.

## Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** representa la cascada de coagulación. La figura muestra la ruta intrínseca y la ruta extrínseca de coagulación para la producción independiente de FXa y convergencia de las rutas a una ruta común para generar trombina y fibrina para la formación de un coágulo. Estas rutas están interconectadas. La figura representa el orden de las moléculas implicadas en la cascada de activación en la que un zimógeno se convierte en una proteasa activada por escisión de uno o más enlaces peptídicos. La proteasa activada actúa después como la proteasa de activación para la siguiente molécula de zimógeno en la cascada, dando como resultado en última instancia formación de coágulos.

La **Figura 2** representa el modelo de coagulación basado en células (véase, por ejemplo, Hoffman *et al.* (2001) *Thromb Haemost* 85: 958-965). La figura representa los acontecimientos de coagulación como separados en tres fases, en las que el inicio de coagulación se efectúa por la activación de FX a FXa por el complejo de FT/FVIIa

en la célula portadora de FT, dando como resultado la generación de una cantidad pequeña de trombina después de la activación por FXa/FVa. La amplificación tiene lugar cuando la trombina se une con y activa las plaquetas, e inicia la activación de suficientes cantidades de los factores de coagulación apropiados para formar los complejos de FVIIIa/FIXa y FVa/FXa. Se produce propagación de la coagulación en la superficie de grandes cantidades de plaquetas activadas en el sitio de lesión, dando como resultado un estallido de generación de trombina que es suficientemente grande para generar suficiente fibrina a partir de fibrinógeno para establecer un coágulo en el sitio de lesión.

La **Figura 3** representa los mecanismos por los que FVIIa puede iniciar la formación de trombina. La figura ilustra la ruta dependiente de FT de generación de trombina por FVIIa, que actúa en la superficie de una célula portadora de FT e implica formación de complejo de FVIIa con FT antes de la activación de FX a FXa. La figura también representa la ruta independiente de FT de la generación de trombina por FVIIa, durante la que FVIIa se une con fosfolípidos en la plaqueta activada y activa FX a FXa, que a su vez forma complejos con FVa para escindir la protrombina a trombina.

## 15 Descripción detallada

### Esquema

#### 20 A. Definiciones

#### B. Visión de conjunto de Hemostasia

##### 1. Adhesión y agregación de plaquetas

##### 2. Cascada de coagulación

###### 25 a. Inicio

###### b. Amplificación

###### c. Propagación

##### 3. Regulación de la Coagulación

#### 30 C. Factor VII (FVII)

##### 1. Estructura y organización de FVII

##### 2. Modificaciones Postraduccionales

##### 3. Procesamiento de FVII

##### 4. Activación de FVII

##### 5. Función de FVII

###### 40 a. Actividad de FVIIa dependiente de factor tisular

###### b. Actividad de FVIIa independiente de factor tisular

##### 6. FVII como un producto biofarmacéutico

#### 45 D. Polipéptidos de FVII modificados

##### 1. Actividad catalítica aumentada

###### a. Modificaciones ejemplares para aumentar la actividad catalítica

###### 50 i. Sustituciones de aminoácidos básicos en la posición 286

###### ii. Otras mutaciones en la posición 286

##### 2. Resistencia aumentada a AT-III

###### Modificaciones ejemplares para efectuar resistencia aumentada a AT-III

##### 3. Resistencia aumentada a la inhibición por Zn<sup>2+</sup>

###### Modificaciones ejemplares para aumentar la resistencia a la inhibición por Zn<sup>2+</sup>

##### 4. Glucosilación alterada

###### Modificaciones ejemplares para alterar la glucosilación

##### 5. Unión aumentada a albúmina de suero y/o integrina de plaqueta $\alpha_{IIb}\beta_3$

###### 60 a. Polipéptidos de FVII ejemplares con secuencias de unión a albúmina de suero

###### b. Polipéptidos de FVII ejemplares con secuencias de unión a integrina de plaqueta $\alpha_{IIb}\beta_3$

##### 6. Modificación por introducción de un dominio Gla heterólogo

##### 7. Combinaciones y modificaciones adicionales

###### a. Modificaciones que aumentan la resistencia a IRFT

- b. Modificaciones que aumentan la actividad intrínseca
  - c. Modificaciones que aumentan la resistencia a proteasas
  - d. Modificaciones que aumentan la afinidad para fosfolípidos
  - e. Modificaciones que alteran la glucosilación
  - f. Modificaciones que facilitan el enlace de grupos químicos
  - g. Mutaciones de combinación ejemplares
- 5
- E. Producción de polipéptidos de FVII**
- 10
- 1. Vectores y células
  - 2. Sistemas de expresión
- a. Expresión procariota
  - b. Levadura
  - 15 c. Insectos y células de insectos
  - d. Células de mamífero
  - e. Plantas
- 20
- 2. Purificación
  - 3. Proteínas de fusión
  - 4. Modificaciones de polipéptidos
  - 5. Secuencias de nucleótidos
- F. Evaluación de las actividades de polipéptidos de FVII modificados**
- 25
- 1. Ensayos *in vitro*
- a. Modificación postraduccional
  - b. Actividad proteolítica
  - 30 c. Actividad de coagulación
  - d. Unión con y/o inhibición por otras proteínas
  - e. Unión con fosfolípidos
- 35
- 2. Modelos animales no humanos
  - 3. Ensayos clínicos
- G. Formulación y administración**
- 40
- 1. Formulaciones
- a. Dosificaciones
  - b. Formas de dosificación
- 45
- 2. Administración de polipéptidos de FVII modificados
  - 3. Administración de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de FVII modificados (terapia génica)
- H. Usos Terapéuticos**
- 50
- 1. Trastornos de sangrado congénitos
- a. Hemofilia
  - b. Deficiencia en FVII
  - 55 c. Otros
- 60
- 2. Trastornos de sangrado adquiridos
- a. Trombocitopenia adquirida por quimioterapia
  - b. Otras coagulopatías
  - c. Sangrado adquirido por trasplante
  - d. Sangrado inducido por terapia anticoagulante
  - e. Hemofilia adquirida
- 65
- 3. Traumatismo y sangrado quirúrgico
- I. Terapias de Combinación**

**J. Artículos de fabricación y kits**  
**K. Ejemplos**

**A. Definiciones**

5

A no ser que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención o las invenciones. En caso de que haya una pluralidad de definiciones para términos del presente documento, prevalecerán los de la presente sección. Cuando se haga referencia a una URL u otro identificador u otra dirección tal, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar y la información particular en Internet puede aparecer y desaparecer, pero puede encontrarse información equivalente buscando en Internet. La referencia a la misma demuestra la disponibilidad y difusión pública de dicha información.

10

15

Como se usa en el presente documento, la ruta de coagulación o cascada de coagulación se refiere a la serie de acontecimientos de activación que conduce a la formación de un coágulo de fibrina insoluble. En la cascada o la ruta de coagulación, una proteína inactiva de una serina proteasa (también denominada un zimógeno) se convierte en una proteasa activa por escisión de uno o más enlaces peptídicos, que actúan después como la proteasa activadora para la siguiente molécula de zimógeno en la cascada. En la etapa proteolítica final de la cascada, el fibrinógeno se escinde de forma proteolítica por trombina a fibrina, que después se reticula en el sitio de lesión para formar un coágulo.

20

25

Como se usa en el presente documento, "hemostasia" se refiere a la detención del sangrado o flujo sanguíneo en un órgano o parte del cuerpo. El término hemostasia puede abarcar el proceso completo de coagulación sanguínea para evitar pérdida de sangre después de lesión de los vasos sanguíneos hasta la disolución posterior del coágulo sanguíneo después de reparación tisular.

30

Como se usa en el presente documento, "coagulación" se refiere a la formación de un coágulo de fibrina insoluble, o al proceso por el que los factores de coagulación de la sangre interactúan en la cascada de coagulación, dando como resultado en última instancia la formación de un coágulo de fibrina insoluble.

35

Como se usa en el presente documento, una "proteasa" es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos covalentes. Estas designaciones incluyen formas de zimógenos y formas activadas monocatenarias, bicatenarias y multicatenarias de las mismas. Para mayor claridad, la referencia a proteasas se refiere a todas las formas. Las proteasas incluyen, por ejemplo, serina proteasas, cisteína proteasas, proteasas aspárticas, treonina y metaloproteasas dependiendo de la actividad catalítica de su sitio activo y el mecanismo de escisión de enlaces peptídicos de un sustrato diana.

40

45

Como se usa en el presente documento, las serina proteasas o serina endopeptidasas se refieren a una clase de peptidasas que se caracterizan por la presencia de un resto de serina en el sitio activo de la enzima. Las serina proteasas participan en una amplia serie de funciones en el cuerpo, incluyendo coagulación sanguínea e inflamación, así como actuar como enzimas digestivas en procariotas y eucariotas. El mecanismo de escisión por serina proteasa se basa en el ataque nucleófilo de un enlace peptídico diana por una serina. La cisteína, treonina o moléculas de agua asociadas con aspartato o metales también pueden desempeñar este papel. Las cadenas laterales alineadas de serina, histidina y aspartato forman una tríada catalítica habitual para la mayoría de serina proteasas. El sitio activo de serina proteasas se moldea como una hendidura en la que se une el sustrato polipeptídico.

50

55

60

Como se usa en el presente documento, Factor VII (FVII, F7; también denominado Factor 7, factor de coagulación VII, factor de suero VII, acelerador de la conversión de protrombina en suero, SPCA, proconvertina y eptacog alfa) se refiere a una serina proteasa que es parte de la cascada de coagulación. FVII incluye un dominio Gla, dos dominios EGF (EGF-1 y EGF-2), y un dominio de serina proteasa (o dominio de peptidasa S1) que está altamente conservado entre todos los miembros de la familia de peptidasa S1 de serina proteasas, tal como por ejemplo con quimotripsina. La secuencia de un precursor ejemplar FVII que tiene un péptido señal y propéptido se expone en SEQ ID NO: 1. Se expone un polipéptido de FVII maduro ejemplar en SEQ ID NO: 3. FVII aparece como un zimógeno monocatenario, un polipéptido bicatenario de tipo zimógeno y una forma bicatenaria completamente activada. Se produce activación completa, que sucede tras el cambio conformacional de una forma de tipo zimógeno, tras la unión con su cofactor factor tisular. Además, pueden introducirse mutaciones que den como resultado el cambio conformacional en ausencia de factor tisular. Por lo tanto, la referencia a FVII incluye formas monocatenarias y bicatenarias del mismo, incluyendo formas de tipo zimógeno y bicatenarias completamente activadas.

65

La referencia al polipéptido de FVII también incluye polipéptidos precursores y polipéptidos de FVII maduros en formas monocatenarias o bicatenarias, formas truncadas de los mismos que tienen actividad e incluyen variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de corte y empalme y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 1 o la forma madura

del mismo. Se incluyen polipéptidos de FVII modificados, tales como los de SEQ ID NO: 113 y 273 y variantes de los mismos. También se incluyen los que conservan al menos una actividad de un FVII, tal como unión a FT, unión a factor X, unión a fosfolípido y/o actividad coagulante de un FVII. Conservando la actividad, la actividad puede alterarse, tal como reducirse o aumentarse, en comparación con un FVII de tipo silvestre siempre que el nivel de actividad conservado sea suficiente para producir un efecto detectable. Los polipéptidos de FVII incluyen, pero sin limitación, isoformas específicas de tejido y variantes alélicas de las mismas, moléculas sintéticas preparadas por traducción de ácidos nucleicos, proteínas generadas por síntesis química, tal como síntesis que incluyen ligamiento de polipéptidos más cortos, mediante métodos recombinantes, proteínas aisladas de tejido y células humanos y no humanos, polipéptidos de FVII quiméricos y formas modificadas de los mismos. Los polipéptidos de FVII también incluyen fragmentos o partes de FVII que son de suficiente longitud o incluyen regiones apropiadas para conservar al menos una actividad (tras la activación si es necesario) de un polipéptido maduro de longitud completa. Los polipéptidos de FVII también incluyen los que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y los que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, pegilación, albuminación, glucosilación, farnisilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica.

Son polipéptidos de FVII ejemplares los de origen de mamífero, incluyendo humano. Se exponen secuencias de aminoácidos ejemplares de FVII de origen humano en SEQ ID NO: 1, 2 y 3. Las variantes ejemplares de dicho polipéptido de FVII humano incluyen cualquiera de los polipéptidos precursores expuestos en SEQ ID NO: 18-74. Los polipéptidos de FVII también incluyen cualquiera de los polipéptidos de origen no humano incluyendo, pero sin limitación, polipéptidos de factor VII murinos, caninos, felinos, leporinos, aviares, bovinos, ovinos, porcinos, equinos, ictícolas, anfibios y de otros primates. Los polipéptidos de FVII ejemplares de origen no humano incluyen, por ejemplo, vaca (*Bos taurus*, SEQ ID NO: 4), ratón (*Mus musculus*, SEQ ID NO: 5), chimpancé pigmeo (*Pan paniscus*, SEQ ID NO: 6), chimpancé (*Pan troglodytes*, SEQ ID NO: 7), conejo (*Oryctolagus cuniculus*, SEQ ID NO: 8), rata (*Rattus norvegicus*, SEQ ID NO: 9), macaco rhesus (*Macaca mulatta*, SEQ ID NO: 10), cerdo (*Sus scrofa*, SEQ ID NO: 11), perro (*Canis familiaris*, SEQ ID NO: 12), pez cebra (*Brachydanio rerio*, SEQ ID NO: 13), pez globo Japonés (*Fugu rubripes*, SEQ ID NO: 14), pollo (*Gallus gallus*, SEQ ID NO: 15), orangután (*Pongo pygmaeus*, SEQ ID NO: 16) y gorila (*Gorilla gorilla*, SEQ ID NO: 17).

Un experto en la materia reconoce que las posiciones referidas del polipéptido del factor VII maduro (SEQ ID NO: 3) difieren en 60 restos de aminoácidos en comparación con la isoforma de un polipéptido de FVII precursor expuesto en SEQ ID NO: 1, que es la isoforma de un polipéptido de factor VII que contienen el péptido señal y secuencias propeptídicas. Por lo tanto, el primer resto de aminoácido de SEQ ID NO: 3 "corresponde a" el sexagésimo primer (61º) resto de aminoácido de SEQ ID NO: 1. Un experto en la materia también reconoce que las posiciones referidas del polipéptido del factor VII maduro (SEQ ID NO: 3) difieren en 38 restos de aminoácidos en comparación con el polipéptido de FVII precursor expuesto en SEQ ID NO: 2, que es el polipéptido del factor VII de isoforma b que contiene las secuencias del péptido y propéptido señal. Por lo tanto, el primer resto de aminoácido de SEQ ID NO: 3 "corresponde a" el trigésimo noveno (39º) resto de aminoácido de SEQ ID NO: 2.

Como se usa en el presente documento, los restos correspondientes se refieren a restos que aparecen en loci alineados. Los polipéptidos relacionados o variantes se alinean por cualquier método conocido por los expertos en la materia. Dichos métodos típicamente maximizan las coincidencias, e incluyen métodos tales como el uso de alineamientos manuales y el uso de los numerosos programas de alineamiento disponibles (por ejemplo, BLASTP) y otros conocidos por los expertos en la materia. Alineando las secuencias de polipéptidos, un experto en la materia puede identificar restos correspondientes, usando restos de aminoácidos conservados idénticos como guías. Por ejemplo, alineando las secuencias de polipéptidos de factor VII, un experto en la materia puede identificar restos correspondientes, usando restos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. Por ejemplo, la alanina en la posición de aminoácido 1 (A1) de SEQ ID NO: 3 (factor maduro VII) corresponde a la alanina en la posición de aminoácido 61 (A61) de SEQ ID NO: 1, y la alanina en la posición de aminoácido 39 (A39) de SEQ ID NO: 2. En otros casos, pueden identificarse regiones correspondientes. Por ejemplo, el dominio Gla corresponde a las posiciones de aminoácidos A1 a F45 de SEQ ID NO: 3, a las posiciones de aminoácidos A61 hasta S105 de SEQ ID NO: 1 y a las posiciones de aminoácidos A39 a S83 de SEQ ID NO: 2. Un experto en la materia también puede emplear restos de aminoácidos conservados como guías para encontrar restos de aminoácidos correspondientes entre y dentro de secuencias humanas y no humanas. Por ejemplo, los restos de aminoácidos S43 y E163 de SEQ ID NO: 3 (humana) corresponden a S83 y E203 de SEQ ID NO: 4 (bovina). Las posiciones correspondientes también pueden basarse en alineamientos estructurales, por ejemplo usando alineamientos simulados por ordenador de la estructura proteica. En otros casos, pueden identificarse regiones correspondientes.

Como se usa en el presente documento, una "prorregión", un "propéptido" o una "prosecuencia" se refieren a una región o un segmento que se escinde para producir una proteína madura. Esto puede incluir segmentos que actúan para suprimir la actividad proteolítica enmascarando la maquinaria catalítica y evitando por lo tanto la formación del intermedio catalítico (es decir, ocluyendo de forma estérica el sitio de unión a sustrato). Una prorregión es una secuencia de aminoácidos situada en el extremo amino terminal de un polipéptido biológicamente activo maduro y puede ser tan poco como algunos aminoácidos o puede ser una estructura multidominio.

Como se usa en el presente documento, "factor VII maduro" se refiere a un polipéptido de FVII que carece de una

secuencia señal y una secuencia propeptídica. Típicamente, una secuencia señal se dirige a una proteína para secreción a través de la ruta del retículo endoplásmico (RE)-golgi y se escinde después de la inserción en el RE durante la traducción. Una secuencia propeptídica típicamente actúa en modificación postraduccional de la proteína y se escinde antes de la secreción de la proteína de la célula. Por lo tanto, un polipéptido de FVII maduro es típicamente una proteína secretada. En un ejemplo, un polipéptido de FVII humano maduro se expone en SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 difiere de la de los polipéptidos precursores expuestos en SEQ ID NO: 1 y 2 en que SEQ ID NO: 3 carece de la secuencia señal, que corresponde a los restos de aminoácidos 1-20 de SEQ ID NO: 1 y 2; y también carece de la secuencia propeptídica, que corresponde a los restos de aminoácidos 21-60 de SEQ ID NO: 1 y los restos de aminoácidos 21-38 de SEQ ID NO: 2. La referencia a un polipéptido de FVII maduro abarca la forma de zimógeno monocatenaria y la forma bicatenaria.

Como se usa en el presente documento, “de tipo silvestre” o “nativo” con referencia a FVII se refiere a un polipéptido de FVII codificado por un gen de FVII de origen natural o nativo, incluyendo variantes alélicas, que está presente en un organismo, incluyendo un ser humano y otros animales, en la naturaleza. Se pretende que la referencia a factor VII de tipo silvestre sin referencia a una especie abarque cualquier especie de un factor VII de tipo silvestre. Se incluyen entre polipéptidos de FVII de tipo silvestre el polipéptido precursor codificado, fragmentos del mismo, y formas procesadas de los mismos, tales como una forma madura que carece del péptido señal así como cualquier forma procesada o modificada pre o postraduccionalmente del mismo. También se incluyen entre polipéptidos de FVII nativos los que se modifican postraduccionalmente, incluyendo, pero sin limitación, modificación por glucosilación, carboxilación e hidroxilación. Los polipéptidos de FVII nativos también incluyen formas monocatenarias y bicatenarias. Por ejemplo, los seres humanos expresan FVII nativo. La secuencia de aminoácidos de FVII humano de tipo silvestre ejemplar se expone en SEQ ID NO: 1, 2, 3 y variantes alélicas expuestas en SEQ ID NO: 44-100 y las formas maduras de las mismas. Otros animales producen FVII nativo, incluyendo, pero sin limitación, vaca (*Bos taurus*, SEQ ID NO: 4), ratón (*Mus musculus*, SEQ ID NO: 5), chimpancé pigmeo (*Pan paniscus*, SEQ ID NO: 6), chimpancé (*Pan troglodytes*, SEQ ID NO: 7), conejo (*Oryctolagus cuniculus*, SEQ ID NO: 8), rata (*Rattus norvegicus*, SEQ ID NO: 9), macaco rhesus (*Macaca mulatta*, SEQ ID NO: 10), cerdo (*Sus scrofa*, SEQ ID NO: 11), perro (*Canis familiaris*, SEQ ID NO: 12), pez cebra (*Brachydanio rerio*, SEQ ID NO: 13), pez globo Japonés (*Fugu rubripes*, SEQ ID NO: 14), pollo (*Gallus gallus*, SEQ ID NO: 15), orangután (*Pongo pygmaeus*, SEQ ID NO: 16) y gorila (*Gorilla gorilla*, SEQ ID NO: 17).

Como se usa en el presente documento, las variantes de especies se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamífero, tales como ratón y ser humano.

Como se usa en el presente documento, las variantes alélicas se refieren a variaciones en las proteínas entre miembros de la misma especie.

Como se usa en el presente documento, una variante de corte y empalme se refiere a una variante producida por procesamiento diferencial de un transcrito primario de ADN genómico que da como resultado más de un tipo de ARNm.

Como se usa en el presente documento, un zimógeno se refiere a una proteasa que se activa por escisión proteolítica, incluyendo escisión de maduración, tal como escisión de activación y/o formación de complejos con otra proteína u otras proteínas y/u otro cofactor u otros cofactores. Un zimógeno es un precursor inactivo de una enzima proteolítica. Dichos precursores son generalmente mayores, aunque no necesariamente mayores, que la forma activa. Con referencia a serina proteasas, se convierten zimógenos en enzimas activas por escisión específica, incluyendo escisión catalítica y autocatalítica, o mediante unión de un cofactor activador que genera una enzima activa. Por ejemplo, en general, los zimógenos están presentes en una forma monocatenaria. Los zimógenos, en general, están inactivos y pueden convertirse en polipéptidos activos maduros por escisión catalítica o autocatalítica en uno o más sitios proteolíticos para generar un polipéptido multicatenario, tal como uno bicatenario. Un zimógeno, por lo tanto, es una proteína enzimáticamente inactiva que se convierte en una enzima proteolítica mediante la acción de un activador. La escisión puede efectuarse por autoactivación. Varias proteínas de coagulación son zimógenos; están inactivas, pero se escinden y se activan tras el inicio del sistema de coagulación después del daño vascular. En referencia a FVII, los polipéptidos de FVII existen en el plasma sanguíneo como zimógenos hasta la escisión por proteasas, tales como por ejemplo, factor IX activado (FIXa), factor X activado (FXa), factor XII activado (FXIIa), trombina o por autoactivación para producir una forma bicatenaria de tipo zimógeno, que después requiere un cambio conformacional adicional para su actividad completa.

Como se usa en el presente documento, una proteína o un polipéptido “de tipo zimógeno” se refiere a una proteína que se ha activado por escisión proteolítica, pero aún muestra propiedades que están asociadas con un zimógeno, tales como, por ejemplo, actividad baja o ausente, o una conformación que se asemeja a la conformación de la forma de zimógeno de la proteína. Por ejemplo, cuando no está unida al factor tisular, la forma activada bicatenaria de FVII es una proteína de tipo zimógeno; conserva una conformación similar al zimógeno FVII no escindido, y, por lo tanto, muestra muy baja actividad. Tras la unión con el factor tisular, la forma activada bicatenaria de FVII experimenta un cambio conformacional y adquiere su actividad completa como un factor de coagulación.

Como se usa en el presente documento, una secuencia de activación se refiere a una secuencia de aminoácidos en

un zimógeno que era el sitio requerido para escisión de activación o escisión de maduración para formar una proteasa activa. La escisión de una secuencia de activación puede catalizarse de forma autocatalítica o por compañeros de activación.

5 Como se usa en el presente documento, la escisión de activación es un tipo de escisión de maduración que induce un cambio conformacional que se requiere para el desarrollo de la actividad enzimática completa. Esta es una ruta de activación clásica, por ejemplo, para serina proteasas en la que una escisión genera un nuevo extremo N terminal que interacciona con las regiones conservadas de la proteasa, tales como Asp194 en quimotripsina, para inducir cambios conformacionales requeridos para la actividad. La activación puede dar como resultado producción de  
10 formas multicatenarias de las proteasas. En algunos casos, formas monocatenarias de la proteasa pueden mostrar actividad proteolítica.

Como se usa en el presente documento, "Factor VII activado" o "FVIIa" se refiere a cualquier forma bicatenaria de un polipéptido de FVII. Una forma bicatenaria típicamente resulta de la escisión proteolítica, pero puede producirse de  
15 forma sintética. El Factor VII activado, por lo tanto, incluye la forma bicatenaria de tipo zimógeno con baja actividad coagulante, una forma completamente activada (aproximadamente 1000 veces más actividad) que aparece tras la unión con el factor tisular, y formas mutadas que existen en una forma bicatenaria completamente activada o experimentan cambio conformacional a una forma completamente activada. Por ejemplo, una forma monocatenaria del polipéptido de FVII (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 3) se escinde proteolíticamente entre los restos de  
20 aminoácidos R152 e I153 del polipéptido de FVII maduro. Los productos de escisión, cadena pesada de FVII y cadena ligera de FVII, que se mantienen juntos por un enlace disulfuro (entre los restos de aminoácidos C135 y C262 en el FVII de SEQ ID NO: 3), forman la enzima de FVII activada bicatenaria. Puede llevarse a cabo escisión proteolítica, por ejemplo, por factor IX activado (FIXa), factor X activado (FXa), factor XII activado (FXIIa), trombina o por autoactivación.

25 Como se usa en el presente documento, una "propiedad" de un polipéptido de FVII se refiere a una propiedad física o estructural, tal como estructura tridimensional, pl, semivida, conformación y otras características físicas tales.

Como se usa en el presente documento, una "actividad" de un polipéptido de FVII se refiere a cualquier actividad  
30 mostrada por un polipéptido de factor VII. Dichas actividades pueden ensayarse *in vitro* y/o *in vivo* e incluyen, pero sin limitación, coagulación o actividad coagulante, actividad procoagulante, actividad proteolítica o catalítica tal como para efectuar activación del factor X (FX) o activación del Factor IX (FIX); antigenicidad (capacidad para unirse con o competir con un polipéptido por la unión con un anticuerpo anti FVII); capacidad para unirse con el factor tisular, factor X o factor IX; y/o capacidad para unirse con fosfolípidos. La actividad puede evaluarse *in vitro* o *in vivo* usando  
35 ensayos reconocidos, por ejemplo, midiendo la coagulación *in vitro* o *in vivo*. Los resultados de dichos ensayos indican que un polipéptido muestra una actividad que puede correlacionarse con la actividad del polipéptido *in vivo*, en el que la actividad *in vivo* puede denominarse actividad biológica. Se conocen por los expertos en la materia ensayos para determinar la funcionalidad o actividad de formas modificadas de FVII. Los ensayos ejemplares para evaluar la actividad de un polipéptido de FVII incluyen ensayo de tiempo de protromboplastina (PT) o el ensayo de  
40 tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) para evaluar la actividad coagulante, o ensayos cromogénicos usando sustratos sintéticos, tales como los descritos en los ejemplos posteriores, para evaluar la actividad catalítica o proteolítica.

Como se usa en el presente documento, "muestra al menos una actividad" o "conserva al menos una actividad" se refieren a la actividad mostrada por un polipéptido de FVII modificado en comparación con un polipéptido de FVII no modificado de la misma forma y en las mismas condiciones. Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado en una forma bicatenaria se compara con un polipéptido de FVII no modificado en una forma bicatenaria, en las mismas condiciones experimentales, siendo la única diferencia entre los dos polipéptidos la modificación que se estudia. En otro ejemplo, un polipéptido de FVII modificado en una forma monocatenaria se compara con un polipéptido de FVII no modificado en una forma monocatenaria, en las mismas condiciones experimentales, siendo la única diferencia  
50 entre los dos polipéptidos la modificación que se estudia. Típicamente, un polipéptido de FVII modificado que conserva o muestra al menos una actividad de un polipéptido de FVII no modificado de la misma forma conserva una cantidad suficiente de la actividad de modo que, cuando se administra *in vivo*, el polipéptido de FVII modificado es terapéuticamente eficaz como un producto terapéutico procoagulante. En general, para que un polipéptido de FVII modificado conserve la eficacia terapéutica como un procoagulante, la cantidad de actividad que se conserva es exactamente o es aproximadamente 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más de la actividad de un polipéptido de FVII no modificado de la misma forma que presenta  
55 eficacia terapéutica como un procoagulante. La cantidad de actividad que se requiere para mantener la eficacia terapéutica como un procoagulante puede determinarse de forma empírica, si es necesario. Típicamente, una conservación del 0,5 % al 20 %, del 0,5 % al 10 %, del 0,5 % al 5 % de una actividad es suficiente para conservar la eficacia terapéutica como un procoagulante *in vivo*.

65 Se entiende que la actividad que se muestra o se conserva por un polipéptido de FVII modificado puede ser cualquiera actividad, incluyendo, pero sin limitación, coagulación o actividad coagulante, actividad procoagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como para efectuar activación del factor X (FX) o activación del Factor IX (FIX),

antigenicidad (capacidad para unirse con o competir con un polipéptido por la unión con un anticuerpo anti FVII); capacidad para unirse con el factor tisular, factor X o factor IX; y/o capacidad para unirse con fosfolípidos. En algunos casos, un polipéptido de FVII modificado puede conservar una actividad que aumenta en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. En algunos casos, un polipéptido de FVII modificado puede conservar una actividad que se traduce en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. La actividad de un polipéptido de FVII modificado puede ser cualquier nivel de porcentaje de actividad del polipéptido no modificado, donde ambos polipéptidos están en la misma forma, incluyendo pero sin limitación, 1 % de actividad, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más actividad en comparación con el polipéptido que no contiene la modificación en cuestión. Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado puede mostrar actividad aumentada o reducida en comparación con el polipéptido de FVII no modificado en la misma forma. Por ejemplo, puede conservar al menos aproximadamente o 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de la actividad del polipéptido de FVII no modificado. En otros ejemplos, el cambio de actividad es al menos aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, o más veces mayor que FVII no modificado. El nivel particular para conservar está en función del uso pretendido del polipéptido y puede determinarse de forma empírica. La actividad puede medirse, por ejemplo, usando ensayos *in vitro* o *in vivo* tales como los descritos en el presente documento o en los ejemplos posteriores.

Como se usa en el presente documento, "actividad de coagulación", "actividad coagulante" o "actividad procoagulante" se refieren a la capacidad de un polipéptido para efectuar coagulación. Los expertos en la materia conocen ensayos para evaluar la actividad coagulante, e incluyen ensayo de tiempo de protromboplastina (PT) o el ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT).

Como se usa en el presente documento, "actividad catalítica" o "actividad proteolítica" en referencia a FVII se refiere a la capacidad de una proteína FVII para catalizar la escisión proteolítica de un sustrato, y se usan indistintamente. Se conocen en la técnica ensayos para evaluar dichas actividades. Por ejemplo, la actividad proteolítica de FVII puede medirse usando sustratos cromogénicos tales como FVIIa Spectrozyme (CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>-D-CHA-But-Arg-pNA), en el que la escisión de un sustrato se controla por la absorbancia y la tasa de hidrólisis de sustrato determinada por regresión lineal.

Como se usa en el presente documento, "actividad intrínseca" con referencia a FVII se refiere a la actividad catalítica, proteolítica y/o coagulante de una proteína de FVII en ausencia de factor tisular.

Como se usa en el presente documento, el dominio (típicamente una secuencia de tres o más, generalmente 5 o 7 o más aminoácidos) se refiere a una parte de una molécula, tal como proteínas o los ácidos nucleicos codificantes, que es estructuralmente y/o funcionalmente distinta de otras partes de la molécula y es identificable. Por ejemplo, los dominios incluyen las partes de una cadena polipeptídica que pueden formar una estructura plegada de forma independiente dentro de una proteína compuesta de uno o más motivos estructurales y/o que se reconoce en virtud de una actividad funcional, tal como actividad proteolítica. Una proteína puede tener un, o más de un, dominios distintos. Por ejemplo, un dominio puede identificarse, definirse o distinguirse por la homología de la secuencia en el mismo con miembros de la familia relacionados, tal como homología con motivos que definen un dominio de proteasa o un dominio Gla. En otro ejemplo, un dominio puede distinguirse por su función, tal como por actividad proteolítica, o una capacidad para interactuar con una biomolécula, tal como unión a ADN, unión a ligando y dimerización. Un dominio de forma independiente puede mostrar una función o actividad biológica de modo que el dominio de forma independiente o fusionado con otra molécula pueda realizar una actividad, tal como, por ejemplo, actividad proteolítica o unión a ligando. Un dominio puede ser una secuencia lineal de aminoácidos o una secuencia no lineal de aminoácidos. Muchos polipéptidos contienen una pluralidad de dominios. Dichos dominios se conocen, y pueden identificarse por los expertos en la materia. Para ejemplificación en el presente documento, se proporcionan definiciones, pero se entiende que está dentro de la experiencia de la técnica reconocer dominios particulares por nombre. Si es necesario puede emplearse el software apropiado para identificar dominios.

Como se usa en el presente documento, un dominio de proteasa es la parte catalíticamente activa de una proteasa. La referencia a un dominio de proteasa de una proteasa incluye las formas monocatenaria, bicatenaria y multicatenaria de cualquiera de estas proteínas. Un dominio de proteasa de una proteína contiene todas las propiedades requeridas de esa proteína requeridas para su actividad proteolítica, tal como por ejemplo, el centro catalítico. En referencia a FVII, el dominio de proteasa comparte homología y característica estructural con los dominios de proteasa de la familia de quimotripsina/tripsina, incluyendo la tríada catalítica. Por ejemplo, en el polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3, el dominio de proteasa corresponde a las posiciones de aminoácidos 153 a 392.

Como se usa en el presente documento, un dominio de gamma-carboxiglutamato (Gla) se refiere a la parte de una proteína, por ejemplo una proteína dependiente de vitamina K, que contiene modificaciones postraduccionales de restos de glutamato, generalmente la mayoría, pero no todos, de los restos de glutamato, por carboxilación dependiente de vitamina K para formar Gla. El dominio Gla es responsable de la unión de alta afinidad de iones de



calcio y unión con fosfolípidos con carga negativa. Típicamente, el dominio Gla comienza en el extremo N terminal de la forma madura de las proteínas dependientes de vitamina K y termina con un resto aromático conservado. En un polipéptido de FVII maduro el dominio Gla corresponde a las posiciones de aminoácidos 1 a 45 del polipéptido ejemplar expuesto en SEQ ID NO: 3. Se conocen bien dominios Gla y su locus puede identificarse en polipéptidos particulares. Los dominios Gla de las diversas proteínas dependientes de vitamina K comparten secuencia, homología estructural y funcional, incluyendo el agrupamiento de restos hidrófobos N terminales en un parche hidrófobo que media en la interacción con fosfolípidos con carga negativa en la membrana de superficie celular. Otros polipéptidos que contienen Gla ejemplares incluyen, pero sin limitación, FIX, FX, protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína Gla de matriz, proteína específica de detención del crecimiento 6 (Gas6) y proteína Z. Los dominios Gla de estas y otras proteínas ejemplares se exponen en cualquiera de SEQ ID NO: 83-94.

Como se usa en el presente documento, "nativo" o "endógeno" en referencia a un dominio Gla se refiere al dominio Gla de origen natural asociado con todo o parte de un polipéptido que tiene un dominio Gla. Para fines del presente documento, un dominio Gla nativo es en referencia a un polipéptido de FVII. Por ejemplo, el dominio Gla nativo de FVII, expuesto en SEQ ID NO: 92, corresponde a los aminoácidos 1-45 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3.

Como se usa en el presente documento, un dominio Gla heterólogo se refiere al dominio Gla de un polipéptido, de la misma o diferentes especies, que no es un dominio Gla de FVII. Son ejemplos de dominios Gla heterólogos los dominios Gla de polipéptidos que contienen Gla incluyendo, pero sin limitación, FIX, FX, protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína Gla de matriz, proteína específica de detención del crecimiento 6 (Gas6) y proteína Z. Los dominios Gla de estas y otras proteínas ejemplares se exponen en cualquiera de SEQ ID NO: 83-91, 93 y 94.

Como se usa en el presente documento, una parte contigua de un dominio Gla se refiere a al menos dos o más aminoácidos adyacentes, típicamente 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40 o más hasta todos los aminoácidos que componen un dominio Gla.

Como se usa en el presente documento, "una parte suficiente de un dominio Gla para efectuar unión a fosfolípidos" incluye al menos un aminoácido, típicamente, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15 o más aminoácidos del dominio, pero menos de todos los aminoácidos que componen el dominio siempre que el polipéptido que contiene dicha parte muestre unión a fosfolípidos.

Como se usa en el presente documento, "reemplazar" con respecto a un dominio Gla o "intercambio de dominio Gla" se refiere al proceso por el que el dominio Gla endógeno de una proteína se reemplaza, usando métodos recombinantes, sintéticos u otros, con el dominio Gla de otra proteína. En el contexto de un "intercambio de dominio Gla", un "dominio Gla" es cualquier selección de aminoácidos de un dominio Gla y regiones adyacentes que es suficiente para conservar la actividad de unión a fosfolípidos. Típicamente, un intercambio de dominio Gla implicará el reemplazo de entre 40 y 50 aminoácidos de la proteína endógena con entre 40 y 50 aminoácidos de otra proteína, pero puede implicar menos o más aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, un dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (EGF-1 o EGF-2) se refiere a la parte de una proteína que comparte homología de secuencia con una parte de 30 a 40 aminoácidos específica de la secuencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El dominio EGF incluye seis restos de cisteína que se ha mostrado (en EGF) que están implicados en enlaces disulfuro. La estructura principal de un dominio EGF es una lámina beta de dos cadenas seguida de un bucle para una lámina de dos cadenas corta C terminal. FVII contiene los dominios EGF: EGF-1 y EGF-2. Estos dominios corresponden a las posiciones de aminoácidos 46-82 y 87-128, respectivamente, del polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3.

Como se usa en el presente documento, "polipéptido no modificado" o "FVII no modificado" y variaciones gramaticales de los mismos se refieren a un polipéptido de partida que se selecciona para modificación como se proporciona en el presente documento. El polipéptido de partida puede ser una forma de origen natural, de tipo silvestre, de un polipéptido. Además, el polipéptido de partida puede alterarse o mutarse, de modo que difiera de una isoforma de tipo silvestre nativa pero se denomina no obstante en el presente documento polipéptido no modificado de partida en relación con los polipéptidos modificados posteriormente producidos en el presente documento. Por lo tanto, pueden seleccionarse proteínas existentes conocidas en la técnica que se han modificado para que tengan un aumento o una reducción deseada en una actividad o propiedad particular en comparación con una proteína de referencia no modificada y usarse como el polipéptido no modificado de partida. Por ejemplo, una proteína que se ha modificado desde su forma nativa en uno o más cambios de aminoácidos individuales y posee bien un aumento o bien una reducción en una propiedad deseada, tal como un cambio en un resto o restos de aminoácidos para alterar la glucosilación, puede ser una proteína diana, denominada en el presente documento no modificada, para modificación adicional de la misma o una propiedad diferente. Los polipéptidos de FVII modificados ejemplares conocidos en la técnica incluyen cualquier polipéptido de FVII descrito, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 5580560, 6017882, 6693075, 6762286 y 6806063, Publicaciones de Patente de Estados Unidos n.º 20030100506 y 20040220106 y Publicaciones de Patente Internacional n.º WO1988010295, WO200183725, WO2003093465, WO200338162, WO2004083361, WO2004108763, WO2004029090, WO2004029091,

WO200411124 y WO2005123916.

Como se usa en el presente documento, "polipéptidos de factor VII modificados" y "factor VII modificado" se refieren a un polipéptido de FVII que tiene una o más diferencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido de factor VII no modificado. La o las diferencias de aminoácidos pueden ser mutaciones de aminoácidos tales como uno o más reemplazos de aminoácidos (sustituciones), inserciones o deleciones, o pueden ser inserciones o deleciones de dominios completos, y cualquier combinación de los mismos. Típicamente, un polipéptido de FVII modificado tiene una o más modificaciones en secuencia primaria en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. Un polipéptido de FVII modificado proporcionado en el presente documento puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 diferencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. Se contempla cualquier modificación siempre que el polipéptido resultante muestre al menos una actividad de FVII asociada con un polipéptido de FVII nativo, tal como, por ejemplo, actividad catalítica, actividad proteolítica, la capacidad de unirse con FT o la capacidad de unirse con plaquetas activadas.

Como se usa en el presente documento, "inhibidores de la coagulación" se refiere a proteínas o moléculas que actúan para inhibir o prevenir la coagulación o formación de coágulos. La inhibición o prevención de coagulación puede observarse *in vivo* o *in vitro*, y puede ensayarse usando cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitación, ensayos de tiempo de protromboplastina (PT) o el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT).

Como se usa en el presente documento, el inhibidor de ruta de factor tisular (IRFT, también denominado IRFT-1) es un inhibidor de tipo Kunitz que está implicado en la formación de un complejo inhibidor de FT/FVIIa/IRFT/FXa cuaternario en el que la actividad de FVIIa está inhibida. IRFT se expresa como dos formas precursoras diferentes después de corte y empalme alternativo, precursores de IRFT $\alpha$  (SEQ ID NO: 75) y IRFT $\beta$  (SEQ ID NO: 77), que se escinden durante la secreción para generar una proteína madura de 276 aminoácidos (SEQ ID NO: 76) y una de 223 aminoácidos (SEQ ID NO: 78), respectivamente. IRFT contiene 3 dominios Kunitz, de los que el dominio Kunitz-1 es responsable de la unión e inhibición de FVIIa.

Como se usa en el presente documento, IRFT-2 (también conocido como proteína placentaria 5 (PP5) e inhibidor de serina proteasa asociada a matriz (MSP1)) se refiere a un homólogo de IRFT. La proteína IRFT-2 madura de 213 aminoácidos (SEQ ID NO: 79) contiene tres dominios de tipo Kunitz que muestran 43 %, 35 % y 53 % de identidad de secuencia primaria con dominios de tipo Kunitz de IRFT-1 1, 2 y 3, respectivamente. IRFT-2 desempeña un papel en la regulación de la digestión y remodelación de la matriz extracelular, y no se cree que sea un factor importante en la ruta de coagulación.

Como se usa en el presente documento, la antitrombina III (AT-III) es un inhibidor de serina proteasa (serpina). AT-III se sintetiza como una proteína precursora que contiene 464 restos de aminoácidos (SEQ ID NO: 95) que se escinde durante la secreción para liberar una antitrombina madura de 432 aminoácidos (SEQ ID NO: 96).

Como se usa en el presente documento, los cofactores se refieren a proteínas o moléculas que se unen con otras proteínas o moléculas específicas para formar un complejo activo. En algunos ejemplos, se requiere unión con un cofactor para actividad proteolítica óptima. Por ejemplo, el factor tisular (FT) es un cofactor de FVIIa. La unión de FVIIa con FT induce cambios conformacionales que dan como resultado actividad proteolítica aumentada de FVII por sus sustratos, FX y FIX.

Como se usa en el presente documento, el factor tisular (FT) se refiere a una glucoproteína transmembrana de 263 aminoácidos (SEQ ID NO: 97) que actúa como un cofactor para FVIIa. Se expresa de forma constitutiva por células del músculo liso y fibroblastos, y ayuda a iniciar la coagulación uniéndose con FVII y FVIIa cuando estas células entran en contacto con el torrente sanguíneo después de lesión tisular.

Como se usa en el presente documento, la plaqueta activada se refiere a una plaqueta que se ha desencadenado por la unión de moléculas tales como colágeno, tromboxano A2, ADP y trombina para experimentar diversos cambios en morfología, fenotipo y función que en última instancia promueven la coagulación. Por ejemplo, una plaqueta activada cambia de forma a una forma más amorfa con dedos que se proyectan. Las plaquetas activadas también experimentan una "inversión" de la membrana celular de modo que la fosfatidilserina y otros fosfolípidos con carga negativa que normalmente están presentes en la hoja interna de la membrana celular se translocan a la superficie externa, orientada al plasma. Estas membranas de las plaquetas activadas proporcionan la superficie en la que se efectúan muchas de las reacciones de la cascada de coagulación. Las plaquetas activadas también secretan vesículas que contienen factores procoagulantes tales como VWF, FV, trombina, ADP y tromboxano A2, y se adhieren entre sí para formar un tapón plaquetario que se estabiliza por fibrina para convertirse en un coágulo.

Como se usa en el presente documento, el aumento de la unión y/o afinidad con plaquetas activadas, y cualquier variación gramatical de los mismos, se refiere a una capacidad potenciada de un polipéptido o proteína, por ejemplo un polipéptido de FVII, para unirse con la superficie de una plaqueta activada, en comparación con un polipéptido o una proteína de referencia. Por ejemplo, la capacidad de un polipéptido de FVII modificado para unirse con plaquetas activadas puede ser mayor que la capacidad de un polipéptido de FVII no modificado para unirse con

plaquetas activadas. La unión y/o afinidad de un polipéptido por plaquetas activadas puede aumentarse en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la unión y/o afinidad de un polipéptido no modificado. Se conocen en la técnica ensayos para determinar la unión y/o afinidad de un polipéptido para plaquetas activadas. La unión de un polipéptido de FVII con plaquetas activadas está mediada mediante la interacción de aminoácidos en el dominio Gla del polipéptido de FVII y fosfolípidos con carga negativa, tales como fosfatidilserina, en la plaqueta activada. Como tales, los métodos para ensayar con respecto a la unión de polipéptidos, tales como polipéptido de FVII, con plaquetas activadas usan membranas y vesículas que contienen fosfolípidos, tales como fosfatidilserina. Por ejemplo, la capacidad de un polipéptido para unirse con una plaqueta activada se refleja por la capacidad del polipéptido para unirse con vesículas fosfolipídicas que pueden medirse por técnicas de dispersión de la luz.

Como se usa en el presente documento, el aumento de la unión y/o afinidad con fosfolípidos, y cualquier variación gramatical del mismo, se refiere a una capacidad potenciada de un polipéptido o una proteína para unirse con fosfolípidos en comparación con un polipéptido o una proteína de referencia. Los fosfolípidos pueden incluir cualquier fosfolípido, pero particularmente incluyen fosfatidilserina. La unión y/o afinidad de un polipéptido por fosfolípidos puede aumentarse en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más en comparación con la unión y/o afinidad de un polipéptido no modificado. Se conocen en la técnica ensayos para determinar la afinidad y/o unión de un polipéptido por fosfolípidos. Por ejemplo, la unión del polipéptido de FVII con vesículas fosfolipídicas puede determinarse por dispersión de la luz relativa a 90° de la luz incidente. La intensidad de la dispersión de la luz con las vesículas fosfolipídicas solas y con vesículas fosfolipídicas con FVII se mide para determinar la constante de disociación. También puede usarse resonancia de plasma superficial, tal como en un instrumento biosensor BIAcore, para medir la afinidad de polipéptidos de FVII por membranas fosfolipídicas.

Como se usa en el presente documento, la resistencia aumentada a inhibidores o "resistencia aumenta a AT-III" o "resistencia aumentada a IRFT" se refiere a cualquier cantidad de sensibilidad reducida de un polipéptido a los efectos inhibidores de un inhibidor, tal como AT-III o IRFT, en comparación con un polipéptido de referencia, tal como un polipéptido de FVII no modificado. La resistencia aumentada a un inhibidor, tal como AT-III, puede ensayarse evaluando la unión de un polipéptido de FVII modificado con un inhibidor. La resistencia aumentada a un inhibidor, tal como AT-III, también puede ensayarse midiendo la actividad intrínseca o actividad coagulante de un polipéptido de FVII en presencia de AT-III. Se conocen en la técnica ensayos para determinar la unión de un polipéptido con un inhibidor. Para inhibidores covalentes, tales como, por ejemplo, AT-III, puede medirse una constante de velocidad de segundo orden para inhibición. Para inhibidores no covalentes, tales como, por ejemplo, IRFT, puede medirse una  $k_i$ . Además, también puede usarse resonancia en plasma superficial, tal como en un instrumento biosensor BIAcore, para medir la unión de polipéptidos de FVII con AT-III y otros inhibidores. Sin embargo, para inhibidores covalentes tales como AT-III, solamente puede medirse una tasa de asociación usando BIAcore. También se conocen en la técnica ensayos para determinar el efecto inhibidor de, por ejemplo, AT-III en la actividad coagulante o actividad intrínseca de FVII. Por ejemplo, puede medirse la capacidad de un polipéptido de FVII modificado para escindir su sustrato FX en presencia o ausencia de AT-III, y determinarse el grado en que AT-III inhibe la reacción. Esto puede compararse con la capacidad de un polipéptido de FVII no modificado para escindir su sustrato FX en presencia o ausencia de AT-III. Un polipéptido modificado que muestra resistencia aumentada a un inhibidor muestra, por ejemplo, un aumento de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más resistencia a los efectos de un inhibidor en comparación con un polipéptido no modificado.

Como se usa en el presente documento, "resistencia aumentada a inhibición por  $Zn^{2+}$ ", "resistencia aumentada a los efectos inhibidores de  $Zn^{2+}$ " o "resistencia aumentada a  $Zn^{2+}$ " se refiere a cualquier cantidad de sensibilidad reducida de un polipéptido a los efectos inhibidores de  $Zn^{2+}$  en comparación con un polipéptido de referencia, tal como un polipéptido de FVII no modificado. La resistencia aumentada a  $Zn^{2+}$  puede ensayarse, por ejemplo, midiendo la actividad intrínseca o actividad coagulante de un polipéptido de FVII en presencia de  $Zn^{2+}$ , tal como se describe en el Ejemplo 11. La resistencia aumentada a los efectos inhibidores de  $Zn^{2+}$  puede ser el resultado de la unión reducida a  $Zn^{2+}$ . La unión reducida a  $Zn^{2+}$  puede ensayarse midiendo la cantidad de  $Zn^{2+}$  unido por molécula de FVIIa o midiendo la afinidad de la unión de  $Zn^{2+}$  con FVIIa o midiendo una  $Cl_{50}$  para la inhibición de una actividad de FVIIa por cinc. Un polipéptido modificado que muestra resistencia aumentada a los efectos inhibidores de  $Zn^{2+}$  muestra, por ejemplo, un aumento de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más resistencia a los efectos de  $Zn^{2+}$  en comparación con un polipéptido no modificado.

Como se usa en el presente documento, una secuencia de unión a albúmina de suero se refiere a una secuencia de restos de aminoácidos que puede efectuar unión con albúmina de suero. Por lo tanto, cuando se inserta en un polipéptido de FVII, la secuencia de unión a albúmina de suero puede potenciar la afinidad por o unión con albúmina de suero del polipéptido de FVII. La capacidad del polipéptido de FVII modificado que contiene la secuencia de unión a albúmina de suero puede mostrar por lo tanto unión y/o afinidad aumentada con albúmina de suero. Un polipéptido modificado que muestra unión y/o afinidad aumentada con albúmina de suero muestra, por ejemplo, un aumento de

1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más en comparación con la unión y/o afinidad de un polipéptido no modificado. Típicamente, las secuencias de unión a albúmina de suero contienen al menos 10 o más aminoácidos, típicamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40 o más aminoácidos. Son secuencias de unión a albúmina de suero ejemplares las expuestas en SEQ ID NO: 103-109.

Como se usa en el presente documento, una secuencia de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  se refiere a una secuencia de restos de aminoácidos que pueden efectuar unión con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Por lo tanto, cuando se inserta en un polipéptido de FVII, la secuencia de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  puede potenciar la capacidad del polipéptido de FVII para unirse con la integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  y, por lo tanto, las plaquetas, incluyendo plaquetas activadas. La capacidad del polipéptido de FVII modificado que contiene la secuencia de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  puede mostrar por lo tanto unión y/o afinidad aumentada con la integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  y/o plaquetas. Un polipéptido modificado que muestra unión y/o afinidad aumentada con la integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  muestra, por ejemplo, un aumento de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más en comparación con la unión y/o afinidad de un polipéptido no modificado. Típicamente, las secuencias de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  contienen al menos 5 o más aminoácidos, típicamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40 o más aminoácidos. Son secuencias de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ejemplares las expuestas en SEQ ID NO: 110-112.

Como se usa en el presente documento, un sitio de glucosilación se refiere a una posición de amino en un polipéptido con el que puede unirse un resto de carbohidrato. Típicamente, una proteína glucosilada contiene uno o más restos de aminoácidos, tales como asparagina o serina para la unión de los restos de carbohidratos.

Como se usa en el presente documento, un sitio de glucosilación nativo se refiere a una posición de amino con la que se une un resto de carbohidrato en un polipéptido de tipo silvestre. Hay cuatro sitios de glucosilación nativos en FVII; dos sitios de N-glucosilación en N145 y N322, y dos sitios de O-glucosilación en S52 y S60, correspondientes a las posiciones de aminoácidos en el polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3.

Como se usa en el presente documento, un sitio de glucosilación no nativo se refiere a una posición amino con la que se une un resto de carbohidrato en un polipéptido modificado que no está presente en un polipéptido de tipo silvestre. Pueden introducirse sitios de glucosilación no nativos en un polipéptido de FVII por reemplazo de aminoácidos. Pueden crearse sitios de O-glucosilación, por ejemplo, por reemplazo de aminoácidos de un resto nativo con una serina o treonina. Pueden crearse sitios de N-glucosilación, por ejemplo, estableciendo el motivo Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, donde Xaa no es prolina. La creación de esta secuencia consenso por modificación de aminoácidos puede implicar, por ejemplo, un reemplazo de un único aminoácido de un resto de aminoácido nativo con una asparagina, un reemplazo de un único aminoácido de un resto de aminoácido nativo con una serina, treonina o cisteína o un reemplazo de aminoácido doble que implica un primer reemplazo de aminoácido de un resto nativo con una asparagina y un segundo reemplazo de aminoácido de un resto nativo con una serina, treonina o cisteína.

Como se usa en el presente documento, "actividad biológica" se refiere a actividades *in vivo* de un compuesto o respuestas fisiológicas que resultan tras la administración *in vivo* de un compuesto, una composición u otra mezcla. La actividad biológica, por lo tanto, abarca efectos terapéuticos y actividad farmacéutica de dichos compuestos, dichas composiciones y dichas mezclas. Las actividades biológicas pueden observarse en sistemas *in vitro* diseñados para ensayar o usar dichas actividades. Por lo tanto, para fines del presente documento una actividad biológica de un polipéptido de FVII abarca la actividad coagulante.

Como se usa en el presente documento, se entiende que el término "evaluar", y variaciones gramaticales del mismo, incluye determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de un polipéptido, y también de obtener un índice, una relación, un porcentaje, visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la detección de escisión de un sustrato por un polipéptido puede ser por medición directa del producto, o puede medirse indirectamente determinando la actividad resultante del sustrato escindido.

Como se usa en el presente documento, "numeración de quimotripsina" se refiere a la numeración de aminoácidos de un polipéptido de quimotripsina maduro de SEQ ID NO: 80. El alineamiento de un dominio de proteasa de otra proteasa, tal como por ejemplo el dominio de proteasa del factor VII, puede realizarse con quimotripsina. En dicho caso, se proporciona a los aminoácidos del factor VII que corresponden a aminoácidos de quimotripsina la numeración de los aminoácidos de quimotripsina. Pueden determinarse posiciones correspondientes por dicho alineamiento por un experto en la materia usando alineamientos manuales o usando los numerosos programas de alineamiento disponibles (por ejemplo, BLASTP). Las posiciones correspondientes también pueden basarse en alineamientos estructurales, por ejemplo usando alineamientos simulados por ordenador de la estructura proteica. La relación de que los aminoácidos de un polipéptido corresponden a aminoácidos en una secuencia desvelada se refiere a aminoácidos identificados tras el alineamiento del polipéptido con la secuencia desvelada para maximizar la

identidad u homología (cuando se alinean aminoácidos conservados) usando un algoritmo de alineamiento convencional, tal como el algoritmo GAP. Los números de quimotripsina correspondientes de las posiciones de aminoácidos 1 a 406 del polipéptido de FVII expuesto en SEQ ID NO: 3 se proporcionan en la Tabla 1. Las posiciones de aminoácidos relativas a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3 están en fuente normal, los restos de aminoácidos en esas posiciones están en negrita, y los números de quimotripsina correspondientes están en cursiva. Por ejemplo, tras el alineamiento del factor VII maduro (SEQ ID NO: 3) con quimotripsina madura (SEQ ID NO: 80), se proporciona a la isoleucina (I) en la posición de aminoácido 153 en el factor VII la numeración de quimotripsina de I16. Los aminoácidos posteriores se numeran en consecuencia. En un ejemplo, un ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido 210 del factor VII maduro (SEQ ID NO: 3) corresponde a la posición de aminoácido de E70 basada en la numeración de quimotripsina. Cuando existe un resto en una proteasa, pero no está presente en quimotripsina, se proporciona al resto de aminoácido una notación de una letra. Por ejemplo, los restos en quimotripsina que son parte de un bucle con el aminoácido 60 basándose en la numeración de quimotripsina, pero se insertan en la secuencia del factor VII en comparación con quimotripsina, se denominan por ejemplo K60a, I60b, K60c o N60d. Estos restos corresponden a K197, I198, K199 y N200, respectivamente, por numeración relativa a la secuencia del factor VII maduro (SEQ ID NO: 3).

**Tabla 1. Numeración de quimotripsina en el factor VII**

153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167
<b>I</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>C</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>G</b>	<b>E</b>	<b>C</b>	<b>P</b>	<b>W</b>	<b>Q</b>
<i>16</i>	<i>17</i>	<i>18</i>	<i>19</i>	<i>20</i>	<i>21</i>	<i>22</i>	<i>23</i>	<i>24</i>	<i>25</i>	<i>26</i>	<i>27</i>	<i>28</i>	<i>29</i>	<i>30</i>
168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182
<b>V</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>Q</b>	<b>L</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>L</b>
<i>31</i>	<i>32</i>	<i>33</i>	<i>34</i>	<i>35</i>	<i>37</i>	<i>38</i>	<i>39</i>	<i>40</i>	<i>41</i>	<i>42</i>	<i>43</i>	<i>44</i>	<i>45</i>	<i>46</i>
183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
<b>I</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>H</b>	<b>C</b>	<b>F</b>	<b>D</b>	<b>K</b>
<i>47</i>	<i>48</i>	<i>49</i>	<i>50</i>	<i>51</i>	<i>52</i>	<i>53</i>	<i>54</i>	<i>55</i>	<i>56</i>	<i>57</i>	<i>58</i>	<i>59</i>	<i>60</i>	<i>60A</i>
198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212
<b>I</b>	<b>K</b>	<b>N</b>	<b>W</b>	<b>R</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>I</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>E</b>	<b>H</b>	<b>D</b>
<i>60B</i>	<i>60C</i>	<i>60D</i>	<i>61</i>	<i>62</i>	<i>63</i>	<i>64</i>	<i>65</i>	<i>66</i>	<i>67</i>	<i>68</i>	<i>69</i>	<i>70</i>	<i>71</i>	<i>72</i>
213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227
<b>L</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b>H</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>Q</b>
<i>73</i>	<i>74</i>	<i>75</i>	<i>76</i>	<i>77</i>	<i>78</i>	<i>79</i>	<i>80</i>	<i>81</i>	<i>82</i>	<i>83</i>	<i>84</i>	<i>85</i>	<i>86</i>	<i>87</i>
228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242
<b>V</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>V</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>H</b>	<b>D</b>
<i>88</i>	<i>89</i>	<i>90</i>	<i>91</i>	<i>92</i>	<i>93</i>	<i>94</i>	<i>95</i>	<i>96</i>	<i>97</i>	<i>98</i>	<i>99</i>	<i>100</i>	<i>101</i>	<i>102</i>
243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257
<b>I</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>H</b>	<b>Q</b>	<b>P</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>H</b>
<i>103</i>	<i>104</i>	<i>105</i>	<i>106</i>	<i>107</i>	<i>108</i>	<i>109</i>	<i>110</i>	<i>111</i>	<i>112</i>	<i>113</i>	<i>114</i>	<i>115</i>	<i>116</i>	<i>117</i>
258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272
<b>V</b>	<b>V</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	<b>C</b>	<b>L</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b>R</b>	<b>T</b>
<i>118</i>	<i>119</i>	<i>120</i>	<i>121</i>	<i>122</i>	<i>123</i>	<i>124</i>	<i>125</i>	<i>126</i>	<i>127</i>	<i>128</i>	<i>129</i>	<i>129A</i>	<i>129B</i>	<i>129C</i>
273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287
<b>L</b>	<b>A</b>	<b>F</b>	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>W</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>L</b>
<i>129D</i>	<i>129E</i>	<i>129F</i>	<i>129G</i>	<i>134</i>	<i>135</i>	<i>136</i>	<i>137</i>	<i>138</i>	<i>139</i>	<i>140</i>	<i>141</i>	<i>142</i>	<i>143</i>	<i>144</i>
288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302
<b>L</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>N</b>	<b>V</b>
<i>145</i>	<i>146</i>	<i>147</i>	<i>149</i>	<i>150</i>	<i>151</i>	<i>152</i>	<i>153</i>	<i>154</i>	<i>155</i>	<i>156</i>	<i>157</i>	<i>158</i>	<i>159</i>	<i>160</i>
303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317
<b>P</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>Q</b>	<b>D</b>	<b>C</b>	<b>L</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>K</b>	<b>V</b>
<i>161</i>	<i>162</i>	<i>163</i>	<i>164</i>	<i>165</i>	<i>166</i>	<i>167</i>	<i>168</i>	<i>169</i>	<i>170</i>	<i>170A</i>	<i>170B</i>	<i>170C</i>	<i>170D</i>	<i>170E</i>
318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332

<b>G</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>E</b>	<b>Y</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>Y</b>
170F	170G	170H	170I	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184A	184
333	334	335	336	337	338	339	340	341	342		344	345	346	347
<b>S</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>C</b>	<b>K</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>P</b>
185	186	187	188A	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198
348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362
<b>H</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>H</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	<b>V</b>
199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213
363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377
<b>S</b>	<b>W</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>Y</b>
214	215	216	217	219	220	221A	221	222	223	224	225	226	227	228
378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392
<b>T</b>	<b>R</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>Y</b>	<b>I</b>	<b>E</b>	<b>W</b>	<b>L</b>	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>M</b>	<b>R</b>
229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243
393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	
<b>S</b>	<b>E</b>	<b>P</b>	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>P</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	
244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	

- Como se usa en el presente documento, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y mezclas de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están opcionalmente marcados, tal como con un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente o radiomarcador, se contemplan moléculas monocatenarias. Dichas moléculas son típicamente de una longitud tal que su diana sea estadísticamente única o de un número de copias bajo (típicamente menor de 5, generalmente menor de 3) para explorar o aplicar un cebador a una biblioteca. Generalmente una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria a o idéntica a un gen de interés. Las sondas y los cebadores pueden ser de 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de longitud.

- Como se usa en el presente documento, un péptido se refiere a un polipéptido que es de 2 a 40 aminoácidos de longitud.
- Como se usa en el presente documento, los aminoácidos que aparecen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento se identifican de acuerdo con sus abreviaturas de tres letras o una letra conocidas (Tabla 2). Los nucleótidos que aparecen en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones de una única letra convencionales usadas habitualmente en este campo.
- Como se usa en el presente documento, un "aminoácido" es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo de ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para fines del presente documento, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos de origen natural, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en los que el carbono  $\alpha$  tiene una cadena lateral).
- De conformidad con la nomenclatura de polipéptidos convencional descrita en J. Biol. Chem., 243: 3552-3559 (1969), y adoptada en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, se muestran abreviaturas para los restos de aminoácidos en la Tabla 2:

Tabla 2 - Tabla de correspondencia

SÍMBOLO		
1 Letra	3 Letras	AMINOÁCIDO
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina

SÍMBOLO		
1 Letra	3 Letras	AMINOÁCIDO
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gin
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

5 Debería observarse que todas las secuencias de restos de aminoácidos representadas en el presente documento por fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de amino terminal a carboxilo terminal. Además, se define en general que la expresión “resto de aminoácido” incluye los aminoácidos enumerados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 2) y aminoácidos modificados y poco habituales, tales como los referidos en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, e incorporados en el presente documento por referencia. Además, debería observarse que un guión al comienzo o al final de una secuencia de restos de aminoácidos indica un enlace peptídico con una secuencia adicional de uno o más restos de aminoácidos, con un grupo amino terminal tal como NH<sub>2</sub> o con un grupo carboxilo terminal tal como COOH.

10 Como se usa en el presente documento, un “aminoácido hidrófobo” incluye uno cualquiera de los aminoácidos que se ha determinado que son hidrófobos usando la escala de consenso de hidrofobicidad de Eisenberg. Son ejemplos los aminoácidos hidrófobos de origen natural, tales como isoleucina, fenilalanina, valina, leucina, triptófano, metionina, alanina, glicina, cisteína y tirosina (Eisenberg *et al.*, (1982) Faraday Symp. Chem. Soc. 17: 109-120).  
15 También se incluyen aminoácidos hidrófobos de origen no natural.

Como se usa en el presente documento, un “aminoácido ácido” incluye entre los aminoácidos de origen natural restos de ácido aspártico y ácido glutámico. También se incluyen aminoácidos ácidos de origen no natural.

20 Como se usa en el presente documento, “aminoácidos de origen natural” se refiere a los 20 aminoácidos L que aparecen en polipéptidos.

25 Como se usa en el presente documento, “aminoácido no natural” se refiere a un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo de ácido carboxílico que no es uno de los aminoácidos de origen natural enumerados en la Tabla 2. Los aminoácidos de origen no natural incluyen por lo tanto, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos de origen natural e incluyen, pero sin limitación, los D-isoestereómeros de aminoácidos. Se conocen por los expertos en la materia aminoácidos no naturales ejemplares y pueden incluirse en un polipéptido de factor VII modificado.

30 Como se usa en el presente documento, una construcción de ADN es una molécula de ADN lineal o circular, monocatenaria o bicatenaria, que contienen segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera no hallada en la naturaleza. Las construcciones de ADN existen como resultado de la manipulación humana, e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

Como se usa en el presente documento, un segmento de ADN es una parte de una molécula de ADN mayor que tiene atributos específicos. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido específico es una parte de una molécula de ADN más larga, tal como un plásmido o fragmento plasmídico que, cuando se lee en la dirección de 5' a 3', codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido específico.

Como se usa en el presente documento, el término polinucleótido significa un polímero monocatenario o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas del extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizadas *in vitro*, o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula polinucleotídica se proporciona en el presente documento con respecto a nucleótidos (abreviado "nt") o pares de bases (abreviado "pb"). El término nucleótidos se usa para moléculas mono y bicatenarias cuando el contexto lo permita. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias se usa para indicar longitud global y se entenderá que es equivalente a la expresión pares de bases. Se reconocerá por los expertos en la materia que las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en su longitud y que los extremos de las mismas pueden ser escalonados; por lo tanto todos los nucleótidos dentro de una molécula polinucleotídica bicatenaria no pueden emparejarse. Dichos extremos no emparejados, en general, no superarán los 20 nucleótidos de longitud.

Como se usa en el presente documento, la "secuencia primaria" se refiere a la secuencia de restos de aminoácidos en un polipéptido.

Como se usa en el presente documento, la "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud puede basarse en el grado de identidad y/u homología de secuencias de restos y los restos contenidos en las mismas. Se conocen por los expertos en la materia métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, en un método para evaluar la similitud de secuencia, se alinean dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos de manera que produzcan un nivel máximo de identidad entre las secuencias. La "identidad" se refiere al grado en que las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son invariantes. El alineamiento de secuencias de aminoácidos y en algún grado secuencias de nucleótidos, también puede tener en cuenta diferencias conservativas y/o sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservativas son las que conservan las propiedades físico-químicas de los restos implicados. Los alineamientos pueden ser globales (alineamiento de las secuencias comparadas sobre la longitud completa de las secuencias e incluyendo todos los restos) o locales (el alineamiento de una parte de las secuencias que incluye solamente la región o las regiones más similares).

Como se usa en el presente documento, los términos "homología" e "identidad" se usan indistintamente, pero la homología para proteínas puede incluir cambios de aminoácidos conservativos. En general para identificar posiciones correspondientes las secuencias de aminoácidos se alinean de modo que se obtenga la coincidencia de mayor orden (véase, por ejemplo: *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carillo *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48: 1073).

Como se usa en el presente documento, la "identidad de secuencia" se refiere al número de aminoácidos idénticos (o bases de nucleótidos) en una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de ensayo y uno de referencia. Los polipéptidos homólogos se refieren a un número predeterminado de restos de aminoácidos idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones de aminoácidos conservativas así como restos idénticos. La identidad de secuencia puede determinarse por programas de algoritmos de alineamiento convencionales usados con penalizaciones de hueco por defecto establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico homólogas se refieren a un número predeterminado de nucleótidos idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones que no cambian el aminoácido codificado (es decir, "sustituciones silenciosas") así como restos idénticos. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas hibridan típicamente a rigurosidad moderada o a alta rigurosidad a lo largo de toda la longitud del ácido nucleico o a lo largo de al menos aproximadamente 70 %, 80 % o 90 % de la molécula de interés de ácido nucleico de longitud completa. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contienen codones degradados en lugar de codones en la molécula de ácido nucleico de hibridación (para determinación de la homología de proteínas, pueden alinearse aminoácidos conservativos así como aminoácidos idénticos; en este caso, el porcentaje de identidad y el porcentaje de homología varían). Si dos moléculas de ácido nucleico cualesquiera tienen secuencias de nucleótidos (o dos polipéptidos cualesquiera tienen secuencias de aminoácidos) que son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % "idénticas" puede determinarse usando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa "FAST A", usando por ejemplo, los parámetros por defecto como en Pearson *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988) (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12(I): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F., *et al.*, *J. Molec. Biol.* 215: 403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994), y Carillo *et al.* *SIAM J Applied Math* 48: 1073 (1988)). Por ejemplo, la



función BLAST de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica puede usarse para determinar la identidad. Otros programas disponibles en el mercado o públicamente incluyen el programa "MegAlign" de DNASTar (Madison, WI), y el programa "Gap" del Grupo de Informática Genética de la Universidad de Wisconsin (UWG) (Madison WI)). Puede determinarse el porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, comparando la información de secuencia usando un programa informático GAP (por ejemplo, Needleman *et al.* J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), como se revisó en Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)). Brevemente, un programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov *et al.* Nucl. Acids Res. 14: 6745 (1986), como se describe en Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización de 0,10 adicional para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para huecos en los extremos.

Por lo tanto, como se usa en el presente documento, el término "identidad" representa una comparación entre un polipéptido o un polinucleótido de ensayo y uno de referencia. En un ejemplo no limitante, "al menos 90 % idéntico a" se refiere a porcentajes de identidad del 90 al 100 % en relación con los polipéptidos de referencia. La identidad a un nivel del 90 % o más es indicativa del hecho de que, suponiendo para fines de ejemplificación que se compara una longitud de polinucleótido de ensayo y referencia de 100 aminoácidos, no más del 10 % (es decir, 10 de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de ensayo difiere de los de los polipéptidos de referencia. Pueden realizarse comparaciones similares entre polinucleótidos de ensayo y de referencia. Dichas diferencias pueden representarse como mutaciones puntuales distribuidas aleatoriamente sobre la longitud completa de una secuencia de aminoácidos o pueden agruparse en una o más localizaciones de diversa longitud hasta el máximo permisible, por ejemplo, 10/100 aminoácidos de diferencia (aproximadamente 90 % de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácido nucleico o aminoácidos. Al nivel de homologías o identidades por encima de aproximadamente el 85-90 %, el resultado debería ser independiente del programa y los parámetros de hueco establecidos; dichos altos niveles de identidad pueden evaluarse fácilmente, con frecuencia sin basarse en software.

Como se usa en el presente documento, también se entiende que las expresiones "sustancialmente idéntico" o "similar" varían con el contexto como se entiende por los expertos en la técnica relevante, pero que los expertos en la materia pueden evaluarlos.

Como se usa en el presente documento, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similitud y/o identidad) para alinear las posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Típicamente, se alinean dos o más secuencias que están relacionadas en 50 % o más de identidad. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias que se alinean en posiciones correspondientes y pueden incluir alinear secuencias derivadas de ARN, tales como EST y otros ADNc, alineados con secuencia de ADN genómica.

Como se usa en el presente documento, "hibrida específicamente" se refiere a hibridar, por formación de pares de bases complementarias, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) con una molécula de ácido nucleico diana. Los expertos en la materia están familiarizados con parámetros *in vitro* e *in vivo* que afectan a la hibridación específica, tales como una longitud y composición de la molécula particular. Los parámetros particularmente relevantes para hibridación *in vitro* incluyen además temperatura de hibridación y lavado, composición de tampón y concentración salina. Son condiciones de lavado ejemplares para retirar moléculas de ácido nucleico no unidas específicamente a alta rigurosidad SSPE 0,1 x, SDS 0,1 %, 65 °C, y a rigurosidad media son SSPE 0,2 x, SDS 0,1 %, 50 °C. Se conocen en la técnica condiciones de rigurosidad equivalentes. Los expertos en la materia pueden ajustar fácilmente estos parámetros para conseguir hibridación específica de una molécula de ácido nucleico con una molécula de ácido nucleico diana apropiada para una aplicación particular.

Como se usa en el presente documento, un polipéptido o una proteína aislado o purificado o parte biológicamente activa del mismo está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o el tejido del que deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Puede determinarse que las preparaciones están sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables como se determina por métodos de análisis convencionales, tales como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), usados por los expertos en la materia para evaluar dicha pureza, o suficientemente puras de modo que la purificación adicional no alteraría de forma detectable las propiedades físicas y químicas, tales como actividades proteolíticas y biológicas, de la sustancia. Se conocen por los expertos en la materia métodos para purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros. Un compuesto sustancialmente químicamente puro, sin embargo, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En dichos casos, la purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

La expresión sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína se

- separa de componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de forma recombinante. En un ejemplo, la expresión sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas de proteasa que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de proteínas no proteasa (también denominadas en el presente documento una proteína contaminante), generalmente menos de aproximadamente el 20 % de proteínas no proteasa o 10 % de proteínas no proteasa o menos de aproximadamente el 5 % de proteínas no proteasa. Cuando la proteína proteasa o parte activa de la misma se produce de forma recombinante, también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de, aproximadamente, o igual a 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación de proteína proteasa.
- Como se usa en el presente documento, la expresión sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos incluye preparaciones de proteínas de proteasa en las que la proteína se separa de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. La expresión incluye preparaciones de proteínas de proteasa que tienen menos de aproximadamente el 30 % (en peso seco), 20 %, 10 %, 5 % o menos de precursores químicos o productos químicos o componentes distintos de proteasa.
- Como se usa en el presente documento, la producción por métodos recombinantes usando métodos de ADN recombinante se refiere al uso de los métodos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas codificadas por ADN clonado.
- Como se usa en el presente documento, el vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se usan para introducir ácido nucleico heterólogo en células para expresión o replicación del mismo. Los vectores permanecen típicamente episómicos, pero pueden diseñarse para efectuar integración de un gen o parte del mismo en un cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamífero. Se conoce bien por los expertos en la materia la selección y el uso de dichos vehículos.
- Como se usa en el presente documento, la expresión se refiere al proceso por el que se transcribe ácido nucleico a ARNm y se traduce en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el ácido nucleico deriva de ADN genómico, la expresión puede, si se selecciona una célula o un organismo hospedador eucariota apropiado, incluir procesamiento, tal como corte y empalme del ARNm.
- Como se usa en el presente documento, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que se une operativamente con secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de dichos fragmentos de ADN. Dichos segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, y similares. Los vectores de expresión derivan en general de ADN plasmídico o viral, o pueden contener elementos de ambos. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que, tras su introducción en una célula hospedadora apropiada, da como resultado la expresión del ADN clonado. Se conocen bien por los expertos en la materia vectores de expresión apropiados e incluyen los que son replicables en células eucariotas y/o células procariotas y los que permanecen episómicos o los que se integran en el genoma de células hospedadoras.
- Como se usa en el presente documento, el vector también incluye "vectores de virus" o "vectores virales". Los vectores virales son virus modificados técnicamente que se unen operativamente con genes exógenos para transferir (como vehículos o lanzaderas) los genes exógenos a células.
- Como se usa en el presente documento, un adenovirus se refiere a cualquiera de un grupo de virus que contienen ADN que provocan conjuntivitis e infecciones del tracto respiratorio superior en seres humanos.
- Como se usa en el presente documento, ADN desnudo se refiere a ADN sin histonas que puede usarse para vacunas y terapia génica. El ADN desnudo es el material genético que se pasa de célula a célula durante un proceso de transferencia génica denominado transformación o transfección. En la transformación o transfección, el ADN purificado o desnudo que se capta por la célula receptora proporcionará a la célula receptora una nueva característica o un nuevo fenotipo.
- Como se usa en el presente documento, unido operativamente cuando se hace referencia a segmentos de ADN significa que los segmentos se disponen de modo que actúen en concierto para sus fines pretendidos, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y continúa a través del segmento codificante hasta el terminador.
- Como se usa en el presente documento, un agente que modula la actividad de una proteína o la expresión de un gen o ácido nucleico reduce o aumenta o altera de otro modo la actividad de la proteína o, de alguna manera, regula positiva o negativamente o altera de otro modo la expresión del ácido nucleico en una célula.
- Como se usa en el presente documento, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido unido operativamente con un polipéptido diferente. Una proteína quimérica o de fusión proporcionada en el presente

- documento puede incluir uno o más polipéptidos de FVII, o una parte de los mismos, y uno o más polipéptidos adicionales para una cualquiera o más de una señal de control de la transcripción/traducción, secuencias señal, un marcador para localización, un marcador para purificación, parte de un dominio de una inmunoglobulina G y/o un agente de dirección. Un polipéptido de FVII quimérico también incluye los que tienen sus dominios o regiones endógenos del polipéptido intercambiados con otro polipéptido. Estas proteínas quiméricas o de fusión incluyen las producidas por medios recombinantes como proteínas de fusión, las producidas por medios químicos, tales como por acoplamiento químico, mediante, por ejemplo, acoplamiento con grupos sulfhidrilo, y las producidas por cualquier otro método por el que al menos un polipéptido (es decir FVII), o una parte del mismo, se une, directa o indirectamente mediante enlazador o enlazadores con otro polipéptido.
- Como se usa en el presente documento, unido operativamente cuando hace referencia a una proteína de fusión se refiere a un polipéptido de proteasa y un polipéptido no de proteasa que se fusionan en fase entre sí. El polipéptido no de proteasa puede fusionarse con el extremo N terminal o C terminal del polipéptido de proteasa.
- Como se usa en el presente documento, un agente de dirección es cualquier resto, tal como una proteína o parte eficaz de la misma, que proporciona unión específica con una molécula de superficie celular, tal como un receptor de superficie celular, que en algunos casos puede internalizar un conjugado unido o parte del mismo. Un agente de dirección también puede ser uno que promueva o facilite, por ejemplo, el aislamiento de afinidad o la purificación del conjugado; unión del conjugado con una superficie; o detección del conjugado o complejos que contienen el conjugado.
- Como se usa en el presente documento, derivado o análogo de una molécula se refiere a una parte derivada de o una versión modificada de la molécula.
- Como se usa en el presente documento, "enfermedad o trastorno" se refiere a una afección patológica en un organismo resultante de causa o afección incluyendo, pero sin limitación, infecciones, afecciones adquiridas, afecciones genéticas y caracterizadas por síntomas identificables. Las enfermedades y trastornos de interés del presente documento son los que implican coagulación, incluyendo los mediados por proteínas de coagulación y en los que las proteínas de coagulación desempeñan un papel en la etiología o patología. Las enfermedades y los trastornos también incluyen los que están provocados por la ausencia de una proteína tal como en hemofilia, y son de particular interés los trastornos en los que la coagulación no se produce debido a una deficiencia o defecto en una proteína de coagulación.
- Como se usa en el presente documento, "procoagulante" se refiere a cualquier sustancia que promueva la coagulación sanguínea.
- Como se usa en el presente documento, "anticoagulante" se refiere a cualquier sustancia que inhiba la coagulación sanguínea.
- Como se usa en el presente documento, "hemofilia" se refiere a un trastorno de sangrado provocado por una deficiencia en un factor de coagulación sanguínea. La hemofilia puede ser el resultado, por ejemplo, de la ausencia, expresión reducida, o función reducida de un factor de coagulación. El tipo más común de hemofilia es la hemofilia A, que resulta de una deficiencia en el factor VIII. El segundo tipo más común de hemofilia es la hemofilia B, que resulta de una deficiencia en el factor IX. La hemofilia C también denominada deficiencia de FXI, es una forma más leve y menos común de la hemofilia.
- Como se usa en el presente documento, "hemofilia congénita" se refiere a tipos de hemofilia que son heredadas. La hemofilia congénita resulta de la mutación, delección, inserción y otra modificación de un gen de factor de coagulación en el que la producción del factor de coagulación está ausente, reducida o no funcional. Por ejemplo, las mutaciones hereditarias en genes del factor de coagulación, tales como factor VIII y factor IX dan como resultado las hemofilias congénitas, hemofilia A y B, respectivamente.
- Como se usa en el presente documento, "hemofilia adquirida" se refiere a un tipo de hemofilia que se desarrolla en la adultez a partir de la producción de autoanticuerpos que inactivan FVIII.
- Como se usa en el presente documento, "trastorno de sangrado" se refiere a una afección en la que el sujeto tiene una capacidad reducida de controlar el sangrado. Los trastornos del sangrado pueden heredarse o adquirirse, y pueden resultar de, por ejemplo, defectos o deficiencias en la ruta de coagulación, defectos o deficiencias en la actividad plaquetaria, o defectos vasculares.
- Como se usa en el presente documento, "trastorno de sangrado adquirido" se refiere a trastornos de sangrado que resultan de deficiencias de coagulación provocadas por afecciones tales como enfermedad hepática, deficiencia de vitamina K, o coumadina (warfarina) u otra terapia anticoagulante.
- Como se usa en el presente documento, "tratar" a un sujeto que tiene una enfermedad o afección significa que un polipéptido, una composición u otro producto proporcionado en el presente documento se administra al sujeto.

Como se usa en el presente documento, un agente terapéutico, régimen terapéutico, radioprotector o producto quimioterapéutico significa fármacos convencionales y terapias farmacológicas, incluyendo vacunas, que se conocen por los expertos en la materia. Se conocen bien en la técnica agentes radioterapéuticos.

5 Como se usan en el presente documento, los tratamientos significan cualquier manera en que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad se alivien o se alteren de otra forma beneficiosamente. Por lo tanto el tratamiento abarca profilaxis, terapia y/o cura. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de las composiciones del presente documento. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de un FVII modificado y composiciones proporcionados en el presente documento.

10 Como se usa en el presente documento, el alivio de los síntomas de una enfermedad o un trastorno particular por un tratamiento, tal como por administración de una composición farmacéutica u otro producto terapéutico, se refiere a cualquier reducción, bien permanente o bien temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que puede atribuirse a o asociarse con administración de la composición o el producto terapéutico.

15 Como se usa en el presente documento, la prevención o profilaxis se refiere a métodos en los que el riesgo de desarrollar la enfermedad o afección se reduce. La profilaxis incluye reducción en el riesgo de desarrollar una enfermedad o afección y/o prevención del empeoramiento de síntomas o progresión de una enfermedad o reducción en el riesgo de empeoramiento de los síntomas o progresión de una enfermedad.

20 Como se usa en el presente documento una cantidad eficaz de un compuesto o composición para tratar una enfermedad particular es una cantidad que es suficiente para aliviar, o de alguna manera reducir los síntomas asociados con la enfermedad. Dicha cantidad puede administrarse como una única dosificación o puede administrarse de acuerdo con un régimen, por el que es eficaz. La cantidad puede curar la enfermedad pero, típicamente, se administra para aliviar los síntomas de la enfermedad. Típicamente, se requiere la administración repetida para conseguir un alivio deseado de los síntomas.

25 Como se usa en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a un agente, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Una cantidad eficaz es la cantidad de un agente terapéutico necesaria para prevenir, curar, aliviar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o un trastorno.

30 Como se usa en el presente documento, el "paciente" o "sujeto" para tratar incluye seres humanos y/o animales no humanos, incluyendo mamíferos. Los mamíferos incluyen primates, tales como seres humanos, chimpancés, gorilas y monos; animales domesticados, tales como perros, caballos, gatos, cerdos, cabras, vacas; y roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y gerbos.

35 Como se usa en el presente documento, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o más artículos. La asociación puede ser espacial o referirse al uso de los dos o más artículos para un fin común.

40 Como se usa en el presente documento, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos o compuestos (por ejemplo, agentes, moduladores, reguladores, etc.). Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, formulaciones acuosas o no acuosas o cualquier combinación de los mismos.

45 Como se usa en el presente documento, un "artículo de fabricación" es un producto que se prepara y se vende. Como se usa a lo largo de la presente solicitud, se entiende que el término abarca polipéptidos de proteasa modificados y ácidos nucleicos contenidos en artículos de empaquetamiento.

50 Como se usa en el presente documento, el fluido se refiere a cualquier composición que pueda fluir. Los fluidos abarcan por lo tanto composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras de dichas composiciones.

55 Como se usa en el presente documento, un "kit" se refiere a una combinación empaquetada, opcionalmente incluyendo reactivos y otros productos y/o componentes para practicar métodos usando los elementos de la combinación. Por ejemplo, se proporcionan kits que contienen un polipéptido de proteasa modificado o molécula de ácido nucleico proporcionado en el presente documento y otro artículo para un fin incluyendo, pero sin limitación, administración, diagnóstico y evaluación de una actividad o propiedad biológica. Los kits incluyen opcionalmente instrucciones para su uso.

60 Como se usa en el presente documento, el anticuerpo incluye fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab, que están compuestos de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada.

65 Como se usa en el presente documento, un receptor se refiere a una molécula que tienen una afinidad por un ligando particular. Los receptores pueden ser moléculas de origen natural o sintéticas. Los receptores también pueden denominarse en la técnica anti ligandos.

5 Como se usa en el presente documento, el animal incluye cualquier animal, tal como, pero sin limitación: primates incluyendo seres humanos, gorilas y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves tales como pollos; rumiantes, tales como cabras, vacas, ciervos, ovejas; ovinos, tales como cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen a los seres humanos como el animal contemplado. Las proteasas proporcionadas en el presente documento son de cualquier fuente, animal, vegetal, procariota y fúngica.

10 Como se usa en el presente documento, la terapia génica implica la transferencia de ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, a ciertas células, células diana, de un mamífero, particularmente un ser humano, con un trastorno o afección para el que se busca dicha terapia. El ácido nucleico, tal como ADN, se introduce en las células diana seleccionadas, tal como directamente o en un vector u otro vehículo de suministro, de tal manera que el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, se exprese y se produzca un producto terapéutico codificado por el mismo. Como alternativa, el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, puede mediar de alguna manera en la expresión de ADN que codifica el producto terapéutico, o puede codificar un producto, tal como un péptido o ARN que de alguna manera media, directa o indirectamente, en la expresión de un producto terapéutico. La terapia genética también puede usarse para suministrar ácido nucleico que codifica un producto génico que reemplaza un gen defectuoso o complementa un producto génico producido por el mamífero o la célula en la que se introduce. El ácido nucleico introducido puede codificar un compuesto terapéutico, tal como una proteasa o proteasa modificada, que no se produce normalmente en el hospedador mamífero o que no se produce en cantidades terapéuticamente eficaces o en un tiempo terapéuticamente útil. El ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, que codifica el producto terapéutico puede modificarse antes de la introducción en las células del hospedador aquejado para potenciar o alterar de otro modo el producto o la expresión del mismo. La terapia génica también puede implicar el suministro de un inhibidor o represor u otro modulador de la expresión génica.

25 Como se usa en el presente documento, el ácido nucleico heterólogo es ácido nucleico que no se produce normalmente *in vivo* por la célula en la que se expresa o que se produce por la célula pero está en un locus diferente o se expresa de forma diferente o que media en o codifica mediadores que alteran la expresión de ácido nucleico endógeno, tal como ADN, afectando a la transcripción, traducción u otros procesos bioquímicos regulables. El ácido nucleico heterólogo generalmente no es endógeno para la célula en la que se introduce, pero se ha obtenido de otra célula o se ha preparado de forma sintética. El ácido nucleico heterólogo puede ser endógeno, pero es ácido nucleico que se expresa a partir de un locus diferente o se altera en su expresión. Generalmente, aunque no necesariamente, dicho ácido nucleico codifica ARN y proteínas que no se producen normalmente por la célula o de la misma manera en la célula en la que se expresan. El ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, también puede denominarse ácido nucleico ajeno, tal como ADN. Por lo tanto, el ácido nucleico heterólogo o ácido nucleico ajeno incluye una molécula de ácido nucleico no presente en la orientación o posición exacta ya que la molécula de ácido nucleico homóloga, tal como ADN, se encuentran en un genoma. También puede referirse a una molécula de ácido nucleico de otro organismo u otra especie (es decir, exógeno).

40 Cualquier ácido nucleico, tal como ADN, que un experto en la materia reconocería o consideraría heterólogo o ajeno a la célula en la que se expresa el ácido nucleico está abarcado en el presente documento por ácido nucleico heterólogo; el ácido nucleico heterólogo incluye ácido nucleico añadido de forma exógena que también se expresa de forma endógena. Los ejemplos de ácido nucleico heterólogo incluyen, pero sin limitación, ácido nucleico que codifica proteínas marcadoras rastreables, tales como una proteína que confiere resistencia a fármacos, ácido nucleico que codifica sustancias terapéuticamente eficaces, tales como agentes antineoplásicos, enzimas y hormonas, y ácido nucleico, tal como ADN, que codifica otros tipos de proteínas, tales como anticuerpos. Los anticuerpos que se codifican por ácido nucleico heterólogo pueden secretarse o expresarse en la superficie de la célula en la que se ha introducido el ácido nucleico heterólogo.

50 Como se usa en el presente documento, un producto terapéuticamente eficaz para terapia génica es un producto que está codificado por ácido nucleico heterólogo, típicamente ADN, que, tras la introducción del ácido nucleico en un hospedador, se expresa un producto que alivia o elimina los síntomas, manifestaciones de una enfermedad heredada o adquirida o que cura la enfermedad. También se incluyen moléculas de ácido nucleico biológicamente activas, tales como ARNi y antisentido.

55 Como se usa en el presente documento, la indicación de que un polipéptido "consiste esencialmente" en una secuencia enumerada de aminoácidos significa que solamente la parte enumerada, o un fragmento de la misma, del polipéptido de longitud completa está presente. El polipéptido puede opcionalmente incluir, y generalmente incluirá, aminoácidos adicionales de otra fuente o puede insertarse en otro polipéptido.

60 Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un" y "el" incluyen referentes plurales a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un compuesto, que comprende "un dominio extracelular" incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

65 Como se usa en el presente documento, los intervalos y las cantidades pueden expresarse como "aproximadamente" un valor o intervalo particular. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto "aproximadamente 5 bases" significa "aproximadamente 5 bases" y también "5 bases".

Como se usa en el presente documento, “opcional” u “opcionalmente” significa que el acontecimiento o la circunstancia descrito a continuación sucede o no sucede, y que la descripción incluye casos en los que dicho acontecimiento o dicha circunstancia sucede y casos en los que no. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo está sustituido o no está sustituido.

5 Como se usa en el presente documento, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácido y otros compuestos son, a no ser que se indique de otro modo, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas, o la Comisión sobre Nomenclatura Bioquímica de IUPAC-IUB (véase, (1972) *Biochem.* 11: 1726).

## 10 **B. Visión de conjunto de la hemostasia**

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de Factor VII (FVII) modificados de acuerdo con las presentes reivindicaciones. Dichos polipéptidos de FVII se diseñan para tener actividad coagulante aumentada. En consecuencia, estos polipéptidos tienen una diversidad de usos y aplicaciones, por ejemplo, como productos terapéuticos para modular la hemostasia, y otros procesos biológicos relacionados. Para apreciar las modificaciones proporcionadas en el presente documento y el uso de dichas moléculas de FVII modificadas, es ventajoso un entendimiento del sistema hemostático y la cascada de coagulación sanguínea. El siguiente análisis proporciona dicho fondo, previo a un análisis del factor VII, y modificaciones del mismo.

20 La hemostasia es el mecanismo fisiológico que surge del sangrado que resulta de lesión a la vasculatura. La hemostasia normal depende de componentes celulares y proteínas de plasma solubles, e implica una serie de acontecimientos de señalización que en última instancia conducen a la formación de un coágulo sanguíneo. La coagulación se inicia rápidamente después de producirse una lesión en el vaso sanguíneo y dañarse células endoteliales. En la fase primaria de coagulación, las plaquetas se activan para formar un tapón hemostático en el sitio de lesión. Continúa la hemostasia secundaria que implica factores de coagulación de plasma, que actúan en una cascada proteolítica que da como resultado la formación de cadenas de fibrina que refuerzan el tapón plaquetario.

Tras la lesión de los vasos, el flujo sanguíneo al área lesionada inmediata se restringe por constricción vascular lo que permite que las plaquetas se adhieran al colágeno fibrilar recién expuesto en el tejido conectivo subendotelial. Esta adhesión depende del factor de von Willebrand (vWF), que se une con el endotelio en tres segundos desde la lesión, facilitando de este modo la adhesión y agregación de plaquetas. La activación de las plaquetas agregadas da como resultado la secreción de una diversidad de factores, incluyendo ADP, ATP, tromboxano y serotonina. También se liberan moléculas de adhesión, fibrinógeno, vWF, trombospondina y fibronectina. Dicha secreción promueve la adhesión y agregación adicional de plaquetas, activación de plaquetas aumentada y constricción de vasos sanguíneos, y exposición de fosfolípidos aniónicos en la superficie de plaquetas que actúan como plataformas para el ensamblaje de complejos enzimáticos de coagulación sanguínea. Las plaquetas cambian de forma lo que conduce a formación de pseudópodos, lo que facilita adicionalmente la agregación con otras plaquetas dando como resultado un tapón plaquetario suelto.

40 Se inicia simultáneamente una cascada de coagulación de peptidasas (la cascada de coagulación). La cascada de coagulación implica una serie de acontecimientos de activación que implican la escisión proteolítica. En dicha cascada, una proteína inactiva de una serina proteasa (también denominada un zimógeno) se convierte en una proteasa activa por la escisión de uno o más enlaces peptídicos, que después actúa como la proteasa activadora para la siguiente molécula de zimógeno en la cascada, dando como resultado en último instancia formación de coágulo por la reticulación de fibrina. Por ejemplo, la cascada genera moléculas activadas tales como trombina (a partir de escisión de protrombina), que activa adicionalmente plaquetas, y también genera fibrina a partir de escisión de fibrinógeno. La fibrina forma después un polímero reticulado alrededor del tapón plaquetario para estabilizar el coágulo. Tras la reparación de la lesión, la fibrina se digiere por el sistema fibrinolítico, cuyos componentes principales son el plasminógeno y el activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA). Ambas de estas proteínas se incorporan en fibrina de polimerización, donde interaccionan para generar plasmina, que, a su vez, actúa en la fibrina para disolver el coágulo preformado. Durante la formación de coágulo, también circulan inhibidores del factor de coagulación a través de la sangre para prevenir la formación de coágulos más allá del sitio de lesión.

La interacción del sistema, desde la lesión a la formación del coágulo y la fibrinólisis posterior, se describe a continuación.

### 1. Adhesión y agregación de plaquetas

60 La coagulación de la sangre se evita activamente en condiciones normales. El endotelio vascular soporta vasodilatación, inhibe la adhesión y activación de plaquetas, suprime la coagulación, potencia la escisión de fibrina y es de carácter antiinflamatorio. Las células endoteliales vasculares secretan moléculas tales como óxido nítrico (NO) y prostaciclina, que inhiben la agregación de plaquetas y dilatan los vasos sanguíneos. La liberación de estas moléculas activa guanilato ciclasas solubles (sGC) y proteína quinasa dependiente de cGMP I (cGKI) y aumenta los niveles de guanosin monofosfato cíclico (cGMP), lo que provoca relajación del músculo liso en la pared vascular. Además, las células endoteliales expresan ADPasas de superficie celular, tales como CD39, que controlan la activación y agregación de plaquetas convirtiendo ADP liberado de plaquetas en inhibidores de plaquetas de

nucleótido adenina. El endotelio también desempeña un papel importante en la regulación de las enzimas en la cascada fibrinolítica. Las células endoteliales promueven directamente la generación de plasmina a través de la expresión de receptores de plasminógeno (anexina II) y uroquinasa, así como la secreción de activadores de plasminógeno de tipo tisular y uroquinasa, todos los cuales promueven la eliminación de coágulos. En una capa final de regulación protrombótica, las células endoteliales desempeñan un papel activo en la inhibición de la cascada de coagulación produciendo heparán sulfato, lo que aumenta la cinética de la inhibición de antitrombina III de trombina y otros factores de coagulación.

Con traumatismo vascular agudo, sin embargo, predominan los mecanismos vasoconstrictores y el endotelio se hace de naturaleza protrombótica, procoaguladora y proinflamatoria. Esto se consigue por una reducción de agentes de dilatación endotelial: adenosina, NO y prostaciclina; y la acción directa de ADP, serotonina y tromboxano en células del músculo liso vascular para inducir su contracción (Becker, Heindl *et al.*, 2000). El desencadenante principal para el cambio en la función endotelial que conduce a la formación de trombo hemostático es la pérdida de la barrera celular endotelial entre la sangre y los componentes de la matriz extracelular (ECM) (Ruggeri (2002) Nat Med 8: 1227-1234). Las plaquetas en circulación identifican y diferencian áreas de lesiones endoteliales y se adhieren al subendotelio expuesto. Su interacción con los diversos sustratos trombogénicos y agonistas liberados o generados localmente da como resultado activación de plaquetas. Se describe que este proceso posee dos estadios, 1) adhesión: la unión inicial a una superficie y 2) agregación: la cohesión plaqueta-plaqueta (Savage *et al.* (2001) Curr Opin Hematol 8: 270-276).

La adhesión plaquetaria se inicia cuando las plaquetas en circulación se unen con colágeno expuesto mediante interacción con proteínas de unión a colágeno en la superficie celular, y mediante interacción con vWF, también presente en el endotelio. La proteína vWF es una estructura multimérica de tamaño variable, secretada en dos direcciones por el endotelio; basolateralmente y en el torrente sanguíneo. vWF también se une con el factor VIII, que es importante en la estabilización del factor VIII y su supervivencia en la circulación.

Se consigue adhesión y posterior activación de plaquetas cuando vWF se une mediante su dominio A1 con GPIIb (parte del complejo de receptor de glucoproteína de plaquetas GPIIb-IX-V). La interacción entre vWF y GPIIb está regulada por fuerza de corte de modo que un aumento en el esfuerzo cortante dé como resultado un aumento correspondiente en la afinidad de vWF por GPIIb. La integrina  $\alpha 1\beta 2$ , también conocida en leucocitos como VLA-2, es el receptor de colágeno principal en plaquetas, y la interacción mediante este receptor genera las señales intracelulares que contribuyen a la activación de plaquetas. La unión mediante  $\alpha 1\beta 2$  facilita la interacción del receptor de colágeno de menos afinidad, GP VI. Este es parte de la superfamilia de inmunoglobulina y es el receptor que genera las señales intracelulares más potentes para activación de plaquetas. La activación de plaquetas da como resultado la liberación de adenosin difosfato (ADP), que se convierte en tromboxano A2.

La activación de plaquetas también da como resultado expresión en superficie de receptores de glucoproteína de plaquetas IIb-IIIa (GP IIb-IIIa), también conocidos como integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Los receptores de GP IIb-IIIa permiten la adherencia de plaquetas entre sí (es decir agregación) en virtud de moléculas de fibrinógeno que unen las plaquetas a través de estos receptores. Esto da como resultado la formación de un tapón plaquetario en el sitio de lesión para ayudar a prevenir pérdida de sangre adicional, mientras que el tejido vascular dañado libera factores que inician la cascada de coagulación y la información de una red de fibrina estabilizante alrededor del tapón plaquetario.

## 2. Cascada de coagulación

La ruta de coagulación es una ruta proteolítica donde cada enzima está presente en el plasma como un zimógeno, o una forma inactiva. La escisión del zimógeno está regulada para liberar la forma activa de la molécula precursora. Los cofactores de las proteasas activadas, tales como las glucoproteínas FVIII y FV, también están activados en la reacción de cascada y desempeña un papel en la formación de coágulos. La ruta actúa como una serie de bucles de retroalimentación positiva y negativa que controlan el proceso de activación, donde el objetivo último es producir trombina, que después puede convertir fibrinógeno soluble en fibrina para formar un coágulo. Se proporciona típicamente a los factores en la coagulación un número romano, con una "a" en minúscula adjunta para indicar una forma activada. La Tabla 3 a continuación expone una lista ejemplar de los factores, incluyendo su nombre común, y su papel en la cascada de coagulación. En general, estas proteínas participan en la coagulación sanguínea a través de una o más de las rutas de coagulación intrínseca, extrínseca o común (véase Figura 1). Como se analiza posteriormente, estas rutas están interconectadas, y se cree que la coagulación sanguínea se produce a través de un modelo basado en células de activación siendo el Factor VII (FVII) el iniciador primario de la coagulación.

Tabla 3

Factores de Coagulación			
Factor	Nombre Común	Ruta	Característica
I	Fibrinógeno	Ambas	-
II	Protrombina	Ambas	Contiene dominio Gla N terminal

Factores de Coagulación			
Factor	Nombre Común	Ruta	Característica
III	Factor Tisular	Extrínseca	-
IV	Calcio	Ambas	-
V	Proaccelerina, factor lábil, globulina Acelerante	Ambas	Cofactor proteico
VI (Va)	Accelerina	-	(Redundante para factor V)
VII	Proconvertina, cotromboplastina aceleradora de conversión de protrombina en suero (SPCA)	Extrínseca	Endopeptidasa con dominio Gla
VIII	Factor antihemofílico A, globulina antihemofílica (AHG)	Intrínseca	Cofactor proteico
IX	Factor Christmas, factor antihemofílico B, componente de tromboplastina en plasma (PTC)	Intrínseca	Endopeptidasa con dominio Gla
X	Factor de Stuart-prower	Ambas	Endopeptidasa con dominio Gla
XI	Antecedente de tromboplastina en plasma (PTA)	Intrínseca	Endopeptidasa
XII	Factor de Hageman	Intrínseca	Endopeptidasa
XIII	Protransglutamidasa, factor estabilizante de fibrina (FSF), fibrinolisasa	Ambas	Transpeptidasa

\*Tabla adaptada de M. W. King (2006) en med.unibs.it/~marchesi/blood.html

La generación de trombina se ha dividido históricamente en tres rutas, la ruta intrínseca (que sugiere que todos los componentes de la ruta son intrínsecos al plasma) y la extrínseca (que sugiere que uno o más componentes de la ruta son extrínsecos al plasma) que proporcionan vías alternativas para la generación de factor X activado (FXa), y la ruta común final que da como resultado formación de trombina (Figura 1). Estas rutas participan juntas en un proceso interconectado e interdependiente para efectuar coagulación. Se desarrolló un modelo de coagulación basado en células que describe estas rutas (Figura 2) (Hoffman *et al.* (2001) *Thromb Haemost* 85: 958-965). En este modelo, las rutas "extrínseca" e "intrínseca" se efectúan en superficies celulares diferentes, la célula portadora de factor tisular (FT) y la plaqueta, respectivamente. El proceso de coagulación se separa en fases distintas, inicio, amplificación y propagación, durante las que las rutas extrínseca e intrínseca actúan en diversos estadios para producir el gran estallido de trombina requerido para convertir suficientes cantidades de fibrinógeno en fibrina para la formación de coágulos.

#### a. Inicio

Se considera que FVII es el factor de coagulación responsable del inicio de la cascada de coagulación, cuyo inicio depende de su interacción con FT. FT es una glucoproteína transmembrana expresada por una diversidad de células tales como células de músculo liso, fibroblastos, monocitos, linfocitos, granulocitos, plaquetas y células endoteliales. Las células mieloides y células endoteliales solamente expresan FT cuando se estimulan, tal como por citocinas proinflamatorias. Las células y fibroblastos de músculo liso, sin embargo, expresan FT de forma constitutiva. En consecuencia, una vez que estas células entran en contacto con el torrente sanguíneo después de la lesión tisular, la cascada de coagulación se inicia rápidamente por la unión de FT con el factor VII o FVIIa en el plasma.

Como se analiza posteriormente, la mayoría de FVII en la sangre está en la forma de zimógeno con una cantidad pequeña, aproximadamente 1 %, presente como FVIIa. En ausencia de la unión con FT, sin embargo, incluso FVIIa tiene características de tipo zimógeno y no presenta actividad significativa hasta que forma complejo con FT. Por lo tanto, FVII en plasma requiere activación por escisión proteolítica, y cambio conformacional adicional mediante interacción con FT, para actividad completa. Se ha mostrado que una serie de proteasas, incluyendo los factores IXa, Xa, XIIa y trombina, tienen capacidad de escisión de FVII *in vitro*, un proceso que se acelera en presencia de FT. FVIIa en sí mismo también puede activar FVII en presencia de FT, un proceso denominado autoactivación. Las cantidades pequeñas de FVIIa en la sangre probablemente se deban a la activación por FXa y/o FIXa (Wildgoose *et al.* (1992) *Blood* 80: 25-28, y Butenas *et al.* (1996) *Biochemistry* 35: 1904-1910). Pueden por lo tanto formarse complejos de FT/FVIIa por la unión directa de FVIIa con FT, o por la unión de FVII con FT y después la activación posterior de FVII a FVIIa por una proteasa de plasma, tal como FXa, FIXa, FXIIa o FVIIa en sí mismo. El complejo de FT/FVIIa permanece anclado a la célula portadora de FT donde activa cantidades pequeñas de FX a FXa en lo que se conoce como la "ruta extrínseca" de coagulación.

El complejo de FT/FVIIa también escinde cantidades pequeñas de FIX a FIXa. FXa se asocia con su cofactor FVa para formar también un complejo en la célula portadora de FT que puede convertir después protrombina en trombina. La cantidad pequeña de trombina producida es, por ejemplo, inadecuada para apoyar la formación de fibrina requerida para coagulación completa. Adicionalmente, se inhiben cualquier FXa y FIXa activo en la circulación por antitrombina III (AT-III) y otras serpinas, lo que se analiza en más detalle posteriormente. Esto evitaría normalmente la formación de coágulos en la circulación. En presencia de lesión, sin embargo, el daño a la vasculatura da como resultado agregación y activación de plaquetas en este sitio de formación de trombina, permitiendo de este modo la amplificación de la señal de coagulación.



## b. Amplificación

La amplificación tiene lugar cuando la trombina se une con y activa las plaquetas. Las plaquetas activadas liberan FV desde sus gránulos alfa que se activa por trombina a FVa. La trombina también libera y activa FVIII del complejo de FVIII/WWF en la membrana de plaquetas y escinde FXI a FXIa. Estas reacciones generan plaquetas activadas que tienen FVa, FVIIIa y FIXa en su superficie, que sientan las bases para un gran estallido de generación de trombina durante el estadio de propagación.

## c. Propagación

La propagación de la coagulación se produce en la superficie de grandes números de plaquetas en el sitio de lesión. Como se ha descrito anteriormente, las plaquetas activadas tienen FXIa, FVIIIa y FVa en su superficie. Es aquí donde se efectúa la ruta extrínseca. FXIa activa FIX a FIXa, que después puede unirse con FVIIIa. Este proceso, además de las cantidades pequeñas de FIXa que se generan por escisión de FIX por el complejo de FT/FVIIa en la célula portadora de FT, genera grandes números de complejos FXIa/FVIIIa que a su vez pueden activar cantidades significativas de FX a FXa. Las moléculas de FXa se unen con FVa para generar los complejos de protrombinasa que activan protrombina a trombina. La trombina actúa en un bucle de retroalimentación positiva para activar aún más plaquetas e inicia de nuevo los procesos descritos para la fase de amplificación.

Muy brevemente, hay suficientes números de plaquetas activas con los complejos apropiados para generar el estallido de trombina que es suficientemente grande para generar suficientes cantidades de fibrina a partir de fibrinógeno para formar un coágulo de fibrina hemostático. El fibrinógeno es un dímero soluble en plasma que, cuando se escinde por trombina, libera fibrinopéptido A y fibrinopéptido B. El fibrinopéptido B se escinde después por trombina y los monómeros de fibrina formados por esta segunda escisión proteolítica forman espontáneamente un gel insoluble. La fibrina polimerizada se mantiene unida por fuerzas no covalentes y electroestáticas y se estabiliza por la enzima de transamidación Factor XIIIa (FXIIIa), producida por la escisión de FVIII por trombina. La trombina también activa TAFI, que inhibe la fibrinólisis produciendo la generación de plasmina en la superficie del coágulo. Adicionalmente, la trombina en sí misma se incorpora en la estructura del coágulo para estabilización adicional. Estos agregados de fibrina insoluble (coágulos), junto con plaquetas agregadas (trombos), bloquean el vaso sanguíneo dañado y evitan sangrado adicional.

## 3. Regulación de la coagulación

Durante la coagulación, la cascada se regula por procesos constitutivos y estimulados para inhibir la formación de coágulo adicional. Hay varias razones para dichos mecanismos reguladores. En primer lugar, se requiere la regulación para limitar la isquemia de tejidos por formación de coágulos de fibrina. En segundo lugar, la regulación evita la trombosis generalizada localizando la formación de coágulos solamente en el sitio de lesión tisular.

Se consigue regulación mediante los cationes de varias moléculas inhibitorias. Por ejemplo, la antitrombina III (AT-III) y el inhibidor de la ruta del factor tisular (IRFT) actúan de forma constitutiva para inhibir factores en la cascada de coagulación. AT-III inhibe la trombina, FIXa y FXa, mientras que IRFT inhibe FXa y el complejo FVIIa/FT. Un factor adicional, Proteína C, que se estimula mediante activación de plaquetas, regula la coagulación por escisión proteolítica e inactivación de FVa y FVIIIa. La Proteína S potencia la actividad de la Proteína C. Además, otro factor que contribuye a la inhibición de la coagulación es la proteína integral de membrana trombomodulina, que se produce por células endoteliales vasculares y actúa como un receptor para trombina. El enlace de trombina con trombomodulina inhibe las actividades procoagulantes de trombina y también contribuye a la activación de la proteína C.

La fibrinólisis, la degradación del coágulo de fibrina, también proporciona un mecanismo para regular la coagulación. Los multímeros de fibrina reticulados en un coágulo se degradan en polipéptidos solubles por plasmina, una serina proteasa. La plasmina puede generarse a partir de su plasminógeno precursor inactivo y reclutarse al sitio de un coágulo de fibrina de dos maneras: mediante interacción con el activador de plasminógeno tisular (tPA) en la superficie de un coágulo de fibrina, y mediante interacción con activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA) en una superficie celular. El primer mecanismo parece ser el principal responsable de la disolución de coágulos en los vasos sanguíneos. El segundo, aunque es capaz de mediar en la disolución de coágulos, puede desempeñar un papel importante en la remodelación tisular, migración celular e inflamación.

La disolución de coágulos se regula de dos maneras. En primer lugar, la activación de plasmina eficaz y fibrinólisis se producen solamente en complejos formados en la superficie del coágulo o en una membrana celular, mientras que las proteínas libres en la sangre son catalizadores ineficaces y se inactivan rápidamente. En segundo lugar, se inactivan activadores de plasminógeno y plasmina por moléculas tales como inhibidor de activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y PAI-2 que actúan en los activadores de plasminógeno, y antiplasmina  $\alpha_2$  y macroglobulina  $\alpha_2$  que inactivan la plasmina. En circunstancias normales, el equilibrio oportuno entre la coagulación y la fibrinólisis da como resultado la formación eficaz y eliminación de coágulos después de lesión vascular, mientras se evitan simultáneamente episodios trombóticos o de sangrado no deseados.

Se expone en la Tabla 4 a continuación un sumario de factores de coagulación, cofactores y proteínas reguladoras ejemplares, y sus actividades.

Tabla 4

<b>Zimógenos de Factor de Coagulación y Cofactores</b>	
<b>Nombre del Factor</b>	<b>Actividad</b>
<b>Zimógenos de Serina Proteasas</b>	
Factor XII	Se une con colágeno expuesto en el sitio de lesión de la pared vascular, activado por quininógeno de alto PM y calicreína
Factor XI	Activado por factor XIIa
Factor IX	Activado por factor XIa + Ca <sup>2+</sup>
Factor VII	Activado por trombina, factor X, factor IXa o factor XIIa + Ca <sup>2+</sup> , o autoactivación
Factor X	Activado en la superficie de plaquetas por el complejo de tenasa (FDCa/FVIIIa); También activado por factor VIIa + factor tisular + Ca <sup>2+</sup> , o factor VIIa + Ca <sup>2+</sup>
Factor II	Activado en la superficie de plaquetas por el complejo de protrombinasa (FXa/FVa)
<b>Cofactores</b>	
Factor VIII	Activado por trombina; el factor VIIIa actúa como cofactor para el factor IXa en la activación del factor X
Factor V	Activado por trombina; el factor Va actúa como cofactor para el factor Xa en la activación de protrombina
Factor III (factor Tisular)	Actúa como cofactor para el factor VIIa
<b>Fibrinógeno</b>	
Factor I (Fibrinógeno)	Escindido por trombina para formar fibrina
<b>Transglutaminasa</b>	
Factor XIII	Activado por trombina + Ca <sup>2+</sup> ; promueve la reticulación covalente de fibrina
<b>Proteínas reguladoras y otras</b>	
Factor de von Willebrand (vWF)	Actúa como enlace entre el complejo de GPIb-V-IX y colágeno
Proteína C	Activado por trombina unida a trombomodulina; Ca degrada los factores VIIIa y Va
Proteína S	Actúa como cofactor de la proteína C
Trombomodulina	Proteína de superficie celular endotelial; se une con trombina, que activa la proteína C
Antitrombina III	Inhibidor de coagulación, principalmente de trombina y factor Xa, pero también factores IXa, XIa, y XIIa, y el factor VIIa en complejo con FT
Inhibidor de la Ruta del Factor Tisular (IRFT)	Se une con FXa y después forma una estructura cuaternaria con FT/FVIIa para inhibir la actividad de FT/FVIIa
*Tabla adaptada de M. W. King (2006) med.unibs.it/~marchesi/blood.html	

5

### C. Factor VII (FVII)

El factor VII es una glucoproteína de serina proteasa dependiente de vitamina K que se sintetiza en animales, incluyendo mamíferos, como un zimógeno monocatenario en el hígado y se secreta al torrente sanguíneo. Como se ha descrito anteriormente, FVII es la proteasa de coagulación responsable de iniciar la cascada de acontecimientos proteolíticos que conducen a generación de trombina y deposición de fibrina. Es parte de la ruta extrínseca, aunque los efectos corriente abajo de su actividad también influyen en gran medida en la ruta intrínseca. Este papel integral en la función de coágulos ha atraído un interés significativo en FVII como una diana para terapias anticoagulantes y hemostáticas clínicas. Por ejemplo, se ha desarrollado FVII activado recombinante (rFVIIa) como un agente

10

hemostático para su uso en sujetos hemófilos, y sujetos con otras afecciones de sangrado. Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que se diseñan para tener actividad de coagulación aumentada tras su activación, y que pueden actuar como productores terapéuticos mejorados para tratar enfermedades y afecciones susceptibles a terapia de factor VII.

5

## 1. Estructura y organización de FVII

El gen de FVII humano (F7) se localiza en el cromosoma 13 en 13q34 y es de 12,8 kb de longitud con 9 exones. El gen de FVII comparte similitud de organización significativa con genes que codifican otras proteínas dependientes de vitamina K, tales como protrombina, factor IX, factor X y proteína C. El ARNm para FVII experimenta corte y empalme alternativo para producir dos transcritos: variante 1 (n.º de Referencia de Genbank NM\_000131, expuesto en SEQ ID NO: 81) y variante 2 (n.º de Referencia de Genbank NM\_019616, expuesto en SEQ ID NO: 82). La variante de transcrito 2, que es la forma más abundante en el hígado, no incluye el exón 1b y por lo tanto codifica un polipéptido precursor más corto de 444 aminoácidos (precursor de isoforma b de FVII; SEQ ID NO: 2), en comparación con el polipéptido precursor de 466 aminoácidos codificado por la variante de transcrito 1 (precursor de isoforma a de FVII; SEQ ID NO: 1). Los aminoácidos que no están presentes en el polipéptido de precursor de isoforma b de FVII corresponden a los aminoácidos 22 a 43 del precursor de isoforma a de FVII. Estos aminoácidos son parte de la secuencia propeptídica, que da como resultado propéptido de isoforma b de FVII truncado. Los polipéptidos precursores están compuestos de los siguientes segmentos y dominios: un péptido señal hidrófobo (aa 1-20 de SEQ ID NO: 1 y 2), un propéptido (aa 21-60 de SEQ ID NO: 1, y aa 21-38 de SEQ ID NO: 2), un dominio Gla (aa 39-83 de SEQ ID NO: 2, y aa 61-105 de SEQ ID NO: 1), un dominio del factor de crecimiento epidérmico de tipo B (tipo EGF 1, aa 84-120 de SEQ ID NO: 2, y aa 106-142 de SEQ ID NO: 1), un dominio del factor de crecimiento epidérmico de tipo A (tipo EGF 2, aa 125-166 de SEQ ID NO: 2; y aa 147-188 de SEQ ID NO: 1), y un dominio de serina proteasa (aa 191-430 de SEQ ID NO: 2, y aa 213-452 de SEQ ID NO: 1).

25

La forma madura de 406 aminoácidos del polipéptido de FVII (SEQ ID NO: 3) carece de las secuencias de péptido y propéptido señal, y es idéntica en su longitud y secuencia independientemente del precursor de isoforma del que se originó. En la forma madura del polipéptido de FVII las posiciones de aminoácidos correspondientes para los dominios anteriormente mencionados son las siguientes: dominio Gla (aa 1-45 de SEQ ID NO: 3), tipo EGF 1 (aa 46-82 de SEQ ID NO: 3), tipo EGF 2 (aa 87-128 de SEQ ID NO: 3), y dominio de serina proteasa (aa 153-392 de SEQ ID NO: 3).

30

El dominio Gla de FVII es un motivo de unión a membrana que, en presencia de iones de calcio, interacciona con membranas fosfolípídicas que incluyen fosfatidilserina. El dominio Gla también desempeña un papel en la unión con el cofactor de FVIIa, el factor tisular (FT). En complejo con FT, el dominio Gla de FVIIa se carga con siete iones  $Ca^{2+}$ , proyecta tres cadenas laterales hidrófobas en la dirección de la membrana celular para interacción con fosfolípidos en la superficie celular, y tiene un contacto significativo con el dominio C-terminal de FT. El dominio Gla está conservado entre proteínas dependientes de vitamina K, tales como protrombina, factores de coagulación VII, IX y X, proteínas C, S y Z. Estas proteínas requieren vitamina K para la síntesis postraduccional de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, un aminoácido agrupado en el dominio Gla N terminal de estas proteínas. Todos los restos glutámicos presentes en el dominio son sitios de carboxilación potenciales y muchos de ellos se modifican por lo tanto por carboxilación.

35

40

Además del dominio Gla, la proteína FVII madura también contiene dos dominios de tipo EGF. El primer dominio de tipo EGF (tipo EGF 1 o EGF1) es un dominio de EGF de unión a calcio, en el que seis cisteínas centrales conservadas forman tres enlaces disulfuro. El dominio de EGF1 de FVII se une con solamente un ión  $Ca^{2+}$ , pero con afinidad significativamente mayor que la observada con el dominio Gla (Banner *et al.* (1996) *Nature* 380: 41-46). Este ión  $Ca^{2+}$  unido promueve la fuerte interacción entre el dominio de EGF1 de FVII y FT (Osterlund *et al.* (2000) *Eur J Biochem* 267: 6204-6211). El segundo dominio de tipo EGF (tipo EGF 2 o EGF2) no es un dominio de unión a calcio, pero también forma 3 enlaces disulfuro. Como los otros dominios en FVII, el dominio de EGF2 interacciona con FT. También se une por enlace disulfuro con el dominio de proteasa, con el que comparte una gran interfaz de contacto.

45

50

Finalmente, el dominio de serina proteasa de FVII es el dominio responsable de la actividad proteolítica de FVIIa. La secuencia de aminoácidos de FVII en su dominio catalítico presenta alta identidad de secuencia y similitud de estructura terciaria con otras serina proteasas tales como tripsina y quimotripsina (Jin *et al.* (2001) *J Mol Biol*, 307: 1503-1517). Por ejemplo, estas serina proteasas comparten una tríada catalítica común H57, D102, S195, basándose en la numeración de quimotripsina. A diferencia de otras serina proteasas, sin embargo, la escisión de FVIIa no es suficiente para completar la conversión del zimógeno en una enzima completamente activa. En su lugar, como se analiza posteriormente, FVIIa se activa de forma alostérica en su función catalítica mediante la unión con el receptor de superficie celular FT, que induce un cambio conformacional en el dominio de proteasa de FVIIa cambiándolo de un estado inactivo de tipo zimógeno a una enzima catalíticamente activa. Una región de bucle de hélice entre el sitio de unión a cofactor y el sitio activo (es decir las posiciones de restos de aminoácidos 305-321, correspondientes a los restos 163-170i basándose en la numeración de quimotripsina) de FVIIa es importante para la alostericidad y zimogenidad de FVIIa (Persson *et al.* (2004) *Biochem J.*, 379: 497-503). Esta región está compuesta por una hélice  $\alpha$  corta (posiciones de restos de aminoácidos 307 a 312) seguida de un bucle. La parte N

55

60

65

terminal de la hélice forma parte de la interfaz entre el dominio de proteasa y FT, y contiene varios restos que son importantes para la función proteolítica y la unión óptima con FT. Una comparación de la estructura cristalina de FVIIa solamente y FVIIa en complejo con FT indica que la hélice  $\alpha$  de FVIIa solamente aparece distorsionada, acortada y orientada de forma diferente. Esto afecta a las estructuras en bucle adyacentes, alejándolas del sitio activo. Por el contrario, la hélice  $\alpha$  de FVIIa cuando está en complejo con FT está estabilizada, y los bucles adyacentes se sitúan más cercanos al sitio activo. Esta estabilización se efectúa mediante mecanismos que implican al menos la metionina en la posición de aminoácido 306 (resto de aminoácido Met<sup>164</sup> por numeración de quimotripsina) de FVII (Pike *et al.* (1999) PNAS 8925-8930).

## 2. Modificaciones postraduccionales

El polipéptido precursor de FVII (una de las isoformas del gen del Factor VII) se dirige a la ruta secretora celular por el péptido señal hidrófobo, que se inserta en el retículo endoplásmico (RE) para iniciar la translocación a través de la membrana. Aunque la proteína se transloca a través de la membrana del RE, el péptido señal de 20 aminoácidos se escinde por una peptidasa señal dentro del lumen de RE, después de lo cual el polipéptido experimenta modificaciones postraduccionales adicionales, incluyendo N y O-glucosilación, carboxilación dependiente de vitamina K de los ácidos glutámicos N terminales a ácidos  $\gamma$ -carboxiglutámicos, e hidroxilación de ácido aspártico a ácido  $\beta$ -hidroxiaspártico.

El propéptido proporciona un sitio de unión para una carboxilasa dependiente de vitamina K que reconoce una hélice  $\alpha$  anfipática de 10 restos en el propéptido de FVII. Después de la unión, la carboxilasa carboxila en  $\gamma$  10 restos de ácido glutámico dentro del dominio Gla del polipéptido de FVII, produciendo restos de  $\gamma$ -carboxiglutamilo en las posiciones E66, E67, E74, E76, E79, E80, E85, E86, E89 y E95 en relación con la secuencia de aminoácidos precursora de FVII expuesta en SEQ ID NO: 2. Estas posiciones corresponden a las posiciones E6, E7, E14, E19, E20, E25, E26, E29 y E35 del polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3. Para actividad óptima, la molécula de FVII requiere calcio, que se une con el polipéptido y facilita los cambios conformacionales necesarios para unión de FVIIa con FT y lípidos. El dominio Gla  $\gamma$ -carboxilado se une con siete iones Ca<sup>2+</sup> con afinidad variable, lo que induce el cambio conformacional que permite que el dominio Gla interaccione con el dominio de C terminal de FT, y también fosfatidilserinas y otros fosfolípidos con carga negativa en la membrana de plaquetas.

Se lleva a cabo glucosilación ligada a N por transferencia de Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub> (GlcNAc) a dos restos de asparagina en el polipéptido de FVII, en posiciones que corresponden a los restos de aminoácidos 145 y 322 de la proteína madura (SEQ ID NO: 3). Se produce glucosilación ligada a O en los restos de aminoácidos 52 y 60 del polipéptido maduro, y se produce hidroxilación a un ácido  $\beta$ -hidroxiaspártico en el resto de ácido aspártico en la posición 63. Estos restos de serina O-glucosilados y el resto de ácido aspártico  $\beta$ -hidroxilado están en el dominio EGF-1 de FVII. Estas modificaciones se efectúan en el RE y el complejo de Golgi antes del procesamiento final del polipéptido a su forma madura.

## 3. Procesamiento de FVII

El polipéptido pro FVII modificado se transporta a través del lumen del Golgi al compartimento *trans* Golgi donde el propéptido se escinde por una propeptidasa justo antes de la secreción de la proteína de la célula. PACE/furina (donde PACE es un acrónimo para Enzima de Escisión de Aminoácidos Básicos Emparejados) es una endopeptidasa localizada en la membrana del Golgi que escinde muchas proteínas en el extremo carboxilo terminal del motivo de secuencia Arg-[cualquier resto]-(Lys o Arg)-Arg. Esta propeptidasa escinde glucoproteínas dependientes de vitamina K tales como los polipéptidos de profactor IX y pro-vWF (Himmelspach *et al.* (2000) Thromb Research 97; 51-67), liberando el propéptido de la proteína madura. La inclusión de un sitio de reconocimiento de PACE/furina apropiado en precursores del factor VII recombinantes facilita el procesamiento y la secreción correctos del polipéptido recombinante (Margaritas *et al.* (2004) Clin Invest 113(7): 1025-1031). PACE/furina, u otra enzima propeptidasa de tipo subtilisina, es probablemente responsable del procesamiento proteolítico de pro FVII a FVII. Puede reconocer y unirse con el motivo consenso -Arg-Arg-Arg-Arg- en las posiciones de aminoácidos 35-38 de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1, y las posiciones 57-60 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, escindiendo el propéptido y liberando la proteína madura para secreción.

## 4. Activación de FVII

La amplia mayoría de FVII en sangre está en forma de un zimógeno monocatenario inactivado, aunque una pequeña cantidad está presente en una forma activada bicatenaria. La activación de FVII sucede tras la escisión proteolítica del enlace Arg<sup>152</sup>-Ile<sup>153</sup> (posiciones relativas al polipéptido de FVII maduro, expuesto en SEQ ID NO: 3), dando lugar a un polipéptido bicatenario que contiene una cadena ligera de 152 aminoácidos (aproximadamente 20 kDa) unida por un enlace disulfuro a una cadena pesada de 254 aminoácidos (aproximadamente 30 kDa). La cadena ligera de FVIIa contiene el dominio Gla y dominios de tipo EGF, mientras que la cadena pesada contiene la parte catalítica o de serina proteasa de la molécula. La conversión del FVII monocatenario al FVIIa bicatenario está mediada por escisión por FIXa, FXa, FXIIa, trombina, o de una manera autocatalítica por FVIIa endógeno (Butenas *et al.* (1996)

Biochem 35: 1904-1910; Nakagaki *et al.* (1991) Biochem 30: 10819-10824). La cantidad traza de FVIIa que aparece en circulación probablemente surja de la acción de FXa y FIXa.

5 Como se ha analizado anteriormente, la escisión de FVII de su forma de zimógeno a FVIIa no es suficiente para la actividad completa. FVIIa requiere la asociación con FT para actividad completa (Higashi *et al.* (1996) J Biol Chem 271: 26569-26574). Debido a este requisito, se han atribuido a FVIIa solamente características de tipo zimógeno, que presentan plegamiento y forma de zimógeno, y que muestran actividad relativamente baja. Esta característica de tipo zimógeno de FVIIa en ausencia de su asociación con FT lo hace relativamente resistente a antitrombina III (AT-III) y otras serpinas, que generalmente actúan principalmente en las formas activas de serina proteasas en lugar de la forma de zimógeno. Además, IRFT, el principal inhibidor de la actividad de FT/FVIIa, tampoco se une eficazmente con la forma "inactiva" no en complejo de FVIIa.

15 Tras la formación del complejo con FT, FVIIa experimenta un cambio conformacional que permite la actividad completa de la molécula. Todos los dominios de FVII están implicados en la interacción con FT, pero los cambios conformacionales que aparecen están localizados en el dominio de proteasa de FVIIa. Por ejemplo, los cambios conformacionales que aparecen tras la interacción alostérica de FVIIa y FT incluyen la creación de un exosito de unión a sustrato macromolecular extendido. Este sitio de unión extendido potencia en gran medida la activación proteolíticamente mediada por FVII del factor X.

20 La actividad de FVIIa se aumenta adicionalmente (es decir mil veces) cuando la interacción de FVIIa es con FT expresado en superficie celular. Esto se debe a que las membranas fosfolípicas que contienen fosfolípidos con carga negativa, tales como fosfatidilserina, son un sitio de interacción de otros factores de coagulación dependientes de vitamina K tales como FIX y FX, que se unen mediante sus dominios Gla. Por lo tanto, la concentración local de estas proteínas dependientes de vitamina K es alta en la superficie celular, lo que promueve su interacción con el complejo de FT/FVIIa.

## 5. Función de FVII

30 Aunque FVIIa muestra actividad aumentada después de la activación alostérica por FT, hay pruebas de que existen mecanismos en los que FVIIa solo puede iniciar la coagulación. Por lo tanto, FVII puede actuar de una manera dependiente de FT y una independiente de FT. Esta última ruta puede desempeñar un papel mucho más pequeño en la hemostasia normal, aunque su importancia podría aumentar cuando se considera en el contexto de trastornos de sangrado, y el tratamiento de los mismos.

### 35 a. Actividad de FVIIa dependiente del factor tisular

FVII en circulación se une con FT en superficie celular y se activa por FIXa, FXa, trombina o de una manera autocatalítica por FVIIa endógeno como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, la cantidad muy pequeña de FVIIa en circulación puede unirse directamente con FT. El complejo de FT/FVIIa se une después con una fracción pequeña de FX en plasma y el dominio catalítico de FVIIa escinde FX para producir FXa. Se forma por lo tanto trombina a través de la ruta extrínseca en la superficie de la célula portadora de FT, cuando FXa forma complejo con FVa y activa protrombina a trombina (Figura 3). FIX también se activa por el complejo de FT/FVIIa, proporcionando un enlace con la ruta intrínseca que actúa en la superficie de la plaqueta activada. Los sistemas de retroalimentación positiva en la cascada de coagulación descrita anteriormente proporcionan el medio por el que se producen grandes cantidades de trombina, que escinde fibrinógeno a fibrina para formar un coágulo.

### b. Actividad de FVIIa independiente de factor tisular

50 Además del mecanismo dependiente de FT para la activación de FX a FXa, existen pruebas de que FVIIa también puede activar FX en ausencia de FT. Las plaquetas activadas traslocan fosfatidilserinas y otros fosfolípidos con carga negativa a la superficie externa, orientada al plasma (Hemker *et al.* (1983) Blood Cells 9: 303-317). Estos proporcionan "receptores" alternativos a través de los que FVIIa puede unirse, aunque con una afinidad relativamente baja que es 1000 veces menor que la afinidad de unión de FVIIa con FT (Monroe *et al.* (1997) Br J Haematol 99: 542-7). Esta interacción está mediada mediante restos en el dominio Gla (Harvey *et al.* (2003) 278: 8363-8369). FVIIa puede convertir después FX a FXa y FIX a FIXa en la superficie de plaquetas activadas (Hoffman *et al.* (1998) Blood Coagul Fibrinolysis 9: S61-S65). El FXa permanece asociado con la superficie de plaquetas, donde puede unirse con FVa y generar suficiente trombina a partir de protrombina, mientras que el FIXa de nueva formación se ensambla con FVIIIa para catalizar la activación de más FX a FXa (Figura 3). La hemostasia en ausencia de FT puede conseguirse entonces mediante los mecanismos de retroalimentación positiva y propagación descritos anteriormente. Es notable, sin embargo, que aunque FVIIIa puede contribuir al proceso de coagulación en la plaqueta activada, su presencia no se requiere para la generación de trombina en el mecanismo independiente de FT (Figura 3). Por lo tanto, en ausencia de FVIII, tal como en pacientes con hemofilia, existen pruebas de que FVIIa puede iniciar y/o amplificar la generación de trombina a través de este mecanismo secundario, y efectuar formación de coágulos.

65

## 6. FVII como un producto biofarmacéutico

FVII actúa para iniciar la coagulación sanguínea. FVIIa recombinante (NovoSeven®; rFVIIa) está aprobado para el tratamiento de episodios de sangrado o prevención de sangrado en procedimientos quirúrgicos o invasivos en pacientes que tienen hemofilia A o B con inhibidores para el Factor VIII o el Factor IX, y en pacientes con deficiencia del Factor VII congénita. NovoSeven® es una preparación obtenida por ingeniería genética del factor VIIa que se produce en un sistema de expresión de mamíferos usando células de riñón de cría de hámster (BHK). El agente es casi idéntico al factor derivado de plasma VIIa en su estructura y función (Ratko *et al.* (2004), P & T, 29: 712-720).

Se ha mostrado que la administración de FVIIa recombinante (rFVIIa) promueve la coagulación sanguínea en pacientes que padecen hemofilia, y se ha descubierto que el tratamiento con dosis de FVIIa es seguro y está bien tolerado en sujetos humanos. Típicamente, el uso de rFVIIa ha sido en pacientes que han desarrollado inhibidores (es decir aloanticuerpos) para el Factor VIII o el Factor IX. El uso de rFVIIa como un coagulante se ha extendido al tratamiento de otros trastornos hemorrágicos, por ejemplo trombostenia de Glanzmann; otros acontecimientos asociados con sangrado extensivo, tales como el resultado de traumatismo o cirugía incluyendo, pero sin limitación, trasplantes de hígado, cirugía de próstata y traumatismo hemorrágico; coagulopatías neonatales, enfermedad hepática grave; trasplante de médula ósea, trombocitopenias y trastornos de función plaquetaria; inversión urgente de la anticoagulación oral; deficiencias congénitas de los factores V, VII, X y XI; y enfermedad de von Willebrand con inhibidores para el factor de von Willebrand.

Se requiere una alta dosis de rFVII para conseguir un efecto terapéutico. La dosis y el régimen de dosificación requeridos para administración de rFVII varía dependiendo de la indicación clínica. Por ejemplo, la dosificación típica de rFVII para episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A o hemofilia B que tienen aloanticuerpos es de 90 µg/kg administrado por inyección intravenosa (IV). Ya que rFVII tiene una semivida de 2 horas, se requiere dosificación repetida. Puede proporcionarse dosificación adicional cada dos horas hasta que se consiga la hemostasia. El intervalo de dosis puede alterarse dependiendo de la gravedad de la afección. Por ejemplo, han sido eficaces dosis que varían de 35 a 120 µg/kg. Además, la dosis y el régimen de dosificación pueden variar con otras indicaciones. Por ejemplo, puede administrarse a pacientes con hemofilia A o hemofilia B que se someten a cirugía una dosis inicial de 90 µg/kg inmediatamente antes de la cirugía, proporcionando dosificación repetida cada dos horas durante y después de la cirugía. Dependiendo de la gravedad de la cirugía y el episodio de sangrado, la infusión IV de embolada puede continuar cada dos a seis horas hasta que se consiga la curación. En pacientes deficientes en FVII congénitos, el rFVII se administra típicamente para evitar el sangrado en cirugía u otros procedimientos invasivos a 15 - 30 µg/kg cada 4- 6 horas hasta que se consiga la hemostasia.

El mecanismo de acción de rFVIIa para iniciar la hemostasia explica el requisito de alta dosis. Los pacientes con hemofilia tienen una fase de coagulación de inicio normal, donde el complejo de FT/FVIIa activa FX a FXa y conduce a la producción de trombina en el sitio de la célula portadora de FT. A continuación, sin embargo, el proceso de coagulación fracasa ya que los pacientes con hemofilia carecen de FVIII (hemofilia A) o FIX (hemofilia B), y son por lo tanto incapaces de formar los complejos de FVIIIa/FIXa en la superficie de la plaqueta activada, lo que normalmente sirve para activar grandes cantidades de FX a FXa en las fases de amplificación y propagación descritas anteriormente. Debido a la presencia de inhibidores, tales como IRFT y AT-III, el FXa que se produce en la célula portadora de FT después de escisión por FT/FVIIa es incapaz de difundir fácilmente entre superficies celulares. Como resultado, no se produce generación de trombina a gran escala en la superficie de la plaqueta activada, y no se forma un coágulo.

Hay pruebas de que el efecto hemostático de altas dosis de rFVIIa puede conseguirse usando generación dependiente de FT y/o independiente de FT de FXa por rFVIIa en las plaquetas activadas (Figura 3). La generación de trombina dependiente de FT puede maximizarse muy rápidamente con la saturación de moléculas de FT con FVIIa y rFVIIa endógenos. En algunos casos, el rFVIIa de alta dosis puede unirse con plaquetas activadas y convertir FX en FXa. El FXa asociado a superficie activa FVa para generar suficiente trombina para hemostasia. Ya que rFVII se une con la superficie de plaqueta con baja afinidad, puede requerirse una mayor dosis de rFVII para generación de trombina. La activación de FXa en plaquetas activadas asegura que la hemostasia mediada por rFVIIa está localizada en el sitio de lesión.

Un medio para conseguir dosificación reducida de rFVII puede mejorar su utilidad y eficacia como un fármaco. Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados. Entre estos están polipéptidos de FVII modificados que muestran resistencia aumentada a AT-III y actividad catalítica en presencia y/o ausencia de FT. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento también pueden mostrar resistencia aumentada a IRFT, resistencia aumentada a los efectos inhibidores de Zn<sup>2+</sup>, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como semivida en suero aumentada, unión y/o afinidad con plaquetas activadas aumentada, unión y/o afinidad con la bobina de suero aumentada y/o unión y/o afinidad con integrina de plaquetas α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> aumentada. Estos polipéptidos de FVII modificados pueden mostrar actividad coagulante aumentada. Los polipéptidos de FVII proporcionados en el presente documento pueden usarse en tratamientos para iniciar la hemostasia en un mecanismo dependiente de FT y/o independiente de FT de modo que se produce FXa y se genera trombina.

#### D. Polipéptidos de FVII modificados

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados de acuerdo con las presentes reivindicaciones. Los polipéptidos de FVII muestran alteraciones en una o más actividades o propiedades en comparación con un polipéptido de FVII que no esté modificado de este modo. Las actividades o propiedades que pueden alterarse como resultado de la modificación incluyen, pero sin limitación, coagulación o actividad coagulante; actividad procoagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como para efectuar activación del factor X (FX) o activación del Factor IX (FIX); antigenicidad (capacidad para unirse con o competir con un polipéptido por la unión con un anticuerpo anti FVII); capacidad para unirse con el factor tisular, factor X o factor IX; capacidad para unirse con fosfolípidos; semivida; estructura tridimensional; pl; y/o conformación. Típicamente, los polipéptidos de FVII modificados muestran actividad procoagulante. Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que muestran actividad coagulante aumentada tras la activación de su forma de zimógeno monocatenaria. Dichos polipéptidos de FVII modificados pueden usarse en el tratamiento de trastornos o acontecimientos de sangrado, tales como hemofilias o lesión, donde los polipéptidos de FVII pueden actuar para promover la coagulación sanguínea. Se incluyen entre dichos polipéptidos de FVII modificados los que tienen resistencia aumentada a inhibidores tales como antitrombina III (AT-III) e inhibidor de la ruta del factor tisular (IRFT), los que tienen resistencia aumentada a los efectos inhibidores de  $Zn^{2+}$ , los que tienen actividad catalítica aumentada en presencia y/o ausencia de FT, los que tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como semivida aumentada, los que tienen unión y/o afinidad aumentada con la superficie de plaquetas, los que tienen unión y/o afinidad aumentada con albúmina de suero, y los que tienen unión y/o afinidad aumentada con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . En particular, dichos polipéptidos de FVII modificados pueden usarse en enfermedades o afecciones para proporcionar actividad coagulante evitando al mismo tiempo los requisitos para FVIIIa y FIXa. En un ejemplo, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden usarse en pacientes hemofílicos que tienen autoanticuerpos para FVIIIa y FIXa. Por lo tanto, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento ofrecen ventajas incluyendo una reducción en la cantidad de FVII administrado que se requiere para mantener una concentración suficiente de FVII activo en el suero para hemostasia. Esto puede conducir, por ejemplo a dosis y/o frecuencia de dosificación menores necesarios para conseguir efectos biológicos comparables, mayor comodidad y aceptación por los sujetos, y atenuación de los efectos secundarios.

Las modificaciones en un polipéptido de FVII pueden realizarse a cualquier forma de un polipéptido de FVII, incluyendo variantes alélicas y de especie, variantes de corte y empalme, variantes conocidas en la técnica, o moléculas de FVII híbridas o quiméricas. Por ejemplo, las modificaciones proporcionadas en el presente documento pueden realizarse en un polipéptido de FVII precursor expuesto en SEQ ID NO: 1 o 2, un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3, o cualquier especie, variante alélica o modificada y fragmentos activos de las mismas, que tiene 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de los polipéptidos de FVII expuestos en la SEQ ID NO: 1-3. Las variantes alélicas de FVII incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los polipéptidos precursores que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 18-74. Las variantes de especies ejemplares para modificación en el presente documento incluyen, pero sin limitación, polipéptidos humanos y no humanos, incluyendo polipéptidos de FVII de polipéptidos de FVII de vaca, ratón, chimpancé pigmeo, chimpancé, conejo, rata, macaco resus, cerdo, perro, pez cebra, pez globo, pollo, orangután y gorila, cuyas secuencias se exponen en SEQ ID NO: 4-17, respectivamente. Pueden realizarse modificaciones en un polipéptido de FVII a un polipéptido de FVII que también contiene otras modificaciones, tales como las descritas en la técnica, incluyendo modificaciones de la secuencia primaria y modificaciones que no están en la secuencia primaria del polipéptido.

La modificación de polipéptidos de FVII también incluye modificación de polipéptidos que son híbridos de diferentes polipéptidos de FVII y también polipéptidos de FVII sintéticos preparados de forma recombinante o sintetizados o contruidos por otros métodos conocidos en la técnica basándose en la secuencia de polipéptidos conocidos. Por ejemplo, basándose en el alineamiento de FVII con otros miembros de la familia de factores de coagulación, tales como factor IX (FIX) o factor X (FX), se identifican fácilmente dominios homólogos entre los miembros de la familia. Pueden construirse variantes quiméricas de polipéptidos de FVII donde uno o más aminoácidos o dominios completos se reemplazan en la secuencia de aminoácidos de FVII usando la secuencia de aminoácidos del miembro de la familia correspondiente. Adicionalmente, los polipéptidos de FVII quiméricos incluyen en los que uno o más aminoácidos o dominios completos se reemplazan en la secuencia de aminoácidos de FVII humana usando la secuencia de aminoácidos de una especie diferente (véase, por ejemplo, Williamson *et al.* (2005) *J Thromb Haemost* 3: 1250-6). Dichas proteínas quiméricas pueden usarse como el polipéptido de FVII no modificado, de partida, en el presente documento.

Las modificaciones proporcionadas en el presente documento de un polipéptido de referencia de partida, no modificado, incluyen reemplazos de aminoácidos o sustitución, adiciones o deleciones de aminoácidos, o cualquier combinación de los mismos. Los polipéptidos de FVII de acuerdo con la presente invención incluyen los que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 posiciones modificadas. Cualquier modificación proporcionada en el presente documento puede combinarse con cualquier otra modificación conocida por un experto en la materia siempre que el polipéptido de FVII modificado resultante muestre actividad de coagulación aumentada cuando esté en su forma bicatenaria. Típicamente, los polipéptidos de FVII modificados muestran actividad coagulante aumentada. Las actividades o

propiedades que puedan alterarse como resultado de la modificación incluyen, pero sin limitación, coagulación o actividad coagulante; actividad procoagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como para efectuar activación del factor X (FX) o activación del factor IX (FIX); antigenicidad (capacidad para unirse con o competir con un polipéptido por la unión con un anticuerpo anti FVII); capacidad para unirse con el factor tisular, factor inhibidor de factor tisular (IRFT), antitrombina III, factor X o factor IX; capacidad para unirse con fosfolípidos, albúmina de suero o integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ; semivida en suero; estructura tridimensional; pl; y/o conformación. Se incluyen entre los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento los que tienen resistencia aumentada a antitrombina III (AT-III), actividad catalítica aumentada en presencia y/o ausencia de FT, resistencia aumentada a inhibidor de la ruta del factor tisular (IRFT), resistencia aumentada a los efectos inhibidores de  $Zn^{2+}$ , propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como semivida en suero aumentada, actividad intrínseca aumentada, glucosilación alterada, afinidad y/o unión aumentada para albúmina de suero, afinidad y/o unión aumentada para integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , y/o afinidad y/o unión aumentada para plaquetas activadas.

En algunos ejemplos, una modificación puede afectar a dos o más propiedades o actividades de un polipéptido de FVII. Por ejemplo, una modificación puede dar como resultado resistencia a AT-III aumentada y actividad catalítica aumentada del polipéptido de FVII modificado en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden ensayarse para cada propiedad y actividad para identificar el rango de efectos de una modificación. Dichos ensayos se conocen en la técnica y se describen posteriormente. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento también incluyen polipéptidos de FVII que se modifican adicionalmente por la maquinaria biocelular e incluyen, por ejemplo, polipéptidos glucosilados,  $\gamma$ -carboxilados y  $\beta$ -hidroxilados.

Las modificaciones proporcionadas en el presente documento a un polipéptido de FVII se realizan para aumentar la resistencia a AT-III, aumentar la resistencia a IRFT, aumentar la resistencia a los efectos inhibidores de  $Zn^{2+}$ , mejorar las propiedades farmacocinéticas, tales como aumentar la semivida en suero, aumentar la actividad catalítica en presencia y/o ausencia de FT, aumentar la unión con plaquetas activadas, alterar la glucosilación, aumentar la afinidad y/o unión con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , aumentar la afinidad y/o unión con albúmina de suero, y/o aumentar la afinidad y/o unión para plaquetas activadas. Por ejemplo, un polipéptido de FVII puede incluir una modificación o modificaciones que aumentan una o ambas de la actividad catalítica y la unión con plaquetas. En otros ejemplos, cualquier modificación proporcionada en el presente documento puede combinarse con cualquier otra modificación conocida por un experto en la materia siempre que el polipéptido de FVII modificado resultante muestre actividad de coagulación aumentada cuando esté en su forma bicatenaria. Típicamente, dicha actividad de coagulación aumentada se debe a resistencia aumentada a AT-III, actividad catalítica aumentada, resistencia aumentada a los efectos inhibidores de  $Zn^{2+}$ , propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como semivida en suero aumentada, resistencia aumentada a IRFT, glucosilación alterada, unión y/o afinidad aumentada con fosfolípidos, unión y/o afinidad con albúmina de suero aumentada, y/o unión y/o afinidad con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  aumentada. En algunos ejemplos, las modificaciones que se introducen en un polipéptido de FVII para alterar una actividad o propiedad específica también, o en su lugar, pueden afectar a otra actividad o propiedad. Por lo tanto, las modificaciones proporcionadas en el presente documento pueden afectar a la propiedad o actividad que se diseñaron para afectar y una o más propiedades o actividades adicionales. Por ejemplo, las modificaciones realizadas a un polipéptido de FVII para aumentar la actividad catalítica también pueden aumentar la resistencia a AT-III. En algunos ejemplos, una modificación individual, tal como sustitución de un único aminoácido, altera 2, 3, 4 o más propiedades o actividades de un polipéptido de FVII. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden ensayarse para cada propiedad y actividad para identificar el rango de efectos de una modificación. Dichos ensayos se conocen en la técnica y se describen posteriormente. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento también incluyen polipéptidos de FVII que se modifican adicionalmente por la maquinaria celular e incluyen, por ejemplo, polipéptidos glucosilados,  $\gamma$ -carboxilados y  $\beta$ -hidroxilados.

Las modificaciones proporcionadas en el presente documento pueden realizarse por técnicas de ADN recombinante convencionales tales como las rutinarias para un experto en la materia. Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para efectuar mutación de uno cualquiera o más aminoácidos en una proteína diana. Los métodos incluyen mutagénesis dirigida convencional (usando por ejemplo un kit, tal como un kit tal como QuikChange disponible de Stratagene) de moléculas de ácido nucleico codificantes, o por métodos de síntesis de polipéptidos de fase sólida. Además, pueden generarse proteínas quiméricas modificadas proporcionadas en el presente documento (es decir intercambio de dominio Gla) por técnicas de ADN recombinante rutinarias. Por ejemplo, pueden generarse polipéptidos quiméricos usando enzimas de restricción y metodologías de clonación para subclonación rutinaria de los componentes polipeptídicos quiméricos deseados.

Otras modificaciones que están o no están en la secuencia primaria del polipéptido también pueden incluirse en un polipéptido de FVII modificado, o conjugado del mismo, incluyendo, pero sin limitación, la adición de un resto de carbohidrato, la adición de un resto de polietilenglicol (PEG), la adición de un dominio Fc, etc. Por ejemplo, dichas modificaciones adicionales pueden realizarse para aumentar la estabilidad o semivida de la proteína.

Los polipéptidos de FVII modificados resultantes incluyen los que son polipéptidos de zimógenos monocatenarios o



los que son polipéptidos de tipo zimógeno bicatenarios. Por ejemplo, cualquier polipéptido modificado proporcionado en el presente documento que es un polipéptido monocatenario puede autoactivarse o activarse por otros factores de coagulación para generar un FVII modificado que es una forma bicatenaria (es decir FVIIa). Las actividades de un polipéptido de FVII modificado se muestran típicamente en su forma de dos cadenas.

5 Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden mostrar resistencia a AT-III aumentada, actividad catalítica aumentada en presencia y/o ausencia de FT, resistencia aumentada a los efectos inhibidores de  $Zn^{2+}$ , resistencia a IRFT aumentada, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como semivida en suero aumentada, glucosilación alterada, unión y/o afinidad aumentada con fosfolípidos, unión y/o afinidad  
10 aumentada con albúmina de suero, y/o unión y/o afinidad aumentada con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Típicamente, dichas propiedades y/o actividades de los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento se realizan conservando al mismo tiempo otras actividades o propiedades de FVII, tales como, pero sin limitación, unión con FT y/o unión y activación de FX. Por lo tanto, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento conservan la unión a FT y/o unión y activación de FX en comparación con una forma de tipo silvestre o de partida del polipéptido de FVII. Típicamente, dicha actividad está sustancialmente  
15 sin cambios (menos del 1 %, 5 % o 10 % de cambio) en comparación con una proteína de tipo silvestre o de partida. En otros ejemplos, la actividad de un polipéptido de FVII modificado está aumentada o reducida en comparación con un polipéptido de FVII de tipo silvestre o de partida. La actividad puede evaluarse *in vitro* o *in vivo* y puede compararse con el polipéptido de FVII no modificado, tal como, por ejemplo, el polipéptido de FVII maduro, nativo de tipo silvestre (SEQ ID NO: 3), el polipéptido de FVII precursor de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1 o 2) o cualquier otro polipéptido de FVII conocido por un experto en la materia que se usa como material de partida.

Por lo tanto, en virtud de las modificaciones proporcionadas en el presente documento, los polipéptidos de FVII modificados pueden mostrar actividad coagulante aumentada, duración de la actividad coagulante aumentada, y/o un índice terapéutico potenciado. Esto puede observarse de una manera dependiente de FT y/o independiente de FT. Típicamente, la actividad coagulante aumentada, duración de la actividad coagulante aumentada y/o un índice terapéutico potenciado de los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden observarse *in vitro* o *ex vivo* en ensayos apropiados, o *in vivo*, tal como tras la administración a un sujeto, tal como un sujeto humano o no humano. La actividad aumentada de los polipéptidos de FVII modificados puede aumentarse  
30 en al menos o aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la actividad del polipéptido de FVIIa de partida o no modificado.

### 35 1. Actividad catalítica aumentada

FVII contiene un resto de serina (posición 195 en la numeración de quimotripsina (quimotripsinógeno) convencional) en su centro activo que actúa como un nucleófilo durante la reacción de escisión. La triada catalítica de serina proteasas también incluye dos restos adicionales: H57 y D102 (numeración de quimotripsina). La triada catalítica de FVIIa humano corresponde a H193, D242 y S344 del polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3. Estos tres aminoácidos clave desempeñan cada uno un papel esencial en la actividad catalítica de las proteasas. Las serina proteasas hidrolizan enlaces peptídicos mediante la formación de estados de transición tetraédricos e intermedios de acil-enzima. La ruta de reacción comienza con unión no covalente del sustrato en un surco en la superficie de la proteasa (es decir, la hendidura del sitio activo) que contiene H57 y S195 para formar un "complejo de Michaelis-Menten". El progreso productivo a lo largo de la ruta de reacción requiere posterior ataque nucleófilo de un resto de carbonilo P1 del sustrato por el O-gamma de la serina del sitio activo (es decir, serina 195) de la enzima para formar un estado de transición tetraédrico que se convierte rápidamente en un intermedio de acil-enzima. Una estructura dentro de la hendidura del sitio activo que incluye los restos glicina 193 y serina 195 (correspondientes a G342 y S344 del polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) y se conoce como el orificio de oxianión promueve la catálisis eficaz estabilizando el estado de transición. Específicamente, los hidrógenos de amida de cadena principal de estos dos restos forman enlaces de hidrógeno estabilizantes con el oxianión (es decir, el oxígeno carbonilo del resto P1) que se crea en el estado de transición tetraédrico. Además de esta estabilización, la unión del sustrato dentro del orificio de oxianión sitúa el enlace escindible apropiadamente para las reacciones de acilación y desacilación productivas que dan como resultado escisión del enlace. La importancia del orificio de oxianión en la actividad de FVII se destaca por la observación de que las mutaciones en la posición de aminoácido  
50 342 (correspondiente a 193 por numeración de quimotripsina) puede dar como resultado deficiencia del FVII (véase por ejemplo Bernardi *et al.*, (1994) Br. J. Haematol. 86: 610-618 y Bernardi *et al.*, (1996) Human Mut. 8: 108-115).

#### 60 a. Modificaciones ejemplares para aumentar la actividad catalítica

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que muestran actividad coagulante aumentada. Dichos polipéptidos de FVII pueden generarse por sustitución de aminoácidos de uno o más restos que pueden afectar a la conformación del orificio de oxianión. La introducción de diferentes restos de aminoácidos en posiciones particulares (por ejemplo, la posición 143 por numeración de quimotripsina o 286 por numeración de FVII maduro) puede alterar la conformación del polipéptido de FVII modificado de modo que el orificio de oxianión es más eficaz durante la catálisis. Esto puede dar como resultado un polipéptido de FVII modificado con actividad catalítica aumentada en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. Los cambios en la actividad catalítica debido  
65

a mutaciones que afectan al orificio de oxianión pueden manifestarse como actividad coagulante aumentada. Los aumentos en la actividad catalítica y coagulante de los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden observarse en presencia y/o ausencia de factor tisular (es decir pueden ser dependientes de FT y/o independientes de FT). Por lo tanto, cuando se evalúe en un ensayo *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* apropiado tal como después de la administración a un sujeto como un producto terapéutico procoagulante, los polipéptidos de FVII modificados pueden presentar actividad coagulante aumentada en comparación con la de los polipéptidos de FVII no modificados.

La conformación del orificio de oxianión puede alterarse para inducir una conformación más eficaz por modificación de uno o más restos de aminoácidos que están implicados en la formación de, o están próximos a, el orificio de oxianión. Como se proporciona en el presente documento, un ejemplo de dichos restos de aminoácidos es Q286 (numeración correspondiente a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3), que corresponde a Q143 por numeración de quimotripsina. Q286 puede modificarse, por ejemplo, por sustitución, delección o inserción de aminoácidos. Cuando la modificación se efectúa por sustitución de aminoácidos, el resto de glutamina en la posición 286 puede reemplazarse con cualquier otro resto de aminoácido.

Q286 se localiza adyacente a y en contacto con restos que forman regiones del sitio activo y la hendidura del sitio activo del polipéptido de FVII. Como tal, se ha indicado que la modificación en esta posición daría como resultado actividad catalítica reducida (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 6806063). Esto se ha demostrado en estudios previos (véase, por ejemplo, Publicación de Patente Internacional n.º WO2007031559), donde el resto de glutamina se reemplazó con una alanina (Q286A). El polipéptido de FVIIa modificado resultante muestra una capacidad reducida para activar el Factor X en comparación con el polipéptido de tipo silvestre. En otros estudios, la misma mutación esencialmente no tuvo ningún efecto en la actividad catalítica del mutante de FVIIa para el Factor X (Dickinson *et al.*, (1996) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93: 14379-14384) o un sustrato sintético (Publicación de Patente Internacional n.º WO2007031559).

Como se demuestra en el presente documento (véase Ejemplo 4 y posterior), sin embargo, la modificación del polipéptido de FVII en la posición 286 (numeración correspondiente a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3; correspondiente a la posición 143 por numeración de quimotripsina), particularmente con un resto básico, tal como arginina (Arg, R), da como resultado un polipéptido de FVII modificado con actividad catalítica y coagulante aumentada.

Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen un reemplazo de aminoácidos en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 286 de un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3 (posición de aminoácido 143 por numeración de quimotripsina). La modificación proporcionada en el presente documento en la posición de aminoácido 286 puede realizarse en cualquier polipéptido de FVII, incluyendo un polipéptido de FVII precursor expuesto en SEQ ID NO: 1 o 2, un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3, o cualquier especie, variante alélicas o modificadas y fragmentos activos del mismo, que tiene 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de los polipéptidos de FVII expuestos en SEQ ID NO: 1-3.

La modificación de un polipéptido de FVII en la posición de aminoácido 286 por numeración de FVII maduro (correspondiente al aminoácido 143 por numeración de quimotripsina) puede alterar la conformación del orificio de oxianión a una conformación que facilita la catálisis más eficaz de un sustrato. La actividad catalítica aumentada de dichos polipéptidos de FVII modificados pueden mostrarse en presencia y/o ausencia de factor tisular, y puede evaluarse usando ensayos *in vitro* tales como los descritos en los Ejemplos 4 y 7, posteriores. Además de mostrar actividad catalítica aumentada, los polipéptidos de FVII que se han modificado en la posición de aminoácido 286 por numeración de FVII maduro también pueden mostrar resistencia aumentada a AT-III. Esto puede deberse a, por ejemplo, unión reducida del polipéptido de FVII modificado con AT-III en condiciones específicas (por ejemplo, después de inyección en un paciente) o una tasa reducida de inactivación por AT-III (es decir, una constante de velocidad de segundo orden reducida para inhibición), que puede manifestarse como actividad coagulante aumentada en presencia de AT-III en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. La resistencia aumentada a AT-III puede evaluarse usando ensayos *in vitro* tales como el descrito en el Ejemplo 5.

El resto de aminoácido Q286 por numeración de FVII maduro (correspondiente a Q143 por numeración de quimotripsina) puede modificarse por delección de aminoácidos o reemplazo o sustitución con cualquier otro aminoácido. Como alternativa, un aminoácido puede insertarse inmediatamente antes o después para alterar la conformación en las cercanías del resto de aminoácidos Q286. Además, un polipéptido de FVII que contiene una modificación de Q286 también puede contener una o más modificaciones adicionales, incluyendo inserciones, delecciones, sustituciones o reemplazos de aminoácidos, y modificaciones que no están en la secuencia primaria del polipéptido, tales como la adición de un resto de carbohidrato, la adición de un resto de polietilenglicol (PEG), la adición de un dominio Fc, etc., o cualquier combinación de los mismos. Por lo tanto, un polipéptido de FVII que contiene una modificación en la posición de aminoácido 286 por numeración de FVII maduro puede contener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más posiciones modificadas. Dichos polipéptidos conservan al menos una actividad de un polipéptido de FVII no modificado. Típicamente, el polipéptido de FVII

modificado muestra actividad coagulante aumentada.

Estos cambios en las actividades pueden manifestarse como actividad coagulante aumentada, duración de la actividad coagulante aumentada, aparición de beneficio terapéutico aumentado, aparición de actividad coagulante aumentada y/o un índice terapéutico potenciado. Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen una modificación en la posición de aminoácido 286 por numeración de FVII maduro que muestran actividad de coagulación aumentada en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. Dichos polipéptidos de FVII modificados pueden usarse en el tratamiento de trastornos o acontecimientos de sangrado, tales como hemofilia, cirugía, traumatismo y lesión, donde los polipéptidos de FVII pueden actuar para promover la coagulación sanguínea. Debido a una actividad coagulante aumentada, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento que contienen una modificación en la posición de aminoácido 286 por numeración de FVII maduro ofrecen ventajas sobre el tratamiento con un polipéptido de FVII de tipo silvestre, tal como Factor VII NovoSeven®, incluyendo una reducción en la cantidad de FVII administrado que se requiere para mantener una concentración suficiente de FVII activo en el suero para hemostasia. Esto puede conducir, por ejemplo, a dosis y/o frecuencia de dosificación menores necesarios para conseguir efectos biológicos comparables, aparición más rápida del beneficio terapéutico, duración de acción más larga, mayor comodidad y aceptación por los sujetos y/o atenuación de los efectos secundarios no deseados.

#### i. Sustituciones de aminoácidos básicos en la posición 286

Se proporcionan polipéptidos de FVII modificados en los que la glutamina en la posición 286 (numeración correspondiente al polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3; correspondiente a la posición 143 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con arginina (Arg, R), (es decir Q286R, correspondiente a Q143R por numeración de quimotripsina). Los estudios de modelización indican que la sustitución de la glutamina con una arginina da como resultado la pérdida de dos interacciones clave que estabilizan una conformación inactiva del orificio de oxianión de FVIIa en FVII de tipo silvestre o no modificado. Las interacciones desestabilizantes en el polipéptido de FVII de tipo silvestre o no modificado incluyen la interacción entre la cadena lateral de Q286 (correspondiente a Q143 por numeración de quimotripsina) y la amida de cadena principal de G342 (correspondiente a G193 por numeración de quimotripsina) y la interacción entre el carbonilo de cadena principal de K341 (correspondiente a K1 por numeración de quimotripsina) y la amida de cadena principal de S195 (correspondiente a S344 por numeración de quimotripsina). Sustituyendo la glutamina de tipo silvestre con una arginina en la posición 286, sin embargo, no solamente se pierden estas interacciones, sino que se crean dos interacciones nuevas importantes. Estas incluyen la creación de un enlace salino entre la cadena lateral básica del aminoácido modificado R286 (R143 por numeración de quimotripsina) y la cadena lateral ácida del D289 nativo (D146 por numeración de quimotripsina), y una interacción de la amida de cadena principal del aminoácido modificado R286 y el carbonilo de cadena principal de K341 que estabilizan una conformación activa del polipéptido de FVIIa modificado. Adicionalmente, se espera que el nuevo enlace salino entre los aminoácidos modificados R286 y D289 alteren la conformación y/o flexibilidad del "bucle de autólisis", que forma parte de la hendidura de sitio activo. El bucle de autólisis está implicado en la determinación del sustrato macromolecular y especificidad inhibitoria de proteasas de coagulación. Por lo tanto, una conformación y/o flexibilidad alteradas de este bucle pueden dar como resultado, por ejemplo, actividad catalítica aumentada para el sustrato (por ejemplo factor X y/o factor IX) y resistencia aumentada a inhibidores (por ejemplo IRFT y/o AT-III). Por lo tanto, la modificación de la glutamina en la posición 286 con un aminoácido básico, tal como arginina (Arg, R), puede dar como resultado actividad catalítica y coagulante aumentada en comparación con el polipéptido de FVIII de tipo silvestre. Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII que contienen una mutación Q286R por numeración de FVII maduro (correspondiente a Q143R por numeración de quimotripsina). Un ejemplo de dicho polipéptido es el que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 118.

Puede realizarse reemplazo de aminoácidos de la glutamina (Gln, Q) con una arginina (Arg, R), en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 286 de un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3 en cualquier polipéptido de FVII, incluyendo un polipéptido de FVII precursor con una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 o 2, un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3, o cualquier variante de especie, alélica y modificada, tal como las descritas en la técnica, y fragmentos activos de los mismos, que tiene 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de los polipéptidos de FVII expuestos en SEQ ID NO: 1-3. Por ejemplo, la mutación Q286R puede incorporarse en cualquier polipéptido de FVII modificado descrito en la técnica, incluyendo cualquiera de los descritos en otra parte en el presente documento. Dichos polipéptidos de FVII modificados incluyen, pero sin limitación, un polipéptido de FVII modificado que contiene la mutación o las mutaciones M298Q (SEQ ID NO: 158), véase por ejemplo Persson *et al.*, (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98:13583-13588), E296V/M298Q (SEQ ID NO: 343), V158E (SEQ ID NO: 344), E296R/M298K (SEQ ID NO: 345), K337A (SEQ ID NO: 346), V158D/E296V/M298Q (SEQ ID NO: 98; NN1731; véase por ejemplo, Persson *et al.*, (2007) Art. Thromb. Vasc. Biol. 27(3): 683-689), V158D/E296V/M298Q/K337A (SEQ ID NO: 347; véase por ejemplo Lisman *et al.*, (2003) J. Thromb. Haem. 1:2175-2178), V253N (SEQ ID NO: 348; véase por ejemplo US7427592), T106N (SEQ ID NO: 349; véase por ejemplo US7427592), T106N/V253N (SEQ ID NO: 350; véase por ejemplo US7427592), K143N/N145T (SEQ ID NO: 351; US7442524), R315N/V317T (SEQ ID NO: 352; US7442524) o K143N/N145T/R315N/V317T (SEQ ID NO: 353; US7442524). La mutación Q286R también puede incorporarse en polipéptidos de FVII quiméricos o polipéptidos de

fusión de FVII, o polipéptidos de FVII que están modificados de otro modo, tal como por glucoPEGilación (véase por ejemplo documento WO2007022512, Ghosh *et al.*, (2007) transcript of presentation at the Am. Society. Hematol. Meeting, 10 de diciembre de 2007). En un ejemplo, el reemplazo de aminoácidos de la glutamina con una arginina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 286 de un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3 da como resultado un polipéptido de FVII con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 118.

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen la sustitución de aminoácidos Q286R por numeración de FVII maduro (correspondiente a Q143R por numeración de quimotripsina), donde los polipéptidos de FVII modificados muestran actividad coagulante aumentada. Dichos polipéptidos de FVII modificados pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 posiciones modificadas, donde una de las posiciones modificadas es la posición de aminoácido 286. Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen dos o más modificaciones, donde una modificación es la sustitución de aminoácido Q286R (por numeración de FVII maduro) y el polipéptido de FVII modificado muestra actividad coagulante aumentada en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. La mutación Q286R puede combinarse con cualquier otra mutación descrita en el presente documento o conocida en la técnica. Típicamente, el polipéptido modificado resultante presenta actividad coagulante aumentada. Un experto en la materia puede determinar la actividad coagulante de un polipéptido de FVII que contiene la modificación Q286R usando ensayos *in vitro* e *in vivo* bien conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento incluyen los que contiene la mutación Q286R y también contienen una o más mutaciones que, por ejemplo, aumentan la resistencia a antitrombina III, aumentan la activación de FX, aumentan la activación de FIX, aumentan la unión y/o afinidad con fosfolípidos, aumentan la afinidad por el factor tisular, aumentan la actividad intrínseca, aumentan la actividad dependiente de FT, alteran la conformación del polipéptido para alterar la zimogenicidad, aumentan la actividad catalítica o coagulante, tal como desplazando el equilibrio entre conformaciones de FVIIa altamente activas y menos activas a favor de las conformaciones altamente activas, aumentan la resistencia a proteasas, reducen la glucosilación, aumentan la glucosilación, reducen la inmunogenicidad, aumentan la estabilidad y/o facilitan el enlace de grupos químicos.

La actividad coagulante aumentada de polipéptidos de FVII modificados que contienen la sustitución de aminoácidos Q286R puede ser un resultado de un aumento de la actividad catalítica. La actividad catalítica aumentada puede observarse en presencia y/o ausencia de factor tisular (FT). Por lo tanto, la actividad catalítica aumentada puede ser dependiente de FT y/o independiente de FT. La actividad catalítica de un polipéptido de FVII modificado que contiene la mutación Q286R puede evaluarse usando ensayos *in vitro*, tales como los ensayos descritos en los Ejemplos 4 y 7. Dichos ensayos pueden determinar la actividad catalítica de un polipéptido de FVII modificado para un sustrato, tal como factor X, en presencia o ausencia del factor tisular. Los polipéptidos FVII modificados que contienen las mutaciones Q286R pueden mostrar actividad catalítica aumentada de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en presencia y/o ausencia de factor tisular en comparación con la actividad catalítica del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo* o bien *in vitro*. Por ejemplo, como se demuestra en el Ejemplo 4, un polipéptido de FVIIa que contiene la mutación Q286R (Q143R por numeración de quimotripsina) como la única modificación puede mostrar actividad catalítica para FX en presencia o ausencia de FT que es aproximadamente de dos a cuatro veces mayor que la actividad catalítica mostrada por FVII de tipo silvestre. En otros ejemplos, un polipéptido de FVIIa que contiene las mutaciones Q286R y M298Q puede mostrar actividad catalítica para FX en presencia de FT que es aproximadamente de tres a cuatro veces mayor que la actividad catalítica mostrada por FVII de tipo silvestre, y puede mostrar actividad catalítica para FX en ausencia de FT que es aproximadamente de siete a veintiséis veces mayor que la actividad catalítica mostrada por FVII de tipo silvestre.

Se exponen ejemplos no limitantes de polipéptidos de FVII modificados que contienen dos o más modificaciones, donde una modificación es la sustitución de aminoácido Q286R (por numeración de FVII maduro) y el polipéptido de FVII modificado muestra actividad catalítica aumentada hacia FX en presencia y/o ausencia de factor tisular en comparación con un polipéptido de FVII no modificado, en la Tabla 5 y en el Ejemplo 4, posteriormente. Se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se exponen secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido de FVII modificado. Como se analiza en más detalle en la sección D.6, posteriormente, la modificación "intercambio de Gla FIX" implica la delección del dominio Gla de FVII endógeno suprimiendo los restos de aminoácidos A1 a Y44 (restos correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) e inserción de 45 restos de aminoácidos que corresponden a los restos de aminoácidos Y1 a Y45 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83. En algunos ejemplos, el dominio Gla de FIX heterólogo en el polipéptido de FVII modificado por "intercambio de Gla FIX" contiene una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes a M19, E40, K43 y/o Q44 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83. Dichas sustituciones se indican por llaves (por ejemplo {intercambio de Gla FIX/Q44S}). En ejemplos en los que una posición de aminoácido modificada no tiene un número de quimotripsina correspondiente (es decir no está dentro de las posiciones de aminoácidos 153 a 406 correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3, y no está expuesto en la Tabla 1, anterior), la posición se indica entre corchetes usando numeración de FVII maduro. Por ejemplo, T158N no tiene un número de quimotripsina correspondiente y se expone como T[158]N cuando se hace referencia a la numeración de quimotripsina.

Tabla 5.

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
Intercambio de Gla FIX/Q286R	Intercambio de Gla FIX/Q143R	131
Q286R/H257A	H117A/Q143R	132
S222A/Q286R	S82A/Q143R	133
Q286R/S222A/H257A	S82A/H117A/Q143R	134
Intercambio de Gla FIX/S222A/Q286R	S82A/Intercambio de Gla FIX/Q143R	135
Intercambio de Gla FIX/H257A/Q286R	H117A/Intercambio de Gla FIX/Q143R	136
Intercambio de Gla FIX /S222A/H257A/Q286R	Q143R/S82A/H117A/Intercambio de Gla FIX	137
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	138
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q	139
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE	140
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	150
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	144
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V	145
H257S/Q286R	H117S/Q143R	146
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	147
S222A/H257A/Q286R/Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	148
Q286R/H373A	Q143R/H224A	149
Q286R/K341D	Q143R/K192D	151
Q286R/Q366D	Q143R/Q217D	152
Q286R/Q366N	Q143R/Q217N	153
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	155
Q286R/H373F	Q143R/H224F	156
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	157
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	138
T128N/P129A/Q286R	T[128]N/P[129]A/Q143R	279
Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/S222A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/T[128]N/P[129]A/S82A/Q143R	285
Intercambio de Gla FIX/S52A/S60A/S222A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/ S[52]A/S[60]A/S82A/Q143R	292
Intercambio de Gla FIX/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/Q143R/M156Q	141
T128N/P129A/Q286R/ M298Q	T[128]N/P[129]A/Q 143R/M156Q	280
Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	286
{Intercambio de Gla FIX/E40L}/ Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/E[40]L}/ Q143R/M156Q	274
{Intercambio de Gla FIX/K43I}/ Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/K[43]I}/ Q143R/M156Q	275
{Intercambio de Gla FIX/Q44S}/ Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/Q[44]S}/ Q143R/M156Q	276
{Intercambio de Gla FIX/M19K}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/M[19]K}/ Q143R/M156Q	277
S52A/S60A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q	293
T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/H117A/Q14 3R/M156Q	287

ES 2 577 055 T3

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H117A/Q143R /M156Q	298
T128N/P129A/Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H224F	281
S52A/S60A/ Q286R/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/H224F	296
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/H 224F	288
S52A/S60A/Q286R/M298Q/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q/H22 4F	297
V21D/Q143R/E154V/M156Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	282
Intercambio de Gla FIX /S222A/T239V/Q286R	Intercambio de Gla FIX /S82A/T99V/Q143R	301
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	302
Intercambio de Gla FIX/ T239V/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/ T99V/Q143R/M156Q	304
S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q	303
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	305
T239V/Q286R/M298Q/H373F	T99V/Q143R/M156Q/H224F	306
T239I/Q286R	T99I/Q143R	308
Intercambio de Gla FIX/S222A/T239I/Q286R	Intercambio de Gla FIX /S82A/T99I/Q143R	310
T239I/Q286R/M298Q	T99I/Q143R/M156Q	311
Intercambio de Gla FIX /T239I/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX /T99I/Q143R/M156Q	313
S222A/T239I/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99I/H117A/Q143R/M156Q	312
T239I/Q286R/H373F	T99I/Q143R/H224F	314
T239V/Q286R	T99V/Q143R	299
T239I/Q286R/M298Q/ H373F	T99I/Q143R/M156Q/H224F	315
H257S/Q286R/M298Q	H117S/Q143R/M156Q	322
Intercambio de Gla FIX /Q286R/S222A/H257S	Intercambio de Gla FIX/Q4143R/S82A/H117S	321
S222A/H257S/Q286R/M298Q	S82A/H117S/Q143R/M156Q	324
H257S/Q286R/M298Q/ H373F	H117S/Q143R/M156Q/H224F	325
S222A/Q286R/M298Q/ H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	326
Intercambio de Gla FIX/S222A/Q286R/M298Q/H373F	Intercambio de Gla FIX S82A/Q143R/M156Q/H224F	318
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	328
Intercambio de Gla FIX/S222A/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX S82A/Q143R/M156Q	317
Intercambio de Gla FIX/ S222A/Q286R/H373F	Intercambio de Gla FIX/S82A/Q143R/H224F	316
H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	321
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M15 6Q	337
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M1 56Q	338
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/ M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/H117 A/Q143R/M156Q	339
A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/Q286R/ M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/H117 A/Q143R/M156Q	340
T128N/P129A/A75S/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M15 6Q/H224F	341
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M1 56Q/H224F	342

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F	V21D/Q143R/E154V/M156Q/H224 F	320
{Intercambio de Gla FIX /K43I}/T128N/P129A/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX /K[43I]}/T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	355
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q 217N	356
{Intercambio de Gla FIX /K43I}/Q286R/M298Q/Q366N	{Intercambio de Gla FIX /K[43I]}/Q143R/M156QQ217N	357
{Intercambio de Gla FIX/K43I}/T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N	{Intercambio de Gla FIX /K[43I]}/T[128]N/P[129]A/Q143R/M156QQ2 17N	358
V 158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	360
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q 217N/H224F	364
T239V/Q286R/M298Q/Q366N	T99V/Q143R/M156Q/Q217N	365
T239T/Q286R/M298Q/Q366N	T99I/Q143R/M156Q/Q217N	366
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M1 56Q	367
T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/T99V/H117 A/Q143R/M156Q	368
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M1 56Q/H224F	369
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M15 6Q	370
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M15 6Q/H224F	371

Un polipéptido de FVII que contiene la mutación Q286R por numeración de FVII maduro también puede mostrar resistencia aumentada a AT-III. La resistencia aumentada a AT-III puede ser el resultado de una tasa de inhibición reducida por AT-III o unión reducida a AT-III en condiciones específicas, tal como después de la inyección en un animal o paciente. La resistencia a AT-III puede demostrarse midiendo la constante de velocidad de segundo orden para inhibición de polipéptidos de FVIIa de tipo silvestre y variantes. Otros métodos *in vitro*, tales como ensayos de BIAcore®, también pueden usarse. Los polipéptidos de FVII modificados pueden mostrar resistencia aumentada a los efectos inhibidores de AT-III en comparación con un polipéptido de FVII no modificado, que puede evaluarse en ensayos *in vitro* tales como los descritos en el Ejemplo 5. Los polipéptidos de FVII modificados que contienen las mutaciones Q286R pueden mostrar resistencia aumentada a AT-III de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la resistencia a AT-III de polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo* o bien *in vitro*. Por ejemplo, como se demuestra en el Ejemplo 5 posterior, un polipéptido de FVIIa que contiene la mutación Q286R (Q143R por numeración de quimotripsina) puede mostrar actividad catalítica para FX en presencia de AT-III y ausencia de FT que es de dos a cuatro veces o más mayor que la actividad catalítica mostrada por FVII de tipo silvestre. Por lo tanto, el polipéptido de FVII Q286R modificado puede mostrar un aumento en la resistencia a AT-III de aproximadamente 200 % a 400 % de la de un polipéptido de FVII no modificado.

La actividad catalítica aumentada y resistencia aumentada a AT-III pueden manifestarse como actividad coagulante aumentada en presencia y/o ausencia de FT. Dichas actividades pueden evaluarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, tal como mediante administración a un sujeto humano o animal. La actividad de coagulación de los polipéptidos de FVII modificados que contienen la mutación Q286R puede aumentarse en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la actividad de coagulación de polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo* o bien *in vitro*. Por ejemplo, el Ejemplo 6.B.2 demuestra que un polipéptido de FVIIa que contiene la mutación Q286R (Q143R por numeración de quimotripsina) muestra actividad de coagulación en un modelo de sangrado de ratón que es mayor (aproximadamente 2 veces) que la actividad de coagulación mostrada por un polipéptido de FVII de tipo silvestre (por ejemplo FVII NovoSeven®). El polipéptido de FVIIa que contiene las mutaciones Q286R y M298Q (Q143R y M156Q, respectivamente, por numeración de quimotripsina) muestra actividad de coagulación aún mayor.

## ii. Otras mutaciones en la posición 286

Como se describe en el presente documento, la glutamina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 286 del polipéptido de FVII expuesto en SEQ ID NO: 3 puede reemplazarse con un aminoácido distinto de un aminoácido básico (es decir distinto de arginina, histidina o lisina). Dichas sustituciones pueden alterar la conformación del orificio de oxianión, por ejemplo, dando como resultado una conformación que aumenta la actividad catalítica del polipéptido de FVII modificado en comparación con un polipéptido de FVII de tipo silvestre.

Los polipéptidos de FVII modificados que tienen una conformación de orificio oxianión alterado pueden mostrar actividad catalítica aumentada de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la actividad catalítica del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre cuando se miden usando ensayos *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro*.

La Tabla 6 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares en Q286 distintos de reemplazo con arginina, correspondientes a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido de FVII maduro como se expone en SEQ ID NO: 3. Como se observa, dichos polipéptidos de FVII se diseñan para cambiar la conformación del orificio de oxianión a una conformación más eficaz, y por lo tanto tienen actividad coagulante aumentada. En referencia a dichas mutaciones, el primer aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido que se reemplaza, el número corresponde a la posición en la secuencia del polipéptido de FVII maduro con referencia a SEQ ID NO: 3, y el segundo aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido seleccionado que reemplaza el primer aminoácido en esa posición. Las posiciones de aminoácidos para mutación también se denominan por el esquema de numeración de quimotripsina. En la Tabla 6 posterior, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se exponen las secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido de FVII modificado.

Tabla 6.

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
Q286N	Q143N	113
Q286E	Q143E	114
Q286D	Q143D	115
Q286S	Q143S	116
Q286T	Q143T	117
Q286A	Q143A	120
Q286V	Q143V	121
Q286M	Q143M	122
Q286L	Q143L	123
Q286Y	Q143Y	124
Q286G	Q143G	125
Q286F	Q143F	126
Q286I	Q143I	127
Q286P	Q143P	128
Q286W	Q143W	130

Los polipéptidos de FVII modificados que tienen una conformación de orificio de oxianión alterado pueden mostrar actividad catalítica aumentada de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con actividad catalítica del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre cuando se mide usando ensayos *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. En algunos ejemplos, los polipéptidos de FVII modificados que tienen una conformación de orificio de oxianión alterado también pueden mostrar resistencia aumentada a inhibidores de proteasa endógena (es decir, tasa reducida de inhibición por o afinidad reducida para inhibidores) tales como IRFT o AT-III en aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la tasa de inhibición por o afinidad por inhibidores endógenos mostrada por polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo*, bien *ex vivo* o bien *in vitro*. La actividad catalítica y/o resistencia aumentada a inhibidores endógenos tales como resistencia a AT-III de dichos polipéptidos de FVII modificados también puede manifestarse como actividad de coagulación aumentada, duración de la actividad coagulante, inicio de la actividad coagulante más rápido y/o índice terapéutico potenciado. Por ejemplo, la actividad de coagulación de los polipéptidos de FVII modificados puede aumentarse en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo*, bien *ex vivo* o bien *in vitro*.



## 2. Resistencia aumentada a AT-III

La antitrombina III (también conocida como antitrombina o AT-III) es una serpina anticoagulante importante (inhibidor de serina proteasa). AT-III se sintetiza como una proteína precursora que contiene 464 restos de aminoácidos (SEQ ID NO: 122). Durante el transcurso de la secreción se escinde un péptido señal de 32 restos para generar una antitrombina humana madura de 432 aminoácidos (SEQ ID NO: 123). La glucoproteína de AT-III de 58 kDa circula en la sangre y actúa como un inhibidor de serina proteasa (serpina) para inhibir un gran número de serina proteasas del sistema de coagulación. Las principales dianas de AT-III son trombina y el factor Xa, aunque también se ha mostrado que AT-III inhibe las actividades de FIXa, FXIa, FXIIa y, en menor grado, FVIIa. La acción de AT-III está potenciada en gran medida por glucosaminoglucanos, tales como el heparán sulfato de origen natural o las diversas heparinas derivadas de tejido que se usan ampliamente como anticoagulantes en la práctica clínica. AT-III se une de una manera altamente específica con una secuencia de pentasacárido única en heparina que induce un cambio conformacional en el bucle de centro reactivo. En dicha conformación, el bucle de centro reactivo de AT-III puede interactuar más eficazmente con el sitio reactivo de la serina proteasa, y efectuar inhibición.

AT-III no es normalmente inhibidora para FVIIa en plasma libre, incluso en presencia de heparina, probablemente debido a la conformación de tipo zimógeno de FVIIa que evita la interacción eficaz con AT-III. Los efectos inhibidores de AT-III aumentan, sin embargo, una vez que FVIIa forma complejo con FT. La unión de AT-III con el complejo de FT/FVIIa puede liberar FVIIa de FT y lo mantiene en un complejo inactivo con AT-III. La afinidad aumentada de AT-III por FVIIa unido a FT en comparación con FVIIa solo supuestamente refleja la maduración del sitio activo de FVIIa cuando está en complejo con FT, haciéndolo por lo tanto susceptible de unión con AT-III (Rao *et al.* (1993) Blood 81: 2600-2607). Por lo tanto, la influencia de AT-III en FVIIa es proporcional a la actividad intrínseca de la molécula de FVIIa en sí misma, a no ser que se hayan añadido mutaciones al polipéptido de FVIIa que medien en la resistencia a AT-III. Aunque FVIIa conserva su conformación de tipo zimógeno, AT-III tiene poco efecto. Si, sin embargo, FVIIa cambia su conformación a una forma más activa, tal como por unión con FT, o por modificaciones *in vitro* específicas, la inhibición de AT-III aumenta significativamente. Los polipéptidos de FVIIa que se modifican para tener actividad intrínseca aumentada presentan con frecuencia aumentos simultáneos en la susceptibilidad a inhibición de AT-III. Por ejemplo, la modificación de uno o más aminoácidos en el bolsillo de activación de FVIIa, tal como mediante reemplazos de aminoácidos correspondientes a sustituciones K337A, L305V, M298Q, V158D y E296V (en relación con la secuencia de FVII madura expuesta en SEQ ID NO: 3), da como resultado sensibilidad aumentada del polipéptido de FVIIa a AT-III, inhibiendo de este modo la actividad de FVIIa en hasta 90 % (Persson *et al.* (2001) PNAS 98: 13583-13588). En otro ejemplo, la inducción de una conformación más de tipo zimógeno por modificación de aminoácidos implicados en la hélice  $\alpha$  de FVIIa, aunque aumenta la actividad de la proteína FVIIa modificada, también aumenta su susceptibilidad a AT-III (Persson *et al.* (2004) Biochem J 379: 497-503).

### Modificaciones ejemplares para efectuar resistencia aumentada a AT-III

Pueden realizarse modificaciones a un polipéptido de FVII que aumenta su resistencia a AT-III. En general, dichos polipéptidos de FVII modificados conservan al menos una actividad de un polipéptido de FVII. Típicamente, dichas modificaciones incluyen una o más sustituciones de aminoácidos en cualquier posición del polipéptido de FVII que están implicadas en la interacción de FVIIa con AT-III. Dichas modificaciones pueden, por ejemplo, dar como resultado unión reducida del FVII modificado a AT-III. Los polipéptidos de FVII modificados son por lo tanto resistentes a los efectos inhibidores de forma natural de AT-III con respecto al inicio de la coagulación. Cuando se evalúan en un ensayo *in vitro* apropiado, o *in vivo*, tal como después de la administración a un sujeto como un producto terapéutico procoagulante, los polipéptidos de FVII resistentes a AT-III modificados presentan actividad coagulante aumentada en comparación con polipéptidos de FVII no modificados.

Como se describe posteriormente en el presente documento, un experto en la materia puede diseñar empírica o racionalmente polipéptidos de FVII modificados que presentan resistencia aumentada a AT-III. Dichos polipéptidos de FVII modificados pueden ensayarse en ensayos conocidos por un experto en la materia para determinar si dichos polipéptidos de FVII modificados presentan resistencia aumentada a AT-III. Por ejemplo, dichos polipéptidos de AT-III modificados pueden ensayarse con respecto a unión con AT-III. En general, un polipéptido de FVII modificado que tiene resistencia aumentada a AT-III mostrará unión reducida y/o afinidad reducida con AT-III. Típicamente, dichos ensayos se realizan en una forma bicatenaria de FVII, tal como la forma activada de FVII (FVIIa). Además, se realizan en general ensayos para determinar los efectos de AT-III en presencia de heparina y en presencia de factor tisular, aunque dichos ensayos también pueden realizarse en ausencia de uno o ambos cofactores.

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que muestran resistencia aumentada a AT-III. La resistencia a inhibición por AT-III es relevante tanto en presencia como en ausencia de FT. Se han modificado variantes de polipéptidos de FVII proporcionadas en el presente documento en una o más de las posiciones de aminoácidos 239, 931, 366 y 373 (correspondientes a las posiciones de aminoácidos 99, 170i, 217 y 224, respectivamente, por numeración de quimotripsina). Estos restos de aminoácidos pueden modificarse tal como por reemplazo, delección o sustitución de aminoácidos. Los restos identificados pueden reemplazarse o sustituirse con cualquier otro aminoácido. Como alternativa, pueden usarse inserciones de aminoácidos para alterar la conformación de un resto de aminoácido diana o la estructura proteica en las cercanías de un resto de aminoácido diana.

El resto de aminoácido endógeno puede sustituirse por cualquier resto de aminoácido en las posiciones identificadas. Típicamente, el aminoácido de reemplazo se elige de modo que interfiera con la interacción entre FVII y AT-III. En algunos ejemplos, el resto de treonina en la posición 239 (correspondiente a la posición 99 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con una serina (Ser, S), asparagina (Asn, N), glutamina (Gln, Q), valina (Val, V), leucina (Leu, L), histidina (His, H), o isoleucina (Ile, I). En otros ejemplos, la prolina en la posición 321 (correspondiente a la posición 170i por numeración de quimotripsina) se reemplaza con una lisina (Lys, K), ácido glutámico (Glu, E), serina (Ser, S), o tirosina (Tyr, Y). En ejemplos adicionales, la glutamina en la posición 366 (correspondiente a la posición 217 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con una asparagina (Asn, N), ácido aspártico (Asp, D), ácido glutámico (Glu, E), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), lisina (Lys, K), o valina (Val, V). En otros ejemplos, la histidina en la posición 373 (correspondiente a la posición 224 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con un ácido aspártico (Asp, D), ácido glutámico (Glu, E), serina (Ser, S), fenilalanina (Phe, F) o alanina (Ala, A). En un ejemplo adicional, pueden generarse mutantes de combinación. Se incluyen entre dichos mutantes de combinación los que tienen dos o más mutaciones de los restos T239, P321, Q366 y H373 (correspondientes a T99, P170i, Q217 y H224, respectivamente, por numeración de quimotripsina). Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado puede poseer sustituciones de aminoácidos en 2, 3, 4 o 5 de las posiciones identificadas. Por lo tanto, un polipéptido modificado puede presentar 1, 2, 3, 4 o 5 mutaciones que pueden dar como resultado resistencia aumentada del polipéptido de FVII modificado a los efectos inhibidores de AT-III. Por ejemplo, un polipéptido de FVII puede modificarse en la posición de aminoácido 366 y la posición de aminoácidos 373. En algunos ejemplos, las posiciones se modifican por reemplazo de aminoácidos, tal como, por ejemplo, reemplazo de la glutamina en la posición 366 con un ácido aspártico, y reemplazo de la histidina en la posición 373 con un ácido glutámico.

La Tabla 7 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares en los restos identificados, correspondientes a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido de FVII maduro como se expone en SEQ ID NO: 3. Se incluyen entre estas mutaciones de combinación ejemplares. Como se observa, dichos polipéptidos de FVII se diseñan para aumentar la resistencia a AT-III y por lo tanto tienen actividad coagulante aumentada. En referencia a dichas mutaciones, el primer aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido que se reemplaza, el número corresponde a la posición en la secuencia del polipéptido de FVII maduro con referencia a SEQ ID NO: 3, y el segundo aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido seleccionado que reemplaza el primer aminoácido en esa posición. Las posiciones de aminoácidos para mutación también se denominan por el esquema de numeración de quimotripsina. En la Tabla 7 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se exponen secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido de FVII modificado.

35

**Tabla 7.**

<b>Modificación - numeración de FVII maduro</b>	<b>Modificación - numeración de quimotripsina</b>	<b>SEQ ID NO</b>
T239S	T99S	159
T239N	T99N	160
T239Q	T99Q	161
T239V	T99V	162
T239L	T99L	163
T239H	T99H	164
T239I	T99I	165
P321K	P170iK	166
P321E	P170iE	167
P321Y	P170iY	168
P321S	P170iS	169
Q366D	Q217D	170
Q366E	Q217E	171
Q366N	Q217N	172
Q366T	Q217T	173
Q366S	Q217S	174

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
Q366V	Q217V	175
Q366I	Q217I	176
Q366L	Q217L	177
Q366M	Q217M	178
H373D	H224D	179
H373E	H224E	180
H373S	H224S	181
H373F	H224F	182
H373A	H224A	183
Q366D/H373E	Q217D/H224E	184
Q366V/H373V	Q217V/H224V	185
Q366V/H373L	Q217V/H224L	186
Q366V/H373I	Q217V/H224I	187

Los polipéptidos de FVII modificados que tienen resistencia aumentada para AT-III pueden mostrar una reducción en el grado de inhibición en condiciones específicas o en la constante de velocidad de segundo orden para inhibición por AT-III en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más en comparación con el grado de inhibición o la constante de velocidad de segundo orden para la inhibición de polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo* o bien *in vitro*. Por lo tanto, los polipéptidos de FVII modificados pueden mostrar resistencia aumentada a AT-III que es al menos o aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más de la resistencia mostrada por un polipéptido de FVII no modificado. La resistencia aumentada a AT-III por dichos polipéptidos de FVII modificados también puede manifestarse como actividad de coagulación aumentada, duración de la actividad de coagulación y/o índice terapéutico potenciado en presencia de AT-III. La actividad de coagulación de los polipéptidos de FVII modificados para AT-III puede aumentarse en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo* o bien *in vitro*.

### 3. Resistencia aumentada a la inhibición por Zn<sup>2+</sup>

La actividad amidolítica de FVIIa está regulada por alteraciones alostéricas inducidas por unión de iones de calcio y factor tisular (FT). FVII libre existe típicamente en una conformación inactiva. La unión con Ca<sup>2+</sup> y FT induce un cambio en la conformación y actividad amidolítica aumentada (Pederson *et al.*, (1990) J Biol. Chem. 265: 16786-16793). Por el contrario, se ha mostrado que la unión de iones de cinc con FVIIa tiene un efecto inhibitor en la actividad. La unión de Zn<sup>2+</sup> con FVIIa da como resultado actividad amidolítica reducida y afinidad reducida para FT. Los estudios indican que Ca<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> compiten por la unión con FVIIa, de modo que en presencia de Ca<sup>2+</sup>, el efecto inhibitor de Zn<sup>2+</sup> se reduce. Además, FVIIa unido a FT es menos susceptible de inhibición por cinc.

Además de los sitios de unión a Zn<sup>2+</sup> en el dominio Gla, cuya unión no afecta a la actividad amidolítica de FVIIa, se han mapeado dos sitios de unión a Zn<sup>2+</sup> en el dominio proteasa de FVII (Petersen *et al.*, (2000) Protein Sci. 9: 859-866, Bajaj *et al.*, (2006) J. Biol. Chem. 281: 24873-24888). El mapeo de estos sitios de unión en el dominio de proteasa indica que el primer sitio de unión a Zn<sup>2+</sup> implica las cadenas laterales de restos de aminoácidos H216, E220 y S222 (H76, E80 y S82 por numeración de quimotripsina), y el segundo sitio de unión a Zn<sup>2+</sup> implica las cadenas laterales de los restos de aminoácidos H257, D219 y K161 (H117, D79 y K24 por numeración de quimotripsina).

Zn<sup>2+</sup> podría, por lo tanto, tener un papel fisiológico en la regulación de homeostasis como un inhibidor de FVII. Se ha postulado que estos efectos inhibitorios aparecen como resultado de un aumento en la concentración de Zn<sup>2+</sup> en el sitio del coágulo después de la activación de plaquetas (Bajaj *et al.*, (2006) J. Biol. Chem. 281: 24873-24888). Las plaquetas se almacenan en grandes cantidades de Zn<sup>2+</sup> en el citoplasma y gránulos  $\alpha$ , que se liberan tras la activación de plaquetas. Esto podría aumentar la concentración local Zn<sup>2+</sup> que a su vez podría inhibir la actividad de FVIIa y unión de FVIIa con FT.

**Modificaciones ejemplares para aumentar la resistencia a inhibición por Zn<sup>2+</sup>**

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que muestran resistencia aumentada a los efectos inhibidores de Zn<sup>2+</sup>. Esto puede conseguirse, por ejemplo, por mutación de uno o más restos en FVII implicados en la interacción y unión con Zn<sup>2+</sup> para reducir o evitar dicha unión, haciendo de este modo a los polipéptidos de FVII modificados resistentes a los efectos inhibidores de Zn<sup>2+</sup> con respecto a la actividad catalítica y unión con FT. Cuando se evalúan en un ensayo *in vitro* apropiado, o *in vivo*, tal como después de la administración a un sujeto como un producto terapéutico procoagulante, los polipéptidos de FVII modificados pueden presentar actividad coagulante aumentada en comparación con polipéptidos de FVII no modificados.

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que tienen una o más mutaciones en restos que pueden estar implicados en la unión con Zn<sup>2+</sup> en el dominio de proteasa. Dichos restos incluyen, pero sin limitación, K161, H216, D219, E220, S222 y H257, con numeración relativa a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3 (correspondiente a K24, H76, D79, E80, S82 y H117, respectivamente, por numeración de quimotripsina). En algunos ejemplos, uno o más de los restos de aminoácidos H216, S222 y H257 (correspondientes a H76, S82 y H117, respectivamente, por numeración de quimotripsina) se modifican, tal como por reemplazo o delección de aminoácidos. Cualquier resto de aminoácido puede usarse para reemplazar el resto endógeno en las posiciones identificadas. Por ejemplo, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados en los que la histidina en la posición de aminoácidos 216 se reemplaza con un resto de serina, alanina, lisina o arginina. En otro ejemplo, la serina en la posición de aminoácido 222 se reemplaza con un resto de alanina o lisina, o la histidina en la posición 257 se reemplaza con un resto de alanina o serina. En un ejemplo adicional, la lisina en la posición 161 se reemplaza con un resto de serina, alanina o valina. Las modificaciones también incluyen inserciones de aminoácidos en o cerca de las posiciones de aminoácidos identificadas como implicadas en la unión con Zn<sup>2+</sup>. Dichas inserciones pueden alterar el sitio de unión a Zn<sup>2+</sup>, dando como resultado un polipéptido de FVII modificado con unión reducida a Zn<sup>2+</sup>.

También pueden generarse mutantes de combinación en los que se realizan reemplazos de aminoácidos en más de uno de los restos anteriormente identificados en un polipéptido de FVII. Entre dichos mutantes de combinación se incluyen los que tienen dos o más mutaciones de los restos K161, H216, D219, E220, S222 y H257 (correspondientes a K24, H76, D79, E80, S82 y H117, respectivamente, por numeración de quimotripsina). Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado puede poseer sustituciones de aminoácidos en 2, 3, 4, 5 o 6 de las posiciones identificadas. Por lo tanto, un polipéptido modificado puede presentar 1, 2, 3, 4, 5 o 6 mutaciones que pueden dar como resultado capacidad reducida del polipéptido de FVII modificado para unirse con Zn<sup>2+</sup>. Por ejemplo, un polipéptido de FVII puede modificarse por reemplazo de aminoácidos de la serina en la posición 222 con una lisina, y la histidina en la posición 257 con un resto de alanina.

Los polipéptidos de FVII modificados que tienen resistencia aumentada a los efectos inhibidores de Zn<sup>2+</sup> pueden mostrar un aumento en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la resistencia del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo* o bien *in vitro*. Una reducción en la unión con Zn<sup>2+</sup> y, por lo tanto, resistencia aumentada contra los efectos inhibidores de Zn<sup>2+</sup>, por dichos polipéptidos de FVII modificados también puede manifestarse como actividad de coagulación aumentada en presencia de Zn<sup>2+</sup>. La actividad de coagulación de los polipéptidos de FVII modificados puede aumentarse en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo* o bien *in vitro*.

La Tabla 8 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares en los restos identificados, correspondientes a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido de FVII maduro como se expone en SEQ ID NO: 3. Se incluyen entre estos mutaciones de combinación ejemplares. Como se ha observado, dichos polipéptidos de FVII se diseñan para mostrar capacidad reducida para unirse con Zn<sup>2+</sup> y, por lo tanto, resistencia aumentada contra los efectos inhibidores de Zn<sup>2+</sup>. Por lo tanto, el polipéptido de FVII modificado puede tener actividad coagulante aumentada. En referencia a dichas mutaciones, el primer aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido que se reemplaza, el número corresponde a la posición en la secuencia del polipéptido de FVII maduro con referencia a SEQ ID NO: 3, y el segundo aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido seleccionado que reemplaza el primer aminoácido en esa posición. Las posiciones de aminoácidos para mutación también se denominan por el esquema de numeración de quimotripsina. En la Tabla 8 posterior, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se exponen secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido de FVII modificado.

**Tabla 8.**

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
K161S	K24S	188
K161A	K24A	189

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
K161V	K24V	190
H216S	H76S	191
H216A	H76A	192
H216K	H76K	193
H216R	H76R	194
S222A	S82A	195
S222K	S82K	196
S222V	S82V	197
S222N	S82N	198
S222E	S82E	199
S222D	S82D	200
H257A	H117A	201
H257S	H117S	202
S222K/H257A	S82K/H117A	203
H216A/H257A	H76A/H117A	204
H216A/S222A	H76A/S82A	205

#### 4. Glucosilación alterada

Las propiedades y actividades de una proteína pueden alterarse modulando el grado, nivel y/o tipo de glucosilación. Por ejemplo, la glucosilación puede aumentar la semivida en suero de polipéptidos aumentando la estabilidad, solubilidad y reduciendo la inmunogenicidad de una proteína. La glucosilación puede aumentar la estabilidad de proteínas reduciendo la proteólisis de la proteína y pueden proteger la proteína de degradación térmica, exposición a agentes desnaturizantes, daño por radicales libres de oxígeno y cambios en el pH. La glucosilación también puede permitir que la proteína diana evada los mecanismos de eliminación que pueden implicar unión con otras proteínas, incluyendo receptores de superficie celular. Los restos de carbohidratos que contienen ácido siálico pueden afectar a la solubilidad de una proteína. Los restos de ácido siálico son altamente hidrófilos y pueden proteger restos hidrófobos de la proteína diana. Esto reduce la agregación y precipitación de la proteína diana. La agregación reducida también ayuda en la prevención de la respuesta inmunitaria contra la proteína diana. Los carbohidratos pueden además proteger secuencias inmunogénicas del sistema inmunitario. El volumen de espacio ocupado por los restos de carbohidratos puede reducir el área de superficie disponible que se vigila por el sistema inmunitario. Estas propiedades conducen a la reducción de inmunogenicidad de la proteína diana.

Los sitios de glucosilación proporcionan un sitio para unión de monosacáridos y oligosacáridos con un polipéptido mediante un enlace glucosídico, de modo que cuando se produce el polipéptido en una célula eucariota con capacidad de glucosilación, está glucosilado. Los dos tipos principales de glucosilación son glucosilación ligada a N, donde las unidades de azúcares se unen mediante el nitrógeno de amida de un resto de asparagina, y glucosilación ligada a O, donde las unidades de azúcares se unen mediante el grupo hidroxilo de restos de serina, treonina, hidroxilisina o hidroxiprolina. Otras formas menores más de enlaces glucosídicos incluyen enlace S con cisteína y enlace C con triptófano. Se produce glucosilación ligada a N en asparaginas en la secuencia consenso -Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys donde Xaa no es prolina. No hay ningún motivo conocido para O-glucosilación, aunque la O-glucosilación es más probable en secuencias con una alta proporción de restos de serina, treonina y prolina. La presencia de un sitio de glucosilación potencial no asegura, sin embargo, que el sitio se glucosile durante el procesamiento postraduccional en el RE. Además, el nivel de glucosilación puede variar en un sitio dado, y un sitio puede tener muchas estructuras de glucano diferentes. Hay cuatro sitios de glucosilación de origen natural en FVII; dos sitios de N-glucosilación en N145 y N322, y dos sitios de O-glucosilación en S52 y S60, correspondientes a las posiciones de aminoácidos en el polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3.

#### Modificaciones ejemplares para alterar la glucosilación

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII que se ha modificado alterando el nivel y/o tipo de glucosilación en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. La glucosilación puede aumentarse o

reducirse en comparación con el FVII no modificado. En algunos casos, el nivel de glucosilación se aumenta, dando como resultado un polipéptido de FVII hiperglucosilado. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la incorporación de al menos un sitio de glucosilación no nativo no hallado en el polipéptido de FVII no modificado con el que se une un resto de carbohidrato. También pueden generarse polipéptidos de FVII hiperglucosilados por  
 5 enlace de un resto de carbohidrato con al menos un sitio de glucosilación nativo hallado pero no glucosilado en el polipéptido de FVII no modificado. En otros ejemplos, el nivel de glucosilación en un polipéptido de FVII modificado se reduce en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. Esto puede conseguirse eliminando uno o más sitios de glucosilación nativos, tal como por reemplazo o delección de aminoácidos. Uno o más de los restos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 52, 60, 145 y 322 que corresponden a un polipéptido de FVII maduro  
 10 expuesto en SEQ ID NO: 3 pueden suprimirse o pueden reemplazarse con un resto de aminoácido que no puede unirse a restos de carbohidratos. Por ejemplo, los restos de serina en las posiciones 52 y/o 60 pueden reemplazarse con un resto de alanina, eliminando de este modo uno o ambos de los sitios de O-glucosilación nativos. Por lo tanto, los sitios de glucosilación en un polipéptido de FVII pueden introducirse, alterarse, eliminarse o reordenarse.

15 Un polipéptido de FVII puede modificarse en una o más posiciones para alterar la glucosilación del polipéptido. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento que tienen glucosilación alterada en comparación con un polipéptido de FVII no modificado pueden no tener glucosilación, tener glucosilación ligada a O, glucosilación ligada a N y/o una combinación de las mismas. En algunos ejemplos, un polipéptido de FVII modificado incluye 1, 2, 3, 4, 5 o más restos de carbohidrato, cada uno unido con sitios de glucosilación diferentes. Los sitios de  
 20 glucosilación pueden ser un sitio de glucosilación nativo y/o un sitio de glucosilación no nativo. En algunos ejemplos, el polipéptido de FVII modificado está glucosilado en más de un sitio de glucosilación no nativo. Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado puede modificarse para introducir 1, 2, 3, 4, 5 o más sitios de glucosilación no nativos.

Pueden introducirse sitios de glucosilación no nativos por reemplazo de aminoácidos. Pueden crearse sitios de O-glucosilación, por ejemplo, por reemplazo de aminoácidos de un resto nativo con una serina o treonina. Pueden crearse sitios de N-glucosilación estableciendo el motivo Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, donde Xaa no es prolina. La creación de esta secuencia consenso por modificación de aminoácidos podría implicar el reemplazo de un resto de aminoácido nativo con una asparagina, reemplazo de un resto de aminoácido nativo con una serina, treonina o cisteína, o reemplazo de un resto de aminoácido nativo con una asparagina y reemplazo de aminoácidos de resto  
 25 nativo con una serina, treonina o cisteína. Por ejemplo, la lisina en la posición 109 (basándose en la numeración de un FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) puede reemplazarse con una asparagina para crear un nuevo motivo Asn-Xaa-Ser en el dominio EGF1 y un nuevo sitio de N-glucosilación en la posición de aminoácido 109. En otro ejemplo, la alanina en la posición 292 se reemplaza con una asparagina y la posición de alanina 294 se reemplaza con una serina para crear un nuevo motivo Asn-Xaa-Ser y un nuevo sitio de N-glucosilación en la posición de aminoácido 292. En un ejemplo adicional, la alanina en la posición 175 se reemplaza con una serina para crear un  
 30 nuevo motivo Asn-Xaa-Ser en las posiciones de aminoácidos 173-175 basándose en la numeración de un FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3, y un nuevo sitio de N-glucosilación en la posición de aminoácido 173. Pueden crearse sitios de glucosilación no nativos en cualquier región en el polipéptido de FVII. Por ejemplo, pueden introducirse uno o más sitios de glucosilación en el dominio EGF1, que corresponde a las posiciones de aminoácidos  
 35 46-82 del polipéptido de FVII maduro en SEQ ID NO: 3. En otros ejemplos, se introducen sitios de glucosilación no nativos en la región de dominio de proteasa del polipéptido de FVII, o en posiciones que pueden asociarse con la región de dominio de proteasa tras el plegamiento proteico.

Pueden modificarse sitios de glucosilación nativos para prevenir la glucosilación o potenciar o reducir la glucosilación, mientras que pueden modificarse otras posiciones en el polipéptido de FVII para introducir sitios de glucosilación no nativos. En algunos ejemplos, el contenido de carbohidratos del polipéptido de FVII puede modificarse. Por ejemplo, puede alterarse el número, la posición, la fuerza de unión, la estructura y la composición de los enlaces de carbohidratos (es decir, la estructura del carbohidrato basada en la naturaleza de los enlaces glucosídicos o las ramas del carbohidrato) de restos de carbohidratos añadidos al polipéptido de FVII.  
 45

Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento que tienen glucosilación alterada conservan al menos una actividad de FVII. Típicamente, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento que tienen glucosilación alterada muestran actividad coagulante aumentada en comparación con un FVII no modificado. En algunos ejemplos, el nivel de glucosilación de un polipéptido de FVII se aumenta. El  
 50 nivel de glucosilación puede aumentarse en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con el nivel de glucosilación del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre. En otros ejemplos, el nivel de glucosilación se reduce. El nivel de glucosilación puede reducirse en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con el nivel de glucosilación del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre. Los niveles de glucosilación alterada o cambios en el tipo de glucosilación presente en un polipéptido de FVII modificado en comparación con un polipéptido de FVII no modificado pueden manifestarse como actividad de coagulación aumentada. La actividad de coagulación de los polipéptidos de FVII modificados con glucosilación alterada puede aumentarse en al menos o aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido de FVII no modificado o de tipo  
 55  
 60  
 65

silvestre bien *in vivo* o bien *in vitro*.

La Tabla 9 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares, correspondientes a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido de FVII maduro como se expone en SEQ ID NO: 3, que se incluyen en un polipéptido de FVII modificado para alterar los niveles de glucosilación añadiendo o eliminando sitios de glucosilación. Los reemplazos de aminoácidos ejemplares pueden crear sitios de glucosilación no nativos o eliminar sitios de glucosilación nativos. En algunos casos, se requiere dos reemplazos de aminoácidos para crear un nuevo sitio de glucosilación. También se incluyen en la Tabla 9 mutaciones de combinación ejemplares que crean más de un sitio de glucosilación no nativo nuevo en el polipéptido de FVII. Como se ha observado anteriormente, los cambios en los niveles de glucosilación pueden, por ejemplo, aumentar la semivida. Por lo tanto, los polipéptidos de FVII modificados pueden tener actividad coagulante aumentada. En referencia a dichas mutaciones, el primer aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido que se reemplaza, el número corresponde a la posición en la secuencia del polipéptido de FVII maduro con referencia a SEQ ID NO: 3, y el segundo aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido seleccionado que reemplaza el primer aminoácido en esa posición. Las posiciones de aminoácidos para mutación también se denominan por el esquema de numeración de quimotripsina cuando sea apropiado. En casos donde una posición de aminoácido modificada no tiene un número de quimotripsina correspondiente (es decir no está dentro de las posiciones de aminoácidos 153 a 406 correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3, y no se ha expuesto en la Tabla 1, anteriormente), la posición se indica entre corchetes usando la numeración de FVII maduro. Por ejemplo, A51N no tiene un número de quimotripsina correspondiente y se expone como A[51]N cuando se hace referencia a la numeración de quimotripsina. En la Tabla 9 posterior, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se exponen secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido de FVII modificado. También se identifican en la Tabla 9 cualquier sitio o sitios de glucosilación no nativos nuevos generados por la modificación o las modificaciones.

**Tabla 9.**

<b>Modificación o modificaciones-numeración de FVII maduro</b>	<b>Modificación o modificaciones-numeración de quimotripsina</b>	<b>Sitio de glucosilación no nativo (numeración de FVII maduro)</b>	<b>Sitio de glucosilación no nativo (numeración de quimotripsina)</b>	<b>SEQ ID NO</b>
S52A	S[52]A	ninguno	ninguno	206
S60A	S[60]A	ninguno	ninguno	207
E394N/P395A/R396S	E245N/P246A/R247S	N394	N245	208
R202S	R62S	N200	N60d	209
A292N/A294S	A150N/A152S	N292	N150	210
G318N	G170fN	N318	N170f	211
A175S	A39S	N173	N37	212
K109N	K[109]N	N109	N[109]	213
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	N122	N[122]	214
A51N	A[51]N	N51	N[51]	215
T130N/E132S	T[130]N/E[132]S	N130	N[130]	216
A122N/G124S/ E394N/P395A/R396S	A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/R247S	N122 y N394	N[122] y N245	217
A122N/G124S/ E394N/P395A/R396S/ G318N	A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/R247S/ G170fN	N122, N394 y N318	N[122], N245 y N318	218
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A	ninguno	ninguno	219
S52N/P54S	S[52]N/P[54]S	N52	N[52]	220
S119N/L121S	S[119]N/L[121]S	N119	N[119]	221
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	N128	N[128]	222
Q66N/Y68S	Q[66]N/Y[68]S	N66	N[66]	223

Modificación o modificaciones-numeración de FVII maduro	Modificación o modificaciones-numeración de quimotripsina	Sitio de glucosilación no nativo (numeración de FVII maduro)	Sitio de glucosilación no nativo (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
S52N/P54S/A122N/G124S/E394N/P395A/R396S	S[52]N/P[54]S/A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/R247S	N52, N122 y N397	N[52], N[122] y N245	224
K109N/A292N/A294S	K[109]N/A150N/A152S	N109 y N292	N[109] y N150	225
K109N/A175S	K[109]N/A39S	N109 y N173	N[109] y N37	226
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	N119 y N173	N[119] y N37	271
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	N128 y N173	N[128] y N37	272
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	N122 y N173	N[122] y N37	273

### 5. Unión aumentada a albúmina de suero y/o integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$

5 El FVII no modificado recombinante tienen una semivida en suero de solamente 1,5-3 horas en seres humanos. El aumento de la semivida en suero de un polipéptido de FVII puede reducir la cantidad y frecuencia de las dosificaciones requeridas para efecto terapéutico. Pueden emplearse varias estrategias para aumentar la semivida en suero incluyendo, pero sin limitación, aumentar la glucosilación, aumentar la resistencia a proteasa, PEGilación y conjugación o fusión con proteínas mayores, tales como albúmina de suero y la parte Fc de IgG. Dichas modificaciones pueden dar como resultado, por ejemplo, degradación reducida del polipéptido de FVII por proteasas del suero, eliminación renal reducida, eliminación hepática reducida y neutralización o eliminación reducida por el sistema inmunitario. Otra estrategia que puede emplearse para aumentar la semivida en suero de un polipéptido de FVII implica el injerto de secuencias de unión en un polipéptido de FVII no modificado para establecer interacciones proteína-proteína nuevas o mejoradas que no se observan en un polipéptido de FVII no modificado.

15 Las secuencias de unión que se insertan en el polipéptido de FVII no modificado pueden contener aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 o más restos de aminoácidos que facilitan la interacción con otra proteína. Las secuencias de unión pueden corresponder a una secuencia de unión presente de forma natural en una proteína nativa, o pueden ser una secuencia de unión sintética con poca o ninguna correlación de secuencia con secuencias de unión presentes de forma natural en una proteína nativa. Las secuencias de unión usadas para modificar los polipéptidos de FVII del presente documento interactúan específicamente con un sitio de unión en otra proteína, estableciendo una interacción proteína-proteína no covalente. En algunos ejemplos, la proteína para la que la secuencia de unión es específica es una proteína del suero, tal como, por ejemplo, albúmina de suero. Dichas secuencias se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo documentos US20030069395, US20040009534 y US20070202045). En otros ejemplos, la proteína reconocida por la secuencia de unión es un receptor o ligando de superficie celular, tal como, por ejemplo, integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Smith *et al.* (1995) J. Biol. Chem. 270: 30486-30490). La afinidad con la que el polipéptido de FVII modificado se une con la proteína de suero o receptor de superficie celular se caracteriza típicamente por una constante de disociación, Kd, de 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM, 1 pM o menos. La unión del polipéptido de FVII modificado con la proteína del suero o el receptor de superficie celular mediante la secuencia de unión puede reducir, por ejemplo, la eliminación renal o eliminación hepática del polipéptido de FVII modificado en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. En algunos ejemplos, la unión del polipéptido de FVII modificado con un receptor de superficie celular también puede dirigir el polipéptido de FVII modificado a un tipo celular o tisular o región en el cuerpo deseado, de este modo "concentrando" ese polipéptido de FVII en un sitio particular, tal como, por ejemplo, un coágulo sanguíneo. Por lo tanto, los polipéptidos de FVII modificados que contienen secuencias de unión injertadas pueden mostrar semivida aumentada en comparación con un polipéptido de FVII no modificado.

#### a. Polipéptidos de FVII ejemplares con secuencias de unión a albúmina de suero

40 Se describen en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen secuencias de unión a albúmina de suero. Los polipéptidos de FVII modificados pueden unirse con albúmina de suero *in vitro* o *in vivo*, dando como resultado una semivida aumentada. Por lo tanto, se describen en el presente documento polipéptidos de FVII modificados con semivida aumentada en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. Cuando se evalúan en un ensayo *in vitro* apropiado, o *in vivo*, tal como después de la administración a un sujeto como un producto terapéutico procoagulante, los polipéptidos de FVII modificados pueden presentar actividad coagulante aumentada en comparación con polipéptidos de FVII no modificados.

Los polipéptidos de FVII modificados descritos en el presente documento pueden contener secuencias de unión a albúmina de suero. Las secuencias de unión a albúmina de suero pueden insertarse dentro del polipéptido de FVII no modificado o pueden unirse con el extremo C o N terminal del polipéptido de FVII. Por ejemplo, la secuencia de



unión a albúmina de suero puede extenderse desde el resto de prolina en la posición de aminoácido 406 en el extremo C terminal del polipéptido de FVII (correspondiente a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3). Si las secuencias de unión se insertan dentro del polipéptido de FVII, la inserción es en una posición tal que el polipéptido de FVII modificado resultante conserve al menos una actividad de un polipéptido de FVII no modificado. La secuencia de unión puede insertarse en el polipéptido de FVII sin retirar ningún resto de aminoácido en el polipéptido de FVII, o puede reemplazar uno o más restos de aminoácidos en el polipéptido de FVII. En algunos ejemplos, una secuencia de unión a albúmina de suero reemplaza los restos de aminoácidos S103 a S111 (correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) para generar un polipéptido de FVII modificado. En otros ejemplos, una secuencia de unión a albúmina de suero reemplaza los restos de aminoácidos H115 a S126, o T128 a P134 (correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3). Se exponen secuencias de unión a albúmina de suero ejemplares en las SEQ ID NO: 206-212.

La Tabla 10 proporciona ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares que pueden realizarse a un polipéptido de FVII para insertar una secuencia de unión a albúmina de suero. Como se ha observado anteriormente, la inclusión de una secuencia de unión a albúmina de suero puede aumentar la semivida de un polipéptido de FVII. Por lo tanto, los polipéptidos de FVII modificados pueden tener actividad coagulante aumentada. En referencia a las modificaciones enumeradas en la Tabla 10, los restos de aminoácidos en los que se inserta la secuencia de unión a albúmina de suero en el polipéptido de FVII, y la secuencia de la secuencia de unión, están ambos representados en la tabla. Por ejemplo, S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF indica que los restos de aminoácidos S103 a S111 de una numeración de longitud completa de un polipéptido de FVII no modificado (restos correspondientes a la secuencia del polipéptido de FVII maduro expuesta en SEQ ID NO: 3) se han suprimido y reemplazado con una secuencia de unión a albúmina de suero con la secuencia de aminoácidos QRLMEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID NO: 206). La enumeración de solamente un resto de aminoácido individual, tal como P406, indica que la secuencia de unión a albúmina de suero se inserta después de P406 y no se ha suprimido ningún resto de aminoácido del polipéptido de FVII. Las posiciones de aminoácidos para mutación también se denominan por el esquema de numeración de quimotripsina cuando sea apropiado. En casos en los que una posición de aminoácido modificada no tenga un número de quimotripsina correspondiente (es decir no esté dentro de las posiciones de aminoácidos 153 a 406 correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3, y no se exponga en la Tabla 1, anterior), la posición se indica entre corchetes usando la numeración de FVII maduro. Por ejemplo, S103 no tiene número de quimotripsina correspondiente y se expone como S[103] cuando se hace referencia a la numeración de quimotripsina. En la Tabla 10 posterior, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se exponen secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido de FVII modificado.

Tabla 10.

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
S103S111 delinsQRLMEDICLPRWG CLWEDDF	S[103]S[111]delinsQRLMEDICLPRW GCLWEDDF	227
H115S126delinsQR-LMEDICLPRWG CLWEDDF	H[115]S[126]delinsQRLMEDICLPRW GCLWEDDF	228
T128P134delinsQRLMEDICLPRWG CLWEDDF	T[128]P[134]delinsQRLMEDICLPRW GCLWEDDF	229
S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE	S[103]S[111]delinsIEDICLPRWGCLW E	230
H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE	H[115]S[126]delinsIEDICLPRWGCL WE	231
T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE	T[128]P[134]delinsIEDICLPRWGCLW E	232
S103S111delinsDICLPRWGCLWED	S[103]S[111]delinsDICLPRWGCLWE	233
S103S111delinsDICLPRWGCLWED	S[103]S[111]delinsDICLPRWGCLWE D	233
H115S126delinsDICLPRWGCLWED	H[115]S[126]delinsDICLPRWGCLWE D	234
T128P134delinsDICLPRWGCLWED	T[128]P[134]delinsDICLPRWGCLWE D	235
P406insIEDICLPRWGCLW	P257insIEDICLPRWGCLW	236
P406insGGGSIEDICLPRWGCLW	P257insGGGSIEDICLPRWGCLW	237
P406insDICLPRWGCLWED	P257insDICLPRWGCLWED	238
P406insGGGSDICLPRWGCLWED	P257insGGGSDICLPRWGCLWED	239

Los polipéptidos de FVII modificados que contienen una secuencia de unión a albúmina de suero pueden mostrar unión aumentada con albúmina de suero que es al menos o aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la unión del polipéptido de FVII de tipo silvestre o no modificado con albúmina de suero bien *in vivo*

o bien *in vitro*. Los polipéptidos de FVII modificados que pueden unirse con albúmina de suero pueden mostrar semivida en suero aumentada de al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la semivida en suero del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo* o bien *in vitro*. La unión a albúmina de suero aumentada y/o semivida en suero aumentada de dichos polipéptidos de FVII modificados también puede manifestarse como actividad de coagulación aumentada, duración de la actividad de coagulación y/o índice terapéutico potenciado. La actividad de coagulación de los polipéptidos de FVII modificados puede aumentarse en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido de FVII de tipo silvestre o no modificado bien *in vivo* o bien *in vitro*.

#### b. Polipéptidos de FVII ejemplares con secuencias de unión a integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$

Se describen en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen secuencias de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . La integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (también denominada glucoproteína (GP) IIb/IIIa) es el receptor de adhesión a plaquetas más abundante. Es un heterodímero dependiente de calcio que actúa como un receptor para proteínas incluyendo, pero sin limitación, fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, factor de von Willebrand y trombospondina. La unión con ligandos de proteínas "afines" puede activar  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e inducir la transducción de señales en el citoplasma mediante el dominio intercelular de la proteína. Los polipéptidos de FVII modificados que contienen secuencias de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , por lo tanto, pueden unirse con plaquetas. Los polipéptidos de FVII modificados pueden unirse con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (la forma activada y/o inactivada) *in vitro* o *in vivo*, dando como resultado una semivida aumentada. Las variantes de FVIIa que se unen selectivamente con  $\alpha_{IIb}\beta_3$  activada pueden, por lo tanto, dirigirse a plaquetas activadas y por lo tanto concentrarse en el sitio de un coágulo sanguíneo en evolución. Se espera que la dirección selectiva de FVIIa a coágulos sanguíneos en evolución mejore la utilidad terapéutica de la variante mejorando tanto la eficacia como el índice terapéutico. Por lo tanto, se describen en el presente documento polipéptidos de FVII modificados con semivida aumentada en comparación con un polipéptido de FVII no modificado y variantes que, además, se unen selectivamente con plaquetas activadas. Cuando se evalúen en un ensayo *in vitro* apropiado, o *in vivo*, tal como después de la administración a un sujeto como un producto terapéutico procoagulante, los polipéptidos de FVII modificados pueden presentar actividad coagulante aumentada en comparación con polipéptidos de FVII no modificados.

Los polipéptidos de FVII modificados descritos en el presente documento contienen secuencias de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Las secuencias de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  pueden insertarse con el polipéptido de FVII no modificado o pueden unirse con el extremo C o N terminal del polipéptido de FVII. Por ejemplo, las secuencias de unión a  $\alpha_{IIb}\beta_3$  pueden extenderse desde el resto de prolina en la posición de aminoácido 406 en el extremo C terminal del polipéptido de FVII (correspondiente a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3). Si las secuencias de unión se insertan dentro del polipéptido de FVII, la inserción es en una posición tal que el polipéptido de FVII modificado resultante conserve al menos una actividad de un polipéptido de FVII no modificado. La secuencia de unión puede insertarse en el polipéptido de FVII sin retirar ningún resto de aminoácido en el polipéptido de FVII, o puede reemplazar uno o más restos de aminoácidos en el polipéptido de FVII. En algunos ejemplos, una secuencia de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  reemplaza los restos de aminoácidos S103 a S111 (correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) para generar un polipéptido de FVII modificado. En otros ejemplos, una secuencia de unión a  $\alpha_{IIb}\beta_3$  reemplaza los restos de aminoácidos H115 a S126, o T128 a P134 (correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3). Se exponen secuencias de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ejemplares en SEQ ID NO: 213-215.

La Tabla 11 proporciona ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares que pueden realizarse a un polipéptido de FVII para insertar una secuencia de unión de integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Como se ha indicado anteriormente, la inclusión de una secuencia de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  puede aumentar la semivida en suero de un polipéptido de FVII y/o dirigir la proteína a un coágulo sanguíneo en evolución. Por lo tanto, los polipéptidos de FVII modificados pueden tener actividad coagulante aumentada. En referencia a las modificaciones enumeradas en la Tabla 11, los restos de aminoácidos en los que la secuencia de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  se inserta en el polipéptido de FVII, y la secuencia de la secuencia de unión, están ambos representados en la tabla. Por ejemplo, H1115S126delins SFGRGDIRNV indica que los restos de aminoácidos H115 a S126 de la numeración de longitud completa de un polipéptido de FVII no modificado (restos correspondientes a la secuencia del polipéptido de FVII maduro expuesta en SEQ ID NO: 3) se han suprimido, y reemplazados con una secuencia de unión a  $\alpha_{IIb}\beta_3$  con la secuencia de aminoácidos SFGRGDIRNV (SEQ ID NO: 213). La enumeración de solamente un resto de aminoácido individual, tal como P406, indica que la secuencia de unión a  $\alpha_{IIb}\beta_3$  se inserta después de P406 y no se ha suprimido ningún resto de aminoácido del polipéptido de FVII. Las posiciones de aminoácidos para mutación también se denominan por el esquema de numeración de quimotripsina cuando sea apropiado. En casos en los que una posición de aminoácido modificada no tenga un número de quimotripsina correspondiente (es decir no esté dentro de las posiciones de aminoácidos 153 a 406 correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3, y no se exponga en la Tabla 1, anterior), la posición se indica entre paréntesis usando la numeración de FVII maduro. Por ejemplo, S103 no tiene un número de quimotripsina correspondiente y se expone

como S[103] cuando se hace referencia a numeración de quimotripsina. En la Tabla 11 posterior, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se exponen secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido de FVII modificado.

5

Tabla 11.

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
S103S111delinsSFGRGDIRNV	S[103]S[111]delinsSFGRGDIRNV	240
H115S126delinsSFGRGDIRNV	H[115]S[126]delinsSFGRGDIRNV	241
T128P134delinsSFGRGDIRNV	T[128]P[134]delinsSFGRGDIRNV	242
P406insCSFGRGDIRNVC	P257insCSFGRGDIRNVC	243
P406insGGGSCSFGRGDIRNVC	P2S7insGGGSCSFGRGDIRNVC	244

Los polipéptidos de FVII modificados que contienen una secuencia de unión a integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  pueden mostrar unión aumentada con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  que es al menos o aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la unión del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  *in vivo*. Los polipéptidos de FVII modificados que pueden unirse con plaquetas mediante integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  pueden mostrar semivida aumentada de al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la semivida del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vitro*, bien *in vivo* o bien *ex vivo*. La semivida aumentada de dichos polipéptidos de FVII modificados también puede manifestarse como actividad de coagulación aumentada, duración de la actividad coagulante y/o índice terapéutico potenciado. Por ejemplo, la actividad de coagulación de los polipéptidos de FVII modificados puede aumentarse en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo* o bien *in vitro*.

## 6. Modificación por introducción de un dominio Gla heterólogo

La interacción de restos en el dominio Gla  $\gamma$ -carboxilado de proteínas del plasma dependientes de vitamina K, tales como FVII, FIX, FX, protrombina, proteína C y proteína S, y fosfolípidos con carga negativa en la superficie de membrana es importante para la hemostasia. Los dominios Gla de proteínas del plasma dependientes de vitamina K típicamente contienen aproximadamente 45 aminoácidos, de los que de 9 a 12 restos de aminoácidos se modifican postraduccionalmente por carboxilación dependiente de vitamina K para formar  $\gamma$ -carboxiglutamato (Gla). Los aminoácidos que forman el dominio Gla se sitúan inmediatamente después de los que forman el péptido y propéptido señal de las proteínas, y se sitúan por lo tanto en el extremo N terminal después del procesamiento y escisión de los polipéptidos precursores a las proteínas maduras. Por ejemplo, los aminoácidos que forman el dominio Gla en FVII están en las posiciones 39-83 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 1, posiciones 61-105 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 2, y posiciones 1 a 45 del polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 3. De estos, los 10 restos de ácido glutámico en las posiciones E6, E7, E14, E19, E20, E25, E26, E29 y E35 del polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3 se modifican por carboxilación para generar restos de  $\gamma$ -carboxiglutamato (Gla).

Debido a su afinidad de unión relativamente baja para plaquetas activadas, el dominio Gla de FVII es una diana para modificación, con el objetivo de potenciar la interacción entre el FVII modificado y la membrana fosfolípida, aumentando de este modo la actividad de coagulación. La modificación puede efectuarse por sustitución de aminoácidos específicos que están implicados en esta interacción (véase, por ejemplo, Shah *et al.* PNAS 95: 4429-4234, Harvey *et al.* (2003) J Biol Chem 278: 8363-8369). Como alternativa, puede efectuarse modificación por sustitución del dominio Gla completo con el dominio Gla de otra proteína dependiente de vitamina K es decir intercambio de dominio Gla. Este tipo de modificación da como resultado una proteína quimérica, tal como la que resulta cuando el dominio Gla de la proteína C se reemplazó con el dominio Gla de FVII (Geng *et al.* (1997) Thromb Haemost 77: 926-933).

Típicamente, dicha modificación incluye la introducción, tal como por adición o sustitución, de un dominio Gla heterólogo, o una parte suficiente del mismo para efectuar unión de fosfolípidos en una región del polipéptido de FVII para generar un polipéptido de FVII modificado quimérico. En general, dicho polipéptido de FVII quimérico conserva al menos una actividad de FVII. La unión y/o afinidad de polipéptidos de FVII modificados por Gla para plaquetas activadas puede aumentarse en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la unión y/o afinidad del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo* o bien *in vitro*. La unión y/o afinidad para plaquetas activadas por polipéptidos de FVII modificados también puede manifestarse como actividad

de coagulación aumentada. La actividad de coagulación de los polipéptidos de FVII modificados por Gla puede aumentarse en al menos o aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo* o bien *in vitro*.

5 Un dominio Gla o parte suficiente del mismo para efectuar unión a fosfolípidos, tal como 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más del dominio Gla heterólogo, contenido dentro de cualquier polipéptido puede usarse como una fuente de un dominio Gla heterólogo para introducción o reemplazo de una región de un polipéptido de FVII. Típicamente, dicho dominio Gla heterólogo muestra afinidad de unión por fosfolípidos, por ejemplo, fosfolípidos presentes en la superficie de una plaqueta activada. En general, la elección de un dominio Gla heterólogo es uno que muestra mayor afinidad por fosfolípidos en comparación con la afinidad del dominio Gla de FVII. El dominio Gla exacto, o parte suficiente del mismo, usado como un dominio heterólogo para modificación de un polipéptido de FVII puede determinarse de forma racional o empírica. Los ejemplos de otros polipéptidos que contienen Gla incluyen, pero sin limitación, FIX, FX, protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína de Gla de matriz, proteína específica de detención del Crecimiento 6 (Gas6) y proteína Z. Los dominios Gla de estas proteínas ejemplares se exponen en cualquiera de SEQ ID NO: 83-91. Por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o más aminoácidos contiguos, o el dominio Gla completo, de un dominio Gla heterólogo pueden introducirse en un polipéptido de FVII. Además, la introducción del dominio Gla en un polipéptido de FVII también puede incluir aminoácidos adicionales que no son parte del dominio Gla del polipéptido heterólogo siempre que los aminoácidos adicionales no debiliten significativamente la capacidad de unión a fosfolípidos del dominio Gla introducido.

En algunos ejemplos, la introducción es mediante adición del dominio Gla al polipéptido de FVII de modo que el dominio Gla heterólogo se inserte en el dominio Gla endógeno o en otra región o dominio del polipéptido de FVII siempre que el polipéptido de FVII modificado conserve al menos una actividad de FVII. En dichos ejemplos, el dominio Gla nativo del polipéptido de FVII está conservado en el polipéptido, aunque en algunos casos la secuencia de aminoácidos que compone el dominio Gla nativo está interrumpida. En otros ejemplos, el dominio Gla heterólogo, o una parte suficiente del mismo, se inserta adyacente a, bien en el extremo N o bien en el extremo C terminal, del dominio Gla nativo de modo que el dominio Gla nativo no esté interrumpido. En un ejemplo adicional, el dominio Gla heterólogo, o una parte suficiente del mismo, se inserta en otro dominio del polipéptido de FVII.

También se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII de dominio Gla modificado donde todo o una parte contigua del dominio Gla endógeno de FVII se retira y se reemplaza con un dominio Gla heterólogo, o una parte suficiente del mismo para efectuar unión a fosfolípidos, siempre que el polipéptido de FVII modificado conserve al menos una actividad de FVII. Dicha modificación también se denomina un intercambio de dominio Gla. Son ejemplos de modificaciones de intercambio de Gla aquellos en los que el dominio Gla endógeno se reemplaza con todo o una parte del dominio Gla de uno cualquiera de FIX (SEQ ID NO: 83), FX (SEQ ID NO: 84), trombina (SEQ ID NO: 85), Proteína C (SEQ ID NO: 86) o Proteína S (SEQ ID NO: 87). Dichas modificaciones se denominan "Intercambio de Gla FIX", "Intercambio de Gla FX", "Intercambio de Gla Trombina", "Intercambio de Gla Prot C" e "Intercambio de Gla Prot S", respectivamente. Dichos polipéptidos de FVII modificados pueden mostrar unión aumentada a plaquetas activadas, dando como resultado actividad coagulante aumentada. La modificación "Intercambio de Gla FIX" implica la delección del dominio Gla de FVII endógeno suprimiendo los restos de aminoácidos A1 a Y44 (restos correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) e inserción de 45 restos de aminoácidos que corresponden a los restos de aminoácidos Y1 a Y45 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83. La modificación de Intercambio de Gla FX implica la delección de los restos de aminoácidos A1 a Y44 (restos correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) e inserción de 44 restos de aminoácidos que corresponden a A1 a Y44 del dominio Gla de FX expuesto en SEQ ID NO: 84. La modificación de Intercambio de Gla Trombina implica la delección de los restos de aminoácidos A1 a Y44 (restos correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) y la inserción de 44 restos de aminoácidos que corresponden a los restos de aminoácidos Y1 a Y44 del dominio Gla de Trombina expuesto en SEQ ID NO: 85. La modificación de Intercambio de Gla Proteína C implica la delección de los restos de aminoácidos A1 a Y44 (restos correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) e inserción de 44 restos de aminoácidos que corresponden a los restos de aminoácidos A1 a H44 del dominio Gla de Proteína C expuesto en SEQ ID NO: 86. La modificación de intercambio de Gla Proteína S implica la delección de los restos de aminoácidos A1 a Y44 (restos correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) e inserción de 44 restos de aminoácidos que corresponden a los restos de aminoácidos Y1 a Y44 del dominio Gla de Proteína S expuesto en SEQ ID NO: 87.

En algunos ejemplos, se realizan modificaciones, incluyendo, pero sin limitación, sustituciones o reemplazos, inserciones y/o delecciones de aminoácidos, al dominio Gla heterólogo que se introduce en el polipéptido de FVII. Dichas modificaciones pueden efectuar, por ejemplo, unión aumentada a plaquetas activadas, debido a unión a fosfolípidos aumentada, en comparación con la unión observada con la forma de tipo silvestre del dominio Gla heterólogo. Por ejemplo, si el dominio Gla del Factor IX, o una parte de unión a fosfolípido del mismo, se introduce en un polipéptido de FVII para generar un polipéptido de FVII modificado, el dominio Gla del Factor IX puede contener mutaciones de aminoácidos que confieren unión a fosfolípidos aumentada en comparación con el dominio Gla del Factor IX de tipo silvestre. El dominio Gla heterólogo contenido en los polipéptidos de FVII modificados

proporcionados en el presente documento puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más modificaciones, tales como sustituciones o reemplazos, inserciones y/o deleciones de aminoácidos.

En algunos ejemplos, la modificación o las modificaciones del dominio Gla heterólogo aumentan la unión a fosfolípidos. En otros ejemplos, el dominio Gla heterólogo puede contener una o más mutaciones en comparación con la forma de tipo silvestre del dominio Gla heterólogo que confieren funciones de tipo FVII al dominio Gla heterólogo. Por ejemplo, como se ha observado anteriormente, R36 del dominio Gla de FVII expuesto en SEQ ID NO: 119 puede estar implicado en interacciones con FX. Por lo tanto, el dominio Gla heterólogo puede contener modificaciones adicionales, tales como cualquiera requerida para mantener una arginina en la posición 36 del polipéptido de FVII maduro, como se expone en SEQ ID NO: 3, o cualquier otra modificación requerida para mantener las propiedades de activación de FX del polipéptido de FVIIa modificado (Ruf *et al.* (1999) Biochem 38: 1957-1966). Por lo tanto, en algunos ejemplos, puede realizarse una mutación correspondiente a R36 en el dominio Gla heterólogo. La posición correspondiente puede determinarse por un experto en la materia, tal como por alineamiento de secuencias de aminoácidos.

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen una modificación de intercambio de Gla donde el dominio Gla heterólogo, o parte de unión a fosfolípido del mismo, contiene una o más mutaciones en comparación con el dominio Gla heterólogo de tipo silvestre, y se introduce en el polipéptido de FVII por reemplazo de parte de o todo el dominio Gla de FVII endógeno. En un ejemplo, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento contienen una modificación de "Intercambio de Gla FIX" que, como se ha descrito anteriormente, implica la delección del dominio Gla de FVII endógeno suprimiendo los restos de aminoácidos A1 a Y44 (restos correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) e inserción de 45 restos de aminoácidos que corresponden a los restos de aminoácidos Y1 a Y45 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83. El dominio Gla de FIX usado en la modificación de intercambio de Gla puede contener una o más mutaciones en comparación con la forma de tipo silvestre del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o más mutaciones, tales como sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. Por ejemplo, el dominio Gla de FIX heterólogo en el polipéptido de FVII modificado por "Intercambio de Gla FIX" puede contener una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones de aminoácidos correspondientes a M19, E40, K43 y/o Q44 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83.

En un ejemplo, el dominio Gla de FIX contiene una sustitución de aminoácidos M19K. Dicha modificación se indica por {Intercambio de Gla FIX/M19K} es decir la metionina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 19 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83 se reemplaza con una lisina. En un ejemplo adicional, el dominio Gla de FIX heterólogo modificado en el polipéptido de FVII modificado contiene una sustitución de aminoácido E40L, indicada por {Intercambio de Gla de FIX/E40L}, por la que el ácido glutámico en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 40 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83 se reemplaza con una leucina. También se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen una sustitución K43I (indicado por {Intercambio de Gla FIX/K43I}) donde la lisina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 43 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83 se reemplaza con una isoleucina. En otro ejemplo, el dominio Gla de FIX heterólogo modificado en el polipéptido de FVII modificado contiene una sustitución de aminoácidos Q44S, indicada por {Intercambio de Gla FIX/Q44S}, por el que la glutamina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 44 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83 se reemplaza con una serina. En un ejemplo, el dominio Gla de FIX heterólogo contiene las sustituciones de aminoácidos M19K/E40L/K43I/Q44S.

Los polipéptidos de FVII modificados que contienen un dominio Gla heterólogo, tal como un dominio Gla heterólogo modificado, pueden mostrar actividad coagulante aumentada a dosis menores en comparación con una molécula de FVII de tipo silvestre, tal como NovoSeven®, debido a unión y/o afinidad aumentadas con plaquetas activadas. La actividad de coagulación de los polipéptidos de FVII modificados con Gla pueden aumentarse en al menos o aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido de FVII no modificado o de tipo silvestre bien *in vivo*, bien *ex vivo* o bien *in vitro*.

## 7. Combinaciones y modificaciones adicionales

Una cualquiera o más de las modificaciones descritas anteriormente pueden combinarse con cualquier otra modificación o modificaciones descritas anteriormente o descritas en otra parte en la técnica. Por lo tanto, además de la modificación de polipéptidos de FVII para tener resistencia aumentada a AT-III, actividad catalítica aumentada, resistencia aumentada a la inhibición por  $Zn^{2+}$ , glucosilación alterada, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como semivida aumentada, unión y/o afinidad aumentada con albúmina de suero, unión y/o afinidad aumentada con fosfolípidos, o unión y/o afinidad aumentada con integrina de plaquetas,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento también incluyen los que muestran más de una de las propiedades anteriormente indicadas. Típicamente, dichas modificaciones adicionales son las que en sí mismas dan como resultado una actividad coagulante aumentada del polipéptido modificado y/o estabilidad aumentada del polipéptido. En consecuencia, los polipéptidos de FVII modificados resultantes muestran una actividad coagulante aumentada. Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, cualquier sustitución, delección o inserción de

aminoácidos conocida en la técnica, típicamente cualquiera que aumente la actividad coagulante y/o estabilidad del polipéptido de FVII. Cualquier polipéptido de FVII modificado descrito en el presente documento puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más modificaciones de aminoácidos adicionales, siempre que el polipéptido de FVII modificado resultante conserve una actividad de FVII del polipéptido de tipo silvestre o no modificado.

En un ejemplo, la modificación adicional puede realizarse en la secuencia polipeptídica de FVII de modo que su interacción con otros factores, otras moléculas y otras proteínas se altere. Por ejemplo, los restos de aminoácidos que están implicados en la interacción con el inhibidor de la ruta del factor tisular (IRFT) pueden reemplazarse de modo que la afinidad y/o unión del polipéptido de FVII modificado con FT se reduzca. Otras modificaciones incluyen, pero sin limitación, modificación de aminoácidos que están implicados en interacciones con el factor X, factor IX, factor tisular (FT) y fosfolípidos. En algunos ejemplos, la modificación realizada a la secuencia polipeptídica de FVII incluye inserción de aminoácidos que constituyen una secuencia de unión, tal como, por ejemplo, una secuencia de unión a albúmina de suero o una secuencia de unión a glucoproteína IIb-IIIa.

También pueden realizarse modificaciones adicionales a un polipéptido de FVII modificado descrito en el presente documento que alteran la conformación o el plegamiento del polipéptido. Estas incluyen, por ejemplo, el reemplazo de uno o más aminoácidos con una cisteína de modo que se forme un nuevo enlace disulfuro, o modificaciones que establezcan una conformación de hélice  $\alpha$ , transmitiendo de este modo actividad aumentada al polipéptido de FVII modificado.

También pueden realizarse modificaciones adicionales al polipéptido de FVII para efectuar modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, el polipéptido puede modificarse para incluir sitios de glucosilación adicionales de modo que el polipéptido de FVII modificado resultante tenga glucosilación aumentada en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. También pueden realizarse modificaciones para introducir restos de aminoácidos que pueden unirse posteriormente a un resto químico, tal como uno que actúa para aumentar la estabilidad del polipéptido de FVII modificado. La estabilidad de un polipéptido de FVII también puede alterarse modificando sitios proteolíticos potenciales, aumentando de este modo la resistencia del polipéptido de FVII modificado a proteasas.

Adicionalmente, pueden realizarse sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos en el dominio Gla endógeno de modo que el polipéptido de FVII modificado presente unión y/o afinidad aumentada con membranas fosfolípicas. Dichas modificaciones pueden incluir sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos individuales, o pueden incluir sustitución, deleción o inserción de aminoácidos de múltiples aminoácidos. Por ejemplo, todo o parte del dominio Gla endógeno puede reemplazarse con todo o parte de un dominio Gla heterólogo. En otros ejemplos, los polipéptidos de FVII modificados descritos en el presente documento pueden presentar deleciones en el dominio Gla endógeno, o sustituciones en las posiciones que normalmente están gamma-carboxiladas (documento US20070037746).

Las siguientes secciones describen ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en la técnica para efectuar estabilidad y/o actividad coagulante aumentadas de un polipéptido de FVII. Como se ha analizado anteriormente, dichas modificaciones también pueden incluirse adicionalmente en cualquier polipéptido de FVII modificado proporcionado en el presente documento y de acuerdo con las presentes reivindicaciones. Las posiciones de aminoácidos a las que se hace referencia posteriormente corresponden al polipéptido de FVII maduro como se expone en SEQ ID NO: 3. Pueden realizarse mutaciones correspondientes en otros polipéptidos de FVII, tales como variantes alélicas, de especie o de corte y empalme del polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3.

#### **a. Modificaciones que aumentan la resistencia a IRFT**

En un ejemplo, pueden realizarse modificaciones adicionales a un polipéptido de FVII modificado que contiene una modificación en la posición de aminoácido 286 por numeración de FVII maduro que da como resultado resistencia aumentada a IRFT. Dicha resistencia a IRFT puede conseguirse, por ejemplo, por mutación de uno o más restos en FVII implicados en la interacción y unión con IRFT para reducir o prevenir dicha unión, haciendo de este modo a los polipéptidos de FVII modificados resistentes a los efectos inhibidores de forma natural de IRFT con respecto al inicio de la coagulación. Por ejemplo, las modificaciones pueden realizarse en restos de aminoácidos que son restos de contacto de FVII/IRFT o restos en proximidad estrecha con la superficie de interacción.

Los ejemplos de modificaciones adicionales que pueden incluirse en los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento para aumentar la resistencia a IRFT incluyen, pero sin limitación, los descritos en la Publicación de Patente Internacional n.º WO2004/083361, Neuenschwander *et al.*, (1995) *Biochemistry* 34: 8701-8707, Chang *et al.*, (1999) *Biochemistry* 38: 10940-10948, y Iakhiaev *et al.*, (2001) *Thromb. Haemost.* 85: 458-463, y Solicitud de Estados Unidos relacionada n.º de Serie 12/082.662. Los ejemplos no limitantes de modificaciones de aminoácidos ejemplares descritos en la técnica que pueden dar como resultado resistencia aumentada a IRFT del polipéptido de FVII modificado incluyen uno cualquiera o más de Q176, D196K, D196R, D196A, D196Y, D196F, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D,

R290N, R290Q, R290K, R290M, R290V, K341E, K341R, K341Q, K341N, K341M, K341D, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA y K197I198insS (donde, por ejemplo, G237T238insAS indica una modificación en la que se han insertado una alanina (A) y una serina (S) entre la glicina en la posición 237 (G237) y la treonina en la posición 238).

#### b. Modificaciones que aumentan la actividad intrínseca

En un ejemplo, pueden realizarse modificaciones adicionales a un polipéptido de factor VII modificado proporcionado en el presente documento que dan como resultado actividad catalítica aumentada hacia el factor X. Por ejemplo, pueden realizarse modificaciones a los aminoácidos que están implicados en la interacción con su cofactor, FT, de modo que el polipéptido de FVII modificado resultante tenga afinidad aumentada por FT, y de este modo presente actividad aumentada hacia FX. También pueden realizarse modificaciones al bolsillo de activación del polipéptido de FVII, de modo que la actividad intrínseca del polipéptido de FVII modificado hacia FX aumente en comparación con la actividad del polipéptido no modificado. Otra estrategia de modificación que da como resultado actividad aumentada implica la modificación del polipéptido de FVII de modo que el plegamiento y la conformación de la proteína se alteren a una forma más activa. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos de modo que la región del bucle de hélice  $\alpha$  (correspondiente a las posiciones 305 a 321 de la secuencia madura como se expone en SEQ ID NO: 3) del dominio de proteasa se establezca y se pliegue más estrechamente al cuerpo del dominio de proteasa para conferir una forma más de tipo zimógeno en el polipéptido de FVII modificado. También puede conseguirse un polipéptido más activo por modificación de los aminoácidos implicados en las cadenas  $\beta$  del polipéptido de FVII. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos que introducen nuevos pares de cisteína que pueden formar nuevos enlaces disulfuro que pueden actuar para "bloquear" el polipéptido de FVII modificado en una forma más activa.

Los ejemplos de modificaciones adicionales que pueden incluirse en los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento para aumentar la actividad intrínseca del polipéptido de FVII modificado incluyen, pero sin limitación, los descritos en Persson *et al.* (2004) *Biochem J.* 379: 497-503, Maun *et al.* (2005) *Prot Sci* 14: 1171-1180, Persson *et al.* (2001) *PNAS* 98: 13583-13588, Persson *et al.* (2002) *Eur J Biochem* 269: 5950-5955, Soejima *et al.* (2001) *J Biol Chem* 276: 17229-17235, Soejima *et al.* (2002) *J Biol Chem* 277: 49027-49035, documentos WO200183725, WO2002022776, WO2002038162, WO2003027147, WO200338162, WO2004029090, WO2004029091, WO2004108763 y WO2004111242. Los ejemplos no limitantes de modificaciones de aminoácidos ejemplares descritas en la técnica que pueden dar como resultado actividad intrínseca aumentada del polipéptido de FVII modificado incluyen una cualquiera o más de S279C/N302C, L280C/N301C, V281C/N302C, S282C/N299C, S314E, L39E, L39Q, L39H, I42R, S43Q, S53N, K62E, K62R, K62D, K62N, K62Q, K62T, L65Q, L65S, F71D, F71Y, F71E, F71Q, F71N, P74S, P74A, A75E, A75D, E77A, E82Q, E82N, T83K, E116D, K157V, K157L, K157I, K157M, K157F, K157W, K157P, K157G, K157S, K157T, K157C, K157Y, K157N, K157E, K157R, K157H, K157D, K157Q, V158L, V158I, V158M, V158F, V158W, V158P, V158G, V158S, V158T, V158C, V158Y, V158N, V158E, V158R, V158K, V158H, V158D, V158Q, A274M, A274L, A274K, A274R, A274D, A274V, A274I, A274F, A274W, A274P, A274G, A274T, A274C, A274Y, A274N, A274E, A274H, A274S, A274Q, F275H, E296V, E296L, E296I, E296M, E296F, E296W, E296P, E296G, E296S, E296T, E296C, E296Y, E296N, E296K, E296R, E296H, E296D, E296Q, M298Q, M298V, M298L, M298I, M298F, M298W, M298P, M298G, M298S, M298T, M298C, M298Y, M298N, M298K, M298R, M298H, M298E, M298D, R304Y, R304F, R304L, R304M, L305V, L305Y, L305I, L305F, L305A, L305M, L305W, L305P, L305G, L305S, L305D, L305T, L305C, L305N, L305E, L305K, L305R, L305H, L305D, L305Q, M306D, M306N, D309S, D309T, S314A, S314V, S314I, S314M, S314F, S314W, S314P, S314G, S314L, S314T, S314C, S314Y, S314N, S314E, S314K, S314R, S314H, S314D, S314Q, D334G, D334E, D334A, D334V, D334I, D334M, D334F, D334W, D334P, D334L, D334T, D334C, D334Y, D334N, D334K, D334R, D334H, D334S, D334Q, S336G, S336E, S336A, S336V, S336I, S336M, S336F, S336W, S336P, S336L, S336T, S336C, S336Y, S336N, S336K, S336R, S336H, S336D, S336Q, K337L, K337V, K337I, K337M, K337F, K337W, K337P, K337G, K337S, K337T, K337C, K337Y, K337N, K337E, K337R, K337H, K337D, K337Q, F374P, F374A, F374V, F374I, F374L, F374M, F374W, F374G, F374S, F374T, F374C, F374Y, F374N, F374E, F374K, F374R, F374H, F374D, F374Q, y sustitución de las posiciones 300-322, 305-322, 300-312 o 305-312 con los aminoácidos correspondientes de tripsina, trombina o FX, y sustitución de las posiciones 310-329, 311-322 o 233-329 con los aminoácidos correspondientes de tripsina.

#### c. Modificaciones que aumentan la resistencia a proteasas

Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento también pueden contener modificaciones adicionales que dan como resultado resistencia aumentada del polipéptido a proteasas. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos que retiran uno o más sitios de escisión proteolítica potenciales. Los polipéptidos de FVII modificados pueden por lo tanto hacerse más resistentes a proteasas, aumentando de este modo la estabilidad y semivida del polipéptido modificado.

Los ejemplos de modificaciones adicionales que pueden incluirse en los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento para aumentar resistencia a proteasas incluyen, pero sin limitación, los descritos en la Patente de Estados Unidos n.º US5580560 o Solicitudes Publicadas Internacionales n.º WO1988010295 y WO2002038162. Los ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en la técnica

que pueden dar como resultado resistencia aumentada del polipéptido de FVII modificado a inhibidores y/o proteasas incluyen una cualquiera o más de K32Q, K32E, K32G, K32H, K32T, K32A, K32S, K38T, K38D, K38L, K38G, K38A, K38S, K38N, K38H, I42N, I42S, I42A, I42Q, Y44N, Y44S, Y44A, Y44Q, F278S, F278A, F278N, F278Q, F278G, R290G, R290A, R290S, R290T, R290K, R304G, R304T, R304A, R304S, R304N, R315G, R315A, R315S, R315T, R315Q, Y332S, Y332A, Y332N, Y332Q, Y332G, K341E, K341Q, K341G, K341T, K341A y K341S.

#### d. Modificaciones que aumentan la afinidad por fosfolípidos

El polipéptido de FVII modificado proporcionado en el presente documento también puede contener una o más modificaciones adicionales para aumentar la afinidad por fosfolípidos. La actividad coagulante de FVII puede potenciarse aumentando la unión y/o afinidad del polipéptido con fosfolípidos, tales como los expresados en la superficie de plaquetas activadas. Esto se puede conseguir, por ejemplo, modificando el dominio Gla de FVII endógeno. La modificación puede efectuarse por sustitución de aminoácidos en una o más posiciones en el dominio Gla de un polipéptido de FVII que da como resultado un polipéptido de FVII modificado con capacidad aumentada para unirse con fosfatidilserina y otros fosfolípidos con carga negativa. Los ejemplos de modificaciones adicionales para aumentar la unión y/o afinidad de fosfolípidos y que pueden realizarse a un polipéptido de FVII modificado proporcionado en el presente documento que contiene un dominio Gla de FVII endógeno incluyen, pero sin limitación, las descritas en Harvey *et al.* (2003) J Biol Chem 278: 8363-8369, documentos US20030100506, US20040220106, US20060240526, US6017882, US6693075, US6762286, WO200393465 y WO2004111242. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen una cualquiera o más de una inserción de una tirosina en la posición 4, o modificación de una cualquiera o más de P10Q, P10E, P10D, P10N, R28F, R28E, K32E, K32D, D33F, D33E, D33K A34E, A34D, A34I, A34L, A34M, A34V, A34F, A34W, A34Y, R36D, R36E, K38E y K38D.

#### e. Modificaciones que alteran la glucosilación

La alteración del grado, nivel y/o tipo de glucosilación de una proteína se ha descrito en la técnica como un medio para reducir la inmunogenicidad, aumentar la estabilidad, reducir la frecuencia de administración y/o reducir los efectos secundarios adversos tales como inflamación. Normalmente, esto se efectúa aumentando los niveles de glucosilación. El sitio o los sitios de glucosilación proporcionan un sitio de unión para un resto de carbohidrato en el polipéptido, de modo que cuando el polipéptido se produce en una célula eucariota con capacidad de glucosilación, se glucosila.

Hay cuatro sitios de glucosilación nativos en FVII: dos sitios de N-glucosilación en N145 y N322, y dos sitios de O-glucosilación en S52 y S60, correspondientes a las posiciones de aminoácidos en el polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3. En un ejemplo, pueden realizarse modificaciones adicionales a un polipéptido de FVII modificado proporcionado en el presente documento de modo que se altere la glucosilación en los sitios anteriores. Esto puede dar como resultado un polipéptido de FVII modificado con actividad coagulante aumentada (véase, por ejemplo, documento WO2005123916). Los ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en la técnica que pueden dar como resultado glucosilación reducida y actividad aumentada del polipéptido de FVII modificado en comparación con un polipéptido de FVII no modificado incluyen, pero sin limitación, S52A, S60A, N145Y, N145G, N145F, N145M, N145S, N145I, N145L, N145T, N145V, N145P, N145K, N145H, N145Q, N145E, N145R, N145W, N145D, N145C, N322Y, N322G, N322F, N322M, N322S, N322I, N322L, N322T, N322V, N322P, N322K, N322H, N322Q, N322E, N322R, N322W y N322C.

En otro ejemplo, pueden realizarse modificaciones adicionales a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento de modo que se introduzcan sitios de glucosilación adicionales, aumentando de este modo el nivel de glucosilación del polipéptido de FVII modificado en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. El sitio de glucosilación puede ser un sitio de glucosilación ligado a N o ligado a O. Los ejemplos de modificaciones que pueden realizarse a un polipéptido de FVII que introducen uno o más nuevos sitios de glucosilación incluyen, pero sin limitación, las que se describen en los documentos US6806063 y WO200393465. Los ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en la técnica que pueden dar como resultado glucosilación aumentada del polipéptido de FVII modificado en comparación con un polipéptido de FVII no modificado incluyen, pero sin limitación, F4S, F4T, P10N, Q21N, W41N, S43N, A51N, G58N, L65N, G59S, G59T, E82S, E82T, N95S, N95T, G97S, G97T, Y101N, D104N, T106N, K109N, G117N, G124N, S126N, T128N, A175S, A175T, G179N, I186S, I186T, V188N, R202S, R202T, I205S, I205T, D212N, E220N, I230N, P231N, P236N, G237N, V253N, E265N, T267N, E270N, R277N, L280N, G291N, P303S, P303ST, L305N, Q312N, G318N, G331N, D334N, K337N, G342N, H348N, R353N, Y357N, I361N, V376N, R379N, M391N, K32N/A34S, K32N/A34T, F31N/D33S, F31N/D33T, I30N/K32S, I30N/K32T, A34N/R36S, A34N/R36T, K38N/F40S, K38N/F40T, T37N/L39S, T37N/L39T, R36N/K38S, R36N/K38T, L39N/W41S, L39N/W41T, F40N/I42S, F40N/I42T, I42N/ Y44S, I42N/ Y44T, Y44N/ D46S, Y44N/ D46T, D46N/D48S, D46N/D48T, G47N/Q49S, G47N/Q49T, S52N/P54S, Q66N/Y68S, S119N/L121S, A122N/G124S, T128N/P129A, T130N/E132S, K143N/ N145S, K143N/ N145T, E142N/R144S, E142N/R144T, L141N/K143S, L141N/K143T, I140N/E142S/, I140N/E142T, R144N/A146S, R144N/A146T, A146N/K148S, A146N/K148T, S147N/P149S/, S147N/P149T, R290N/A292S, R290N/A292T, A292N/A294S, D289N/G291S, D289N/G291T, L288N/R290S, L288N/R290T, L287N/D289S, L287N/D289T, A292N/A294S, A292N/A294T, T293N/L295S, T293N/L295T, R315N/V317S, R315N/V317T, S314N/K316S, S314N/K316T, Q313N/R315S, Q313N/R315T, K316N/G318S, K316N/G318T, V317N/D319S, V317N/D319T, K341N/D343S, K341N/



D343T, S339N/K341S, S339N/K341T, D343N/G345S, D343N/G345T, R392N/E394S, R392N/E394T, L390N/R392S, L390N/R392T, K389N/M391S, K389N/M391T, S393N/P395S, S393N/P395T, E394N/R396S, E394N/R396T, E394N/P395A/R396S, P395N/P397S, P395N/P397T, R396N/G398S, R396N/G398T, P397N/V399S, P397N/V399T, G398N/L400S, G398N/L400T, V399N/L401S, V399N/L401T, L400N/R402S, L400N/R402T, L401N/A403S, L401N/A403T, R402N/P404S, R402N/P404T, A403N/F405S, A403N/F405T, P404N/P406S y P404N/P406T.

#### f. Modificaciones para facilitar el enlace de grupo químico

También pueden realizarse modificaciones adicionales de un polipéptido de FVII modificado proporcionado en el presente documento para facilitar el enlace posterior de un grupo químico. Pueden realizarse una o más sustituciones o inserciones de aminoácidos de modo que un grupo químico puede enlazarse con un polipéptido de FVII modificado mediante el aminoácido sustituido. Por ejemplo, puede introducirse una cisteína en un polipéptido de FVII modificado, al que puede unirse un resto de polietilenglicol (PEG) para conferir estabilidad y semivida en suero aumentadas. Otros restos de unión incluyen restos de lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. En algunos ejemplos, se reemplazan restos de aminoácidos para reducir el número de posiciones de enlace potenciales. Por ejemplo, el número de lisinas puede reducirse. Los ejemplos de modificaciones que pueden realizarse a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de FVII que pueden facilitar el enlace posterior con un grupo químico incluyen, pero sin limitación, las que se describen en los documentos US20030096338, US20060019336, US6806063, WO200158935 y WO2002077218. Los ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares de un polipéptido de FVII que pueden facilitar el enlace posterior con un grupo químico incluyen, pero sin limitación: Q250C, R396C, P406C, I42K, Y44K, L288K, D289K, R290K, G291K, A292K, T293K, Q313K, S314K, R315K, V317K, L390K, M391K, R392K, S393K, E394K, P395K, R396K, P397K, G398K, V399K, L400K, L401K, R402K, A403K, P404K, F405K, I30C, K32C, D33C, A34C, T37C, K38C, W41C, Y44C, S45C, D46C, L141C, E142C, K143C, R144C, L288C, D289C, R290C, G291C, A292C, S314C, R315C, K316C, V317C, L390C, M391C, R392C, S393C, E394C, P395C, R396C, P397C, G398C, V399C, L401C, R402C, A403C, P404C, I30D, K32D, A34D, T37D, K38D, W41D, Y44D, S45D, D46C, L141D, E142D, K143D, R144D, L288D, R290D, G291D, A292D, Q313D, S314D, R315D, K316D, V317D, L390D, M391D, R392D, S393D, P395D, R396D, P397D, G398D, V399D, L401D, R402D, A403D, P404D, I30E, K32E, A34E, T37E, K38E, W41E, Y44E, S45E, D46C, L141E, E142E, K143E, R144E, L288E, R290E, G291E, A292E, Q313E, S314E, R315E, K316E, V317E, L390E, M391E, R392E, S393E, P395E, R396E, P397E, G398E, V399E, L401E, R402E, A403E, P404E, K18R, K32R, K38R, K62R, K85R, K109R, K137R, K143R, K148R, K157R, K161R, K197R, K199R, K316R, K337R, K341R, K389R, K18Q, K32Q, K38Q, K62Q, K85Q, K109Q, K137Q, K143Q, K148Q, K157Q, K161Q, K197Q, K199Q, K316Q, K337Q, K341Q, K389Q, K18N, K32N, K38N, K62N, K85N, K109N, K137N, K143N, K148N, K157N, K161N, K197N, K199N, K316N, K337N, K341N, K389N, K18H, K32H, K38H, K62H, K85H, K109H, K137H, K143H, K148H, K157H, K161H, K197H, K199H, K316H, K337H, K341H y K389H.

#### g. Mutaciones de combinación ejemplares

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que tienen dos o más modificaciones diseñadas para afectar a una o propiedades o actividades de un polipéptido de FVII no modificado. En algunos ejemplos, las dos o más modificaciones alteran dos o más propiedades o actividades del polipéptido de FVII. Las modificaciones pueden realizarse a los polipéptidos de FVII de modo que se alteren una o más de actividad catalítica, resistencia a AT-III, resistencia a IRFT, resistencia a inhibición por  $Zn^{2+}$ , actividad intrínseca, actividad amidolítica, unión y/o afinidad por fosfolípidos, glucosilación, resistencia a proteasas, semivida e interacción con otros factores o moléculas, tales como FX, FIX, albúmina de suero e integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Típicamente, las dos o más modificaciones se combinan de modo que el polipéptido de FVII modificado resultante tenga actividad coagulante aumentada, duración de la actividad coagulante aumentada y/o un índice terapéutico potenciado en comparación con un polipéptido de FVII no modificado. Las modificaciones pueden incluir sustitución, inserción o delección de aminoácidos. La actividad coagulante aumentada, duración de la actividad coagulante aumentada y/o un índice terapéutico potenciado del polipéptido de FVII modificado que contiene dos o más modificaciones puede aumentarse en al menos o aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la actividad del polipéptido de FVIIa de partida o no modificado.

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen dos o más modificaciones que se introducen en un polipéptido de FVII no modificado para alterar dos o más actividades o propiedades. Los polipéptidos de FVII modificados pueden contener 2, 3, 4, 5, 6 modificaciones. Además, cada modificación puede implicar uno o más restos de aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado puede contener dos modificaciones cada una de las cuales es una sustitución de un único aminoácido. En otro ejemplo, un polipéptido de FVII modificado puede contener dos modificaciones, una de las cuales es una sustitución de un único aminoácido y la otra de las cuales implica la delección de más de un resto de aminoácido y después inserción de más de un resto de aminoácido. Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado proporcionado en el presente documento puede contener la sustitución de aminoácidos S222A (restos correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) para alterar la unión con  $Zn^{2+}$  y una modificación de Intercambio de Gla FIX, que implica la delección del dominio Gla de FVII endógeno suprimiendo los restos de aminoácidos A1 a Y44 (restos

correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) e inserción de 45 restos de aminoácidos que corresponden a los restos de aminoácidos Y1 a Y45 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83.

5 Los polipéptidos de FVII modificados pueden tener dos o más modificaciones seleccionadas solamente de las expuestas en las Tablas 5 a 13. En otros ejemplos, el polipéptido de FVII modificado contiene dos o más modificaciones donde una o más modificaciones se seleccionan de las expuestas en las Tablas 5 a 13 y una o más modificaciones son modificaciones adicionales que no se exponen en las Tablas 5 a 13, tales como, por ejemplo, modificaciones descritas en la técnica. En algunos ejemplos, la o las modificaciones adicionales pueden seleccionarse de las expuestas en la Sección D.6.a-e, anterior. Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado puede contener una modificación en uno o más de los restos de aminoácidos D196, K197, K199, G237, T239, R290 o K341 basándose en la numeración de un FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3 (correspondiente a D60, K60a, K60c, G97, T99, R147 y K192, respectivamente, basándose en la numeración de quimotripsina), que puede aumentar la resistencia a IRFT, y una modificación en uno o más restos de aminoácidos que afecta a la actividad intrínseca, tal como, por ejemplo, V158 y M298, (V21 y M156, respectivamente, basándose en la numeración de quimotripsina). Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado puede contener dos sustituciones de aminoácidos que aumentan la resistencia a IRFT, tales como K197E y G237V, y una sustitución de aminoácidos que aumenta la actividad intrínseca, tal como M298Q, que da como resultado un polipéptido de FVII con actividad coagulante aumentada.

20 Son ejemplos de las modificaciones de combinación proporcionadas en el presente documento las que incluyen al menos la mutación Q286R (numeración correspondiente al polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3; correspondiente a Q143R por numeración de quimotripsina). Los polipéptidos de FVII modificados que contienen la modificación Q286R pueden contener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 modificaciones adicionales. Estas modificaciones adicionales pueden incluirse, por ejemplo, para alterar la actividad catalítica, resistencia a AT-III, resistencia a IRFT, resistencia a la inhibición por  $Zn^{2+}$ , actividad intrínseca, actividad amidolítica, unión y/o afinidad con fosfolípidos, glucosilación, resistencia a proteasas, semivida e interacción con otros factores o moléculas, tales como FX, FIX, albúmina de suero e integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Típicamente, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento que contienen dos o más modificaciones donde una modificación es la sustitución de aminoácidos Q286R, muestran actividad coagulante aumentada en comparación con el polipéptido de FVII de tipo silvestre.

35 En algunos ejemplos, los polipéptidos de FVII modificados que contienen dos o más modificaciones, donde una es Q286R, muestran actividad catalítica y coagulante aumentada en comparación con el polipéptido de tipo silvestre así como en comparación con un polipéptido de FVII que contiene una cualquiera de las mutaciones sola. Por ejemplo, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FVII modificados que contienen las sustituciones de aminoácidos tanto Q286R como M289Q (Q286R/M298Q con numeración correspondiente al polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3; correspondiente a Q143R/M156Q por numeración de quimotripsina). El mutante de FVII de combinación Q286R/M298Q muestra actividad catalítica aumentada para su sustrato, Factor X, en comparación con FVII de tipo silvestre, el mutante individual Q286R y el mutante individual M298Q (véase por ejemplo Ejemplo 4, posteriormente). Por ejemplo, en un estudio, el mutante M298Q mostró una actividad catalítica para FX, en presencia de FT, que era aproximadamente 1,8 a 2 veces mayor que la del polipéptido de tipo silvestre, la actividad catalítica del mutante Q286R fue aproximadamente 2,1 veces mayor que la del polipéptido de FVII de tipo silvestre, y el mutante Q286R/M298Q mostró una actividad catalítica para FX que era aproximadamente 3,6-4,4 veces la actividad catalítica del polipéptido de tipo silvestre para FX (véase la Tabla 15, posterior).

50 Se proporcionan modificaciones de combinación ejemplares no limitantes en la Tabla 12. Estas modificaciones de combinación ejemplares incluyen dos o más modificaciones que se diseñan para alterar dos o más actividades o propiedades de un polipéptido de FVII, incluyendo, pero sin limitación, resistencia a IRFT, resistencia a AT-III, actividad intrínseca, actividad amidolítica, actividad catalítica, unión con  $Zn^{2+}$ , unión y/o afinidad con fosfolípidos, glucosilación, resistencia a proteasas, semivida e interacción con otros factores o moléculas, tales como FX y FIX. Los polipéptidos de FVII modificados que contienen dichas modificaciones de combinación pueden tener actividad coagulante aumentada, duración de la actividad coagulante aumentada y/o un índice terapéutico potenciado. Las modificaciones expuestas en la Tabla 12 posterior usan los mismos sistemas de nomenclatura y numeración que se han descrito en las Tablas 5 a 11, anteriores. Por ejemplo, la modificación de "Intercambio de Gla FIX" implica la delección del dominio Gla de FVII endógeno suprimiendo los restos de aminoácidos A1 a Y44 (restos correspondientes a un polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) e inserción de 45 restos de aminoácidos que corresponden a los restos de aminoácidos Y1 a Y45 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83, como se ha descrito anteriormente. En algunos ejemplos, la modificación de "Intercambio de Gla FIX" también contiene una o más sustituciones de aminoácidos en la parte de dominio Gla de FIX en comparación con un dominio Gla FIX de tipo silvestre, como se ha analizado anteriormente. Por ejemplo, la modificación de FIX de intercambio de Gla también puede incluir una sustitución de aminoácido M19K (numeración correspondiente a las posiciones de aminoácidos del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83). Dicha modificación se indica por {Intercambio de Gla FIX/M19K}, es decir el polipéptido de FVII modificado contiene un dominio Gla de FIX heterólogo en el que la metionina en la posición correspondiente a la posición 19 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83 se reemplaza con una lisina. Por lo tanto, se hace referencia a modificaciones realizadas a las

partes de dominio Gla de FIX heterólogo usando posiciones de aminoácidos correspondientes a posiciones de aminoácidos del polipéptido de FIX de tipo silvestre maduro, o el dominio Gla de FIX de tipo silvestre expuesto en SEQ ID NO: 83. Se hace referencia a modificaciones realizadas a las posiciones de aminoácidos en el polipéptido de FVII usando las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido de FVII maduro como se expone en SEQ ID NO: 3 y también se denomina por el esquema de numeración de quimotripsina. Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado que contiene la modificación Q286R (numeración correspondiente al polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3), y una modificación de Intercambio de Gla FIX, donde el dominio Gla de FIX contiene la sustitución de aminoácidos M19K (numeración correspondiente a las posiciones de aminoácidos del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83), se indica por {Intercambio de Gla FIX/M19K}/Q286R. De forma similar, la modificación {Intercambio de Gla FIX/Q44S}/Q286R/M298Q indica que el polipéptido de FVII contiene una modificación de intercambio de Gla FIX donde la glutamina en la posición de aminoácido correspondiente en la posición de aminoácido 44 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83 se reemplaza con una serina, y también contiene las sustituciones de aminoácidos Q286R y M298Q, con numeración correspondiente al polipéptido de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3. En la Tabla 12 posterior, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se exponen secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido de FVII modificado.

**Tabla 12**

<b>Modificación - numeración de FVII maduro</b>	<b>Modificación - numeración de quimotripsina</b>	<b>SEQ ID NO</b>
Intercambio de Gla FIX/Q286R	Intercambio de Gla FIX/Q143R	131
Q286R/H257A	H117A/Q143R	132
S222A/Q286R	S82A/Q143R	133
Q286R/S222A/H257A	S82A/H117A/Q143R	134
Intercambio de Gla FIX /S222A/Q286R	S82A/Intercambio de Gla FIX/Q143R	135
Intercambio de Gla FIX/H257A/Q286R	H117A/Intercambio de Gla FIX/Q143R	136
Intercambio de Gla FIX /S222A/H257A/Q286R	Q143R/S82A/H117A/Intercambio de Gla FIX	137
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	138
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q	139
K199E/Q286R/M298Q	K60cE/Q143R/M156Q	140
Intercambio de Gla FIX/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/Q143R/M156Q	141
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V	142
Q286R/A292N/A294S/Q366V	Q143R/A150N/A152S/Q217V	143
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	144
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V	145
H257S/Q286R	H117S/Q143R	146
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	147
S222A/H257A/Q286R/Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	148
Q286R/H373A	Q143R/H224A	149
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	150
Q286R/K341D	Q143R/K192D	151
Q286R/Q366D	Q143R/Q217D	152
Q286R/Q366N	Q143R/Q217N	153
Q286R/M298Q/Q366D	Q143R/M156Q/Q217D	154
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	155
Q286R/H373F	Q143R/H224F	156
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	157
Intercambio de Gla FIX/S222A	Intercambio de Gla FIX/S82A	245
Intercambio de Gla FIX/H257A	Intercambio de Gla FIX/H117A	246
Intercambio de Gla FIX/S222A/H257A	Intercambio de Gla FIX/S82A/H117A	247
S222A/M298Q	S82A/M156Q	248
H257A/M298Q	H117A/M156Q	249
S222A/H257A/M298Q	S82A/H117A/M156Q	250
S222A/A292N/A294S/Q366V	S82A/A150N/A152S/Q217V	251
A175S/S222A/Q366V	A39S/S82A/Q217V	252
S222A/Q366V	S82A/Q217V	253
H257S/Q366V	H117S/Q217V	254
S222A/H373A	S82A/H224A	255

ES 2 577 055 T3

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
V158T/L287T/M298K	V21T/L144T/M156K	256
V158D/L287T/M298K	V21D/L144T/M156K	257
S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V	S[103]S[111]delinsIEDICLPRWGCLWE/G97V	258
S103S111delinsDiCLPRWGCLWED/G237V	S[103]S[111]delinsDiCLPRWGCLWED/G97V	259
H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V	H[115]S[126]delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G97V	260
H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V	H[115]S[126]delinsIEDICLPRWGCLWE/G97V	261
H115S126delinsDiCLPRWGCLWED/G237V	H[115]S[126]delinsDiCLPRWGCLWED/G97V	262
T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V	T[128]P[134]delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G97V	263
T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V	T[128]P[134]delinsIEDICLPRWGCLWE/G97V	264
S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V	S[103]S[111]delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G97V	265
T128P134delinsDiCLPRWGCLWED/G237V	T[128]P[134]DiCLPRWGCLWED/G97V	266
S103S111delinsSFGRGDIRNV/G237V	S[103]S[111]delinsSFGRGDIRNV/G97V	267
H115S126delinsSFGRGDIRNV/G237V	H[115]S[126]delinsSFGRGDIRNV/G97V	268
T128P134delinsSFGRGDIRNV/G237V	T[128]P[134]delinsSFGRGDIRNV/G97V	269
M298Q/H373F	M156Q/H224F	270
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	271
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	272
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	273
{Intercambio de Gla FIX/E40L}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/E[40]L}/Q143R/M156Q	274
{Intercambio de Gla FIX/K431}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/K[43]I}/Q143R/M156Q	275
{Intercambio de Gla FIX/Q44SJ}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/Q144S}/Q143R/M156Q	276
{Intercambio de Gla FEX/M19K}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FEX/M[19]K}/Q143R/M156Q	277
{Intercambio de Gla FIX/M19K/E40L/K43I/Q44S}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/M[19]K/E[40]L/K[43]I/Q[44]S}/Q143R/M156Q	278
T128N/P129A/Q286R	T[128]N/P[129]A/Q143R	279
T128N/P129A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	280
T128N/P129A/Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H224F	281
V158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	282
T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q	T[128]N/P[129]A/V21D/E154V/M156Q	283
T128N/P129A/S222A	T[128]N/P[129]A/S82A	284
Intercambio de GlaFIX/T128N/P129A/S222A/Q286R	Intercambio de GlaFIX/T[128]N/P[129]A/S82A/Q143R	285
Intercambio de GlaFIX/T128N/P129A/Q286R/M298Q	Intercambio de GlaFIX/T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	286
T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/H117A/Q143R/M156Q	287
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/H224F	288
S52A/S60A/V158D/E296V/M298Q	S[52]A/S[60]A/V21D/E154V/M156Q	289
S52A/S60A/Q286R	S[52]A/S[60]A/Q143R	290
S52A/S60A/S222A	S[52]A/S[60]A/S82A	291
Intercambio de GlaFIX/S52A/S60A/S222A/Q286R	Intercambio de GlaFIX/S[52]A/S[60]A/S82A/Q143R	292
S52A/S60A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q	293
Intercambio de GlaFIX/S52A/S60A/Q286R/M298Q	Intercambio de GlaFIX/S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q	294
S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H117A/Q143R/M156Q	298

ES 2 577 055 T3

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
S52A/S60A/Q286R/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/H224F	296
S52A/S60A/Q286R/M298Q/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q/H224F	297
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	298
T239V/Q286R	T99V/Q143R	299
S222A/T239V	S82A/T99V	300
Intercambio de Gla FIX /S222A/T239V/Q286R	Intercambio de Gla FIX/S82A/T99V/Q143R	301
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	302
S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/M156 0	303
Intercambio de GlaFIX/T239V/Q286R/M298Q	Intercambio de GlaFIX/T99V/Q143R/M156Q	304
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	305
T239V/Q286R/M298Q/H373F	T99V/Q143R/M156Q/H224F	306
V158D/T239I/E296V/M298Q	V21D/T99I/E154V/M156Q	307
T239I/Q286R	T99I/Q143R	308
S222A/T239I	S82A/T99I	309
Intercambio de GlaFIX/S222A/T239I/Q286R	Intercambio de GlaFIX/S82A/T99I/Q143R	310
T239I/Q286R/M298Q	T99I/Q143R/M156Q	311
S222A/T239I/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99I/H117A/Q143R/M156Q	312
Intercambio de GlaFIX/T239I/Q286R/M298Q	Intercambio de GlaFIX/T99I/Q143R/M156Q	313
T239I/Q286R/H373F	T99I/Q143R/H224F	314
T239I/Q286R/M298Q/H373F	T99I/Q143R/M156Q/H224F	315
Intercambio de GlaFIX/S222A/Q286R/H373F	Intercambio de GlaFIX/S82A/Q143R/H224F	316
Intercambio de GlaFIX/S222A/Q286R/M298Q	Intercambio de GlaFIX/S82A/Q143R/M156Q	317
Intercambio de GlaFIX/S222A/Q286R/M298Q/H373F	Intercambio de GlaFIX/S82A/Q143R/M156Q/H224F	318
V158D/E296V/M298Q/H373F	V21D/E154V/M156Q/H224F	319
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F	V21D/Q143R/E154V/M156Q/H224F	320
H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	321
H257S/Q286R/M298Q	H117S/Q143R/M156Q	322
Intercambio de GlaFIX/S222A/H257S/Q286R	Intercambio de GlaFIX/S82A/H117S/Q143R	323
S222A/H257S/Q286R/M298Q	S82A/H117S/Q143R/M156Q	324
H257S/Q286R/M298Q/H373F	H117S/Q143R/M156Q/H224F	325
S222A/Q286R/M298Q/H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	326
Intercambio de GlaFIX/Q366V	Intercambio de GlaFIX/Q217V	327
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	328
T128N/P129A/A175S/Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/Q217V	329
A122N/G124S/A175S/Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/Q217V	330
T128N/P129A/A175S/S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A	331
A122N/G124S/A175S/S222A	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A	332
T128N/P129A/A175S/Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R	333
A122N/G124S/A175S/Q286R	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R	334
Intercambio de GlaFIX/T128N/P129A/A175S/S222A/Q286R	Intercambio de GlaFIX/T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/Q143R	335
Intercambio de GlaFIX/A122N/G124S/A175S/S222A/Q286R	Intercambio de GlaFIX/A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/Q143R	336
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156Q	337
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q	338
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	339
A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	340

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156Q/H224F	341
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q/H224F	342
T128N/P129A/M298Q	T[128]N/P[129]A/M156Q	354
{Intercambio de Gla FIX/K43}/T128N/P129A/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/K[43]}/T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	355
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N	356
{Intercambio de Gla FIX/K43}/Q286R/M298Q/Q366N	{Intercambio de Gla FIX/K[43]}/Q143R/M156Q/Q217N	357
{Intercambio de Gla FIX/K43}/T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N	{Intercambio de Gla FIX/K[43]}/T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N	358
T128N/P129A/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/M156Q/H224F	359
V158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	360
M298Q/Q366N/H373F	M156Q/Q217N/H224F	361
T239V/M298Q/H373F	T99V/M156Q/H224F	362
T239I/M298Q/H373F	T99I/M156Q/H224F	363
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N/H224F	364
T239V/Q286R/M298Q/Q366N	T99V/Q143R/M156Q/Q217N	365
T239I/Q286R/M298Q/Q366N	T99I/Q143R/M156Q/Q217N	366
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q	367
T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q	368
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q/H224F	369
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M156Q	370
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M156Q/H224F	371

### E. Producción de polipéptidos de FVII

5 Pueden obtenerse polipéptidos de FVII, incluyendo polipéptidos de FVII modificados, o dominios de los mismos de FVII u otro polipéptido de vitamina K, por métodos bien conocidos en la técnica para purificación de proteínas y expresión de proteínas recombinantes. Puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la materia para identificación de ácidos nucleicos que codifiquen genes deseados. Puede usarse cualquier método disponible en la técnica para obtener un ADNc de longitud completa (es decir, que abarca la región codificante completa) o clon de ADN genómico que codifica un polipéptido de FVII u otro polipéptido de vitamina K, tal como de una fuente celular o tisular, tal como por ejemplo del hígado. Los polipéptidos de FVII modificados pueden modificarse técnicamente como se describe en el presente documento, tal como por mutagénesis dirigida.

15 FVII puede clonarse o aislarse usando cualquier método disponible conocido en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Dichos métodos incluyen amplificación por PCR de ácidos nucleicos y exploración de bibliotecas, incluyendo exploración de hibridación de ácidos nucleicos, exploración basada en anticuerpos y exploración basada en actividad.

20 Pueden usarse métodos para amplificación de ácidos nucleicos para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de FVII, incluyendo por ejemplo, métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Puede usarse un material que contiene ácido nucleico como un material de partida a partir del que puede aislarse una molécula de ácido nucleico que codifica FVII. Por ejemplo, pueden usarse preparaciones de ADN y ARNm, extractos celulares, extractos tisulares (por ejemplo de hígado), muestras de fluidos (por ejemplo sangre, suero, saliva), muestras de sujetos sanos y/o enfermos en métodos de amplificación. También pueden usarse bibliotecas de ácido nucleico como una fuente de material de partida. Los cebadores pueden diseñarse para amplificar una molécula codificante de FVII. Por ejemplo, los cebadores pueden diseñarse basándose en secuencias expresadas a partir de las que se genera un FVII. Los cebadores pueden diseñarse basándose en la retrotraducción de una secuencia de aminoácidos de FVII. Las moléculas de ácido nucleico generadas por amplificación pueden secuenciarse y puede confirmarse que codifican un polipéptido de FVII.

30 Las secuencias de nucleótidos adicionales pueden unirse con una molécula de ácido nucleico que codifica FVII, incluyendo secuencias enlazadoras que contienen sitios de endonucleasas de restricción para el fin de clonar el gen

sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteínas o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias de ADN que codifican proteínas centrales. Además, secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales pueden unirse operativamente con una molécula de ácido nucleico que codifica FVII. Los ejemplos de dichas secuencias incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de proteínas intracelulares y secuencias de secreción diseñadas para facilitar la secreción de proteínas. Secuencias de nucleótidos adicionales tales como secuencias que especifican regiones de unión a proteínas también pueden ligarse con moléculas de ácido nucleico que codifican FVII. Dichas regiones incluyen, pero sin limitación, secuencias para facilitar la captación de FVII en células diana específicas, o potenciar de otro modo la farmacocinética del gen sintético.

Los ácidos nucleicos identificados y aislados pueden después insertarse en un vector de clonación apropiado. Puede usarse un gran número de sistemas de vector-hospedador conocidos en la técnica. Los vectores posibles incluyen, pero sin limitación, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula hospedadora usada. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, bacteriófagos tales como derivados lambda, o plásmidos tales como derivados de plásmidos pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). La inserción en un vector de clonación puede conseguirse, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene extremos terminales cohesivos complementarios. La inserción puede efectuarse usando vectores de clonación TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente. Como alternativa, puede producirse cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) en los extremos terminales del ADN; estos enlazadores ligados pueden contener oligonucleótidos sintetizados químicamente específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen de proteína FVII puede modificarse por adición de colas homopoliméricas. Pueden introducirse moléculas recombinantes en células hospedadoras mediante, por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se generan muchas copias de la secuencia génica.

En ejemplos específicos, la transformación de células hospedadoras con moléculas de ADN recombinantes que incorporan el gen de proteína de FVII aislado, ADNc o secuencia de ADN sintetizada permite la generación de múltiples copias del gen. Por lo tanto, el gen puede obtenerse en grandes cantidades cultivando transformantes, aislando las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperando el gen insertado del ADN recombinante aislado.

### 1. Vectores y células

Para expresión recombinante de una o más de las proteínas de FVII, el ácido nucleico que contiene toda o una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de FVII puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de proteína insertada. Es un ejemplo de dicho vector cualquier vector de expresión de mamífero tal como, por ejemplo, pCMV. Las señales de transcripción y traducción necesarias también pueden proporcionarse por el promotor nativo para un gen de FVII, y/o sus regiones flanqueantes.

También se proporcionan vectores que contienen ácido nucleico que codifica el FVII o FVII modificado. También se proporcionan células que contienen los vectores. Las células incluyen células eucariotas y procariotas, y los vectores son cualquiera adecuado para su uso en las mismas.

Se proporcionan células procariotas y eucariotas, incluyendo células endoteliales, que contienen los vectores. Dichas células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, arqueas, células vegetales, células de insecto y células animales. Las células se usan para producir un polipéptido de FVII o polipéptido de FVII modificado del mismo cultivando las células anteriormente descritas en condiciones por las que la proteína de FVII codificada se expresa por la célula, y recuperando la proteína de FVII expresada. Para fines del presente documento, el FVII puede secretarse al medio.

En un ejemplo, se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de FVII y contiene todo o una parte del polipéptido de FVII, o múltiples copias del mismo. Los vectores pueden seleccionarse para expresión del polipéptido de FVII o polipéptido de FVII modificado del mismo en la célula o de modo que la proteína de FVII se exprese como una proteína secretada. Cuando el FVII se expresa el ácido nucleico se une a ácido nucleico que codifica una señal de secreción, tal como la secuencia señal del factor de apareamiento  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* o una parte de la misma, o la secuencia señal nativa.

Puede usarse una diversidad de sistemas de hospedador-vector para expresar la secuencia codificante de proteínas. Estos incluyen pero sin limitación sistemas de células de mamíferos infectados con virus (por ejemplo virus vaccinia, adenovirus y otros virus); sistemas de células de insectos infectadas con virus (por ejemplo baculovirus); microorganismos tales como levadura que contiene vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico o ADN cosmídico. Los elementos de expresión de vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiendo del sistema de hospedador-vector usado, puede usarse uno cualquiera de

varios elementos de transcripción y traducción adecuados.

Puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la materia para la inserción de fragmentos de ADN en un vector para construir vectores de expresión que contengan un gen quimérico que contenga señales de control de la transcripción/traducción apropiadas y secuencias codificantes de proteínas. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante *in vitro* y sintéticas y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido de FVII o polipéptido de FVII modificado, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos, puede regularse por una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que los genes o fragmentos de los mismos se expresen en un hospedador transformado con la molécula o las moléculas de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede controlarse por cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En un ejemplo específico, el promotor no es nativo de los genes para una proteína de FVII. Los promotores que pueden usarse incluyen pero sin limitación el promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290: 304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.* Cell 22: 787-797 (1980)), el promotor de timidina quinasa del herpes (Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster *et al.*, Nature 296: 39-42 (1982)); vectores de expresión procariotas tales como el promotor de  $\beta$ -lactamasa (Jay *et al.*, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 5543) o el promotor *tac* (DeBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25 (1983)); véase también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American 242: 79-94 (1980)); vectores de expresión vegetales que contienen el promotor de nopalina sintetasa (Herrera-Estrella *et al.*, Nature 303: 209-213 (1984)) o el promotor de ARN de 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner *et al.*, Nucleic Acids Res. 9: 2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bisfosfato carboxilasa (Herrera-Estrella *et al.*, Nature 310: 115-120 (1984)); elementos promotores de levadura y otros hongos tales como el promotor de Gal4, el promotor de alcohol deshidrogenasa, el promotor de fosfoglicerol quinasa, el promotor de alcalina fosfatasa, y las siguientes regiones de control de la transcripción animales que muestran especificidad tisular y se han usado en animales transgénicos: región de control del gen de la elastasa I que está activa en células de acinos pancreáticos (Swift *et al.*, Cell 38: 639-646 (1984); Ornitz *et al.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7: 425-515 (1987)); región de control del gen de la insulina que está activa en células beta pancreáticas (Hanahan *et al.*, Nature 315: 115-122 (1985)), región de control del gen de la inmunoglobulina que está activa en células linfoides (Grosschedl *et al.*, Cell 38: 647-658 (1984); Adams *et al.*, Nature 318: 533-538 (1985); Alexander *et al.*, Mol. Cell Biol. 7: 1436-1444 (1987)), región de control del virus del tumor mamario de ratón que está activa en células testiculares, mamarias, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, Cell 45: 485-495 (1986)), región de control del gen de albúmina que está activa en el hígado (Pinckert *et al.*, Genes and Devel. 1: 268-276 (1987)), región de control del gen de la fetoproteína alfa que está activa en hígado (Krumlauf *et al.*, Mol. Cell Biol. 5: 1639-1648 (1985); Hammer *et al.*, Science 235: 53-58 (1987)), región de control del gen de antitripsina alfa 1 que está activa en hígado (Kelsey *et al.*, Genes and Devel. 1: 161-171 (1987)), región de control del gen de beta globina que está activa en células mieloides (Mogram *et al.*, Nature 315: 338-340 (1985); Kollias *et al.*, Cell 46: 89-94 (1986)), región de control del gen de la proteína básica de mielina que está activa en célula oligodendrocíticas del cerebro (Readhead *et al.*, Cell 48: 703-712 (1987)), región de control del gen de cadena ligera de miosina 2 que está activa en músculo esquelético (Shani, Nature 314: 283-286 (1985)), y región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que está activa en gonadotropos del hipotálamo (Mason *et al.*, Science 234: 1372-1378 (1986)).

En un ejemplo específico, se usa un vector que contiene un promotor unido operativamente con ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de FVII o polipéptido de FVII modificado, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo, del mismo, uno o más orígenes de replicación y, opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Los vectores y sistemas de expresión de polipéptidos de FVII incluyen los vectores de *Pichia* bien conocidos (disponibles, por ejemplo, de Invitrogen, San Diego, CA), particularmente los diseñados para secreción de las proteínas codificadas. Los vectores plasmídicos ejemplares para expresión en células de mamífero incluyen, por ejemplo, pCMV. Los vectores plasmídicos ejemplares para transformación de células de *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA; véase también bibliografía publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor T5 de fagos (reconocido por ARN polimerasa de *E. coli*) y un módulo de represión de operador lac doble para proporcionar expresión de alto nivel, estrechamente regulada, de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión ribosómico sintético (RBS II) para traducción eficaz, una secuencia codificante de marcador His6X, terminadores de la transcripción T1 y T0, origen de replicación ColE1, y un gen de beta-lactamasa para conferir resistencia a ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de un marcador His6X en el extremo N o C terminal de la proteína recombinante. Dichos plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30, y pQE 31 que proporcionan múltiples sitios de clonación para las tres fases de lectura y posibilitan la expresión de proteínas marcadas con His6x en el extremo N terminal. Otros vectores plasmídicos ejemplares para transformación de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión de pET (véase, patente de Estados Unidos 4.952.496; disponible de NOVAGEN, Madison, WI; véase también bibliografía publicada por Novagen que describe el sistema). Dichos plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T7lac, el terminador T7, el operador de lac de *E. coli* inducible, y el gen represor de lac; pET 12a-c, que contiene el promotor de T7, terminador de T7 y la señal de secreción de ompT de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (NOVAGEN, Madison, WI), que contienen una secuencia líder His-Tag™ para su uso en purificación con una columna de His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de purificación sobre la columna, la región promotora de lac de T7 y el terminador de T7.



## 2. Sistemas de expresión

Pueden producirse polipéptidos de FVII (modificados y no modificados) por cualquier método conocido en la técnica para producción de proteínas incluyendo métodos *in vitro* e *in vivo* tales como, por ejemplo, la introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican FVII en una célula hospedadora, animal hospedador y expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican FVII *in vitro*. Pueden expresarse FVII y polipéptidos de FVII modificados en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades requeridas y formas de un polipéptido de FVII necesario para administración y tratamiento. Los hospedadores de expresión incluyen organismos procariotas y eucariotas tales como *E. coli*, levadura, plantas, células de insecto, células de mamífero, incluyendo líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los hospedadores de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas así como los tipos de modificaciones postraduccionales que están presentes en las proteínas expresadas. La elección de hospedador de expresión puede realizarse basándose en estos y otros factores, tales como consideraciones reguladoras y de seguridad, costes de producción y la necesidad y los métodos de purificación.

La expresión en hospedadores eucariotas puede incluir expresión en levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, células de insecto tales como células de *Drosophila* y células de lepidópteros, plantas y células vegetales tales como tabaco, maíz, arroz, algas y lemna. Las células eucariotas para expresión también incluyen líneas celulares de mamífero tales como células de ovario de hámster Chino (CHO) o células de riñón de cría de hámster (BHK). Los hospedadores de expresión eucariotas también incluyen producción en animales transgénicos, por ejemplo, incluyendo producción en suero, leche y huevos. Se conocen en la técnica animales transgénicos para la producción de polipéptidos de FVII de tipo silvestre (Publicaciones de Patente de Estados Unidos n.º 20020166130 y 20040133930) y pueden adaptarse para la producción de polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento.

Muchos vectores de expresión están disponibles y se conocen por los expertos en la materia para la expresión de FVII. La elección del vector de expresión está influida por la elección del sistema de expresión hospedador. Dicha selección está dentro del nivel de experiencia del experto en la materia. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores de la transcripción y opcionalmente potenciadores, señales de traducción, y señales de terminación de la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión que se usan para transformación estable típicamente tienen un marcador seleccionable que permite la selección y el mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, puede usarse un origen de replicación para amplificar el número de copias de los vectores en las células.

FVII o polipéptidos de FVII modificados también pueden utilizarse o expresarse como fusiones de proteínas. Por ejemplo, una fusión puede generarse para añadir funcionalidad adicional a un polipéptido. Los ejemplos de proteínas de fusión incluyen, pero sin limitación, fusiones de una secuencia señal, o un marcador tal como para localización, por ejemplo un marcador de his<sub>6</sub> o un marcador de myc, o un marcador para purificación, por ejemplo, una fusión de GST, y una secuencia para dirigir la secreción de proteínas y/o asociación a membrana.

En un ejemplo, el polipéptido de FVII o polipéptidos FVII modificados pueden expresarse en una forma activa, por lo que se consigue activación por autoactivación del polipéptido después de secreción. En otro ejemplo, la proteasa se expresa en una forma de zimógeno, inactiva.

Los métodos de producción de polipéptidos de FVII pueden incluir coexpresión de uno o más polipéptidos heterólogos adicionales que pueden ayudar en la generación de los polipéptidos de FVII. Por ejemplo, dichos polipéptidos pueden contribuir al procesamiento postraduccionales de los polipéptidos de FVII. Los polipéptidos ejemplares incluyen, pero sin limitación, peptidasas que ayudan a escindir secuencias precursoras de FVII, tales como la secuencia de propéptido y enzimas que participan en la modificación del polipéptido de FVII, tal como por glucosilación, hidroxilación, carboxilación o fosforilación, por ejemplo. Una peptidasa ejemplar que puede coexpresarse con FVII es PACE/furina (o PACE-SOL), que ayuda en la escisión de la secuencia propeptídica de FVII. Una proteína ejemplar que ayuda en la carboxilación del polipéptido de FVII es la enzima sensible a warfarina vitamina K 2,3-epóxido reductasa (VKOR), que produce vitamina K reducida para su utilización como un cofactor por la  $\gamma$ -carboxilasa dependiente de vitamina K (Wajih *et al.*, J. Biol. Chem. 280(36)31603-31607). Una subunidad de esta enzima, VKORC1, puede coexpresarse con el polipéptido de FVII modificado para aumentar la  $\gamma$ -carboxilación. El o los polipéptidos adicionales pueden expresarse a partir del mismo vector de expresión que el polipéptido de FVII o de un vector diferente.

### a. Expresión de procariotas

Los procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de FVII (véase, por ejemplo, Platis *et al.* (2003) Protein Exp. Purif. 31(2): 222-30; y Khalilzadeh *et al.* (2004) J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31(2): 63-69). La transformación de *E. coli* es una técnica sencilla y rápida bien conocida por los expertos en la materia. Los vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles que son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteínas y para expresar proteínas que muestran algo de toxicidad a las células hospedadoras. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor de lac, el promotor de trp, el promotor de tac híbrido, los promotores de ARN T7 y SP6 y el promotor de  $\lambda$ P<sub>L</sub> regulado por temperatura.

FVII puede expresarse en el ambiente citoplasmático de *E. coli*. El citoplasma es un ambiente reductor y para algunas moléculas esto puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Pueden usarse agentes reductores tales como ditioneitol y  $\beta$ -mercaptoetanol y desnaturalizantes (por ejemplo, tales como guanidina-HCl y urea) para resolubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de FVII en el espacio periplásmico de bacterias lo que proporciona un ambiente oxidante e isomerasas de tipo chaperonina y disulfuro lo que conduce a la producción de proteína soluble. Típicamente, una secuencia líder se fusiona con la proteína para expresar que dirige la proteína al periplasma. El líder se retira después por peptidasas señal al periplasma. Los ejemplos de secuencias líder de dirección periplásmica incluyen el líder pelB del gen de peptidato liasa y el líder derivado del gen de la fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la fuga de la proteína expresada al medio de cultivo. La secreción de proteínas permite una purificación rápida y sencilla del sobrenadante de cultivo. Las proteínas que no se secretan pueden obtenerse del periplasma por lisis osmótica. De forma similar a la expresión citoplasmática, en algunos casos las proteínas pueden hacerse insolubles y pueden usarse desnaturalizantes y agentes reductores para facilitar la solubilización y el replegamiento. La temperatura de inducción y crecimiento también puede influir en los niveles de expresión y solubilidad. Típicamente, se usan temperaturas entre 25 °C y 37 °C. También pueden usarse mutaciones para aumentar la solubilidad de proteínas expresadas. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglucosiladas. Por lo tanto, si las proteínas requieren glucosilación para función, puede añadirse glucosilación *in vitro* después de la purificación de células hospedadoras.

#### b. Levadura

Las levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, y *Pichia pastoris* son hospedadores de expresión útiles para FVII (véase por ejemplo, Skoko *et al.* (2003) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38(Pt3): 257-65). La levadura puede transformarse con vectores de replicación episómicos o por integración cromosómica estable mediante recombinación homóloga. Típicamente, se usan promotores inducibles para regular la expresión génica. Los ejemplos de dichos promotores incluyen GAL1, GAL7 y GAL5 y promotores de metalotioneína tales como CUP1. Los vectores de expresión incluyen con frecuencia un marcador seleccionable tal como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para selección y mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levadura son con frecuencia solubles y la coexpresión con chaperoninas, tales como Bip y proteína disulfuro isomerasa, pueden mejorar los niveles de expresión y solubilidad. Adicionalmente, las proteínas expresadas en levadura pueden dirigirse para secreción usando fusiones de péptido señal de secreción tales como la señal de secreción del factor alfa de tipo apareamiento de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de superficie celular de levadura tales como el receptor de adhesión de apareamiento Aga2p o la glucoamilasa de *Arxula adeninivorans*. Un sitio de escisión de proteasa (por ejemplo, la proteasa Kex-2) puede modificarse técnicamente para retirar las secuencias fusionadas de los polipéptidos a medida que salen de la ruta de secreción. La levadura también es capaz de glucosilar en motivos Asn-X-Ser/Thr.

#### c. Insectos y células de insectos

Los insectos y células de insectos, particularmente usando un sistema de expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos tales como FVII o formas modificadas de los mismos (véase, por ejemplo, Muneta *et al.* (2003) *J. Vet. Med. Sci.* 65(2): 219-23). Las células de insectos y larvas de insectos, incluyendo expresión en la hemolinfa, expresan altos niveles de proteína y tienen capacidad para la mayoría de las modificaciones postraduccionales usadas por eucariotas superiores. Los baculovirus tienen un intervalo de hospedadores restrictivo lo que mejora la seguridad y reduce las preocupaciones reguladoras de la expresión eucariota. Típicamente, los vectores de expresión usan un promotor tal como el promotor de la polihedrina de baculovirus para alto nivel de expresión. Los sistemas de baculovirus usados habitualmente incluyen baculovirus tales como virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) y el virus de la polihedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea celular de insecto tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para expresión a alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula para expresar se fusiona inmediatamente cadena abajo del codón de inicio de la polihedrina del virus. Las señales de secreción de mamíferos se procesan con precisión en células de insecto y pueden usarse para secretar la proteína expresada al medio de cultivo. Además, las líneas celulares *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glucosilación similares a los sistemas de célula de mamífero.

Un sistema de expresión alternativo en células de insecto es el uso de células transformadas de forma estable. Pueden usarse líneas celulares tales como las células Schnieder 2 (S2) y Kc (*Drosophila melanogaster*) y células C7 (*Aedes albopictus*) para expresión. El promotor de metalotioneína de *Drosophila* puede usarse para inducir altos niveles de expresión en presencia de inducción de metales pesados con cadmio y cobre. Los vectores de expresión típicamente se mantienen mediante el uso de marcadores seleccionables tales como neomicina e higromicina.

#### d. Células de mamífero

Pueden usarse sistemas de expresión de mamíferos para expresar polipéptidos de FVII. Las construcciones de expresión pueden transferirse a células de mamífero mediante infección viral tal como adenovirus o mediante transferencia de ADN directa tales como liposomas, fosfato cálcico, DEAE-dextrano y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamífero incluyen típicamente un sitio

terminal de ARNm, una caja TATA, una secuencia de inicio de la traducción (secuencia consenso de Kozak) y elementos de poliadenilación. Dichos vectores incluyen con frecuencia promotores-potenciadores de la transcripción para expresión a alto nivel, por ejemplo el promotor-potenciador de SV40, el promotor de citomegalovirus humano (CMV), y la repetición terminal larga del virus de sarcoma de Rous (VSR). Estos promotores-potenciadores están activos en muchos tipos celulares. Los promotores de tipo tisular y celular y regiones potenciadoras también pueden usarse para expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras ejemplares incluyen, pero sin limitación, las de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus de tumor mamario de ratón, albúmina, alfa-fetoproteína, alfa 1-antitripsina, beta-globina, proteína básica de mielina, cadena ligera de miosina 2 y control por el gen de la hormona liberadora gonadotrópica. Los marcadores seleccionables pueden usarse para seleccionar y mantener células con la construcción de expresión. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero sin limitación, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, aminoglucósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa y timidina quinasa. La fusión con moléculas de señalización de superficie celular tales como TCR- $\zeta$  y Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$  puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo en la superficie celular.

Están disponibles muchas líneas celulares para expresión de mamíferos incluyendo células de ratón, de rata, de ser humano, de mono, de pollo y de hámster. Las líneas celulares ejemplares incluyen, pero sin limitación, BHK (es decir células BHK-21), 293-F, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretora) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, células Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 293T, 2B8 y HKB. También están disponibles líneas celulares adaptadas para medio sin suero lo que facilita la purificación de proteínas secretadas desde el medio de cultivo celular. Un ejemplo tal es la línea celular EBNA-1 sin suero (Pham *et al.*, (2003) *Biotechnol. Bioeng.* 84: 332-42). La expresión del polipéptido de FVII recombinante que muestra estructura y modificaciones postraduccionales similares al FVII derivado de plasma se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Jurlander *et al.* (2003) *Semin Throm Haemost.*). Se conocen métodos para optimizar la expresión de proteínas dependientes de vitamina K. Por ejemplo, la complementación de vitamina K en medio de cultivo o coexpresión de  $\gamma$ -carboxilasas dependientes de vitamina K (Wajih *et al.*, *J. Biol. Chem.* 280(36)31603-31607) puede ayudar a la modificación postraducciona de proteínas dependientes de vitamina K, tales como polipéptidos de FVII.

### 30 e. Plantas

Pueden usarse células vegetales y plantas transgénicas para la expresión de FVII. Se transfieren típicamente construcciones de expresión a plantas usando transferencia de ADN directa tal como bombardeo de microproyectiles y transferencia mediada por PEG en protoplastos, y con transformación mediada por agrobacterium. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias promotoras y potenciadoras, elementos de terminación de la transcripción y elementos de control de la traducción. Los vectores de expresión y técnicas de transformación se dividen habitualmente entre hospedadores dicotiledóneos, tales como *Arabidopsis* y tabaco y hospedadores monocotiledóneos, tales como maíz y arroz. Los ejemplos de promotores vegetales usados para expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de ribosa bisfosfato carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. Se usan con frecuencia marcadores seleccionables tales como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa para facilitar la selección y el mantenimiento de células transformadas. Las células vegetales transformadas pueden mantenerse en cultivo como células, agregados (tejido caloso) o regenerarse en plantas completas. Debido a que las plantas tienen patrones de glucosilación diferentes de las células de mamífero, esto puede influir en la elección para producir FVII en estos hospedadores. Las células vegetales transgénicas también pueden incluir algas modificadas técnicamente para producir proteínas (véase, por ejemplo, Mayfield *et al.* (2003) *PNAS* 100: 438-442). Debido a que las plantas tienen diferentes patrones de glucosilación que las células de mamífero, esto puede influir en la elección de producir FVII en estos hospedadores.

### 50 2. Purificación

Los métodos para purificación de polipéptidos de FVII de células hospedadoras dependen de las células hospedadoras seleccionadas y los sistemas de expresión. Para moléculas secretadas, las proteínas se purifican en general a partir del medio de cultivo después de retirar las células. Para expresión intracelular, las células pueden lisarse y las proteínas purificarse del extracto. Cuando se usan organismos transgénicos tales como plantas y animales transgénicos para expresión, pueden usarse tejidos u órganos como material de partida para preparar un extracto celular lisado. Adicionalmente, la producción de animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en leche o huevos, que puede recogerse, y si es necesario además las proteínas pueden extraerse y purificarse adicionalmente usando métodos convencionales en la técnica.

FVII puede purificarse usando técnicas de purificación de proteínas convencionales conocidas en este campo incluyendo pero sin limitación, SDS-PAGE, cromatografía de fracción por tamaño y exclusión por tamaño, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de quelado y cromatografía de intercambio iónico. Por ejemplo, los polipéptidos de FVII pueden purificarse por cromatografía de intercambio aniónico. Un ejemplo de un método para purificar polipéptidos de FVII es usando una columna de intercambio iónico que permite la unión de cualquier polipéptido que tenga una dominio Gla funcional, seguido de elución en presencia de calcio (véase por ejemplo,

Ejemplo 2). También pueden usarse técnicas de purificación de afinidad para mejorar la eficacia y pureza de las preparaciones. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen con FVII en purificación de afinidad. En otro ejemplo, la purificación también puede potenciarse usando una columna de afinidad de FT soluble (FTs) (Maun *et al.* (2005) Prot Sci 14: 1171-1180). También pueden obtenerse técnicamente construcciones de expresión para añadir un marcador de afinidad tal como un epítipo de myc, fusión de GST o His<sub>6</sub> y purificarse por afinidad con anticuerpo de myc, resina de glutatión y resina Ni, respectivamente, con una proteína. La pureza puede evaluarse por cualquier método conocido en la técnica incluyendo electroforesis en gel y tinción y técnicas espectrofotométricas.

La proteasa de FVII puede expresarse y purificarse para que esté en una forma inactiva (forma de zimógeno) o como alternativa la proteasa expresada puede purificarse en una forma activa, tal como por autocatálisis. Por ejemplo, los polipéptidos de FVII que se han activado mediante escisión proteolítica del Arg<sup>152</sup>-Ile<sup>153</sup> pueden prepararse *in vitro* (es decir FVIIa; forma de dos cadenas). Los polipéptidos de FVII pueden prepararse en primer lugar por cualquiera de los métodos de producción descritos en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, producción en células de mamífero seguido de purificación. La escisión de los polipéptidos de FVII en la forma de proteasa activa, FVIIa, puede conseguirse por varios medios. Por ejemplo, la autoactivación durante la incubación con vesículas fosfolípicas en presencia de calcio puede conseguirse en 45 minutos (Nelsestuen *et al.* (2001) J Biol Chem 276: 39825-31). Los polipéptidos de FVII también pueden activarse hasta su compleción por incubación con el factor Xa, factor XIIIa o FT en presencia de calcio, con o sin fosfolípidos (véase por ejemplo, Ejemplo 2 y Broze *et al.* (1980) J Biol Chem 255: 1242-1247, Higashi *et al.* (1996) J Biol Chem 271: 26569-26574, Harvey *et al.* J Biol Chem 278: 8363-8369).

### 3. Proteínas de fusión

También se proporcionan proteínas de fusión que contienen un polipéptido de FVII modificado y uno o más polipéptidos adicionales. Se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen dichas proteínas de fusión formuladas para administración por una vía adecuada. Las proteínas de fusión se forman uniendo en cualquier orden el polipéptido de FVII modificado y un agente, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, factor de crecimiento, receptor, ligando y otro agente tal para los fines de facilitar la purificación de un polipéptido de FVII, alterar las propiedades farmacodinámicas de un polipéptido de FVII dirigiendo, por ejemplo, el polipéptido a una célula o un tejido diana, y/o aumentando la expresión o secreción del polipéptido de FVII. Típicamente cualquier proteína de fusión de FVII conserva al menos aproximadamente 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de actividad coagulante en comparación con un polipéptido de FVII no de fusión, incluyendo 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más actividad coagulante en comparación con un polipéptido no de fusión.

El enlace de un polipéptido de FVII con otro polipéptido puede efectuarse directa o indirectamente mediante un enlazador. En un ejemplo, el enlace puede ser por enlace químico, tal como mediante agentes heterobifuncionales o enlaces de tiol u otros enlaces tales. La fusión también puede efectuarse por medios recombinantes. La fusión de un polipéptido de FVII con otro polipéptido puede ser con el extremo N o C terminal del polipéptido de FVII. Los ejemplos no limitantes de polipéptidos que pueden usarse en proteínas de fusión con un polipéptido FVII proporcionado en el presente documento incluyen, por ejemplo, un polipéptido de GST (glutatión S-transferasa), dominio Fc de inmunoglobulina G, o una secuencia señal heteróloga. Las proteínas de fusión pueden contener componentes adicionales, tales como proteína de unión a maltosa de *E. coli* (MBP) que ayuda en la captación de la proteína por células (véase, solicitud de PCT Internacional N° WO 01/32711).

Una proteína de fusión puede producirse por técnicas recombinantes convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias polipeptídicas pueden ligarse entre sí en fase de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, empleando extremos romos o extremos escalonados para ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, llenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseable, y ligamiento enzimático. En otro ejemplo, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automáticos. Como alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos génicos puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden posteriormente hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Además, están disponibles en el mercado muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido de GST). Un ácido nucleico que codifica FVII puede clonarse en dicho vector de expresión de modo que el resto de fusión se una en fase con la proteína de proteasa.

### 4. Modificación de polipéptidos

Los polipéptidos de FVII modificados pueden prepararse como cadenas polipeptídicas desnudas o como un complejo. Para algunas aplicaciones, puede ser deseable preparar FVII modificado en una forma "desnuda" sin modificaciones postraduccionales u otras químicas. Pueden prepararse cadenas polipeptídicas desnudas en hospedadores adecuados que no modifican postraduccionamente FVII. Dichos polipéptidos también pueden prepararse en sistemas *in vitro* y usando síntesis de polipéptidos química. Para otras aplicaciones, pueden desearse

modificaciones particulares incluyendo pegilación, albuminación, glucosilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación u otras modificaciones conocidas. Pueden realizarse modificaciones *in vitro* o, por ejemplo, produciendo el FVII modificado en un hospedador adecuado que produce dichas modificaciones.

## 5. Secuencias de nucleótidos

Se proporcionan en el presente documento moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de FVII o FVII modificados. Las moléculas de ácido nucleico incluyen variante alélicas o variantes de corte y empalme de cualquier polipéptido de FVII codificado. Son ejemplos de moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento cualquiera que codifique un polipéptido de FVII modificado proporcionado en el presente documento, tal como cualquiera que codifique un polipéptido expuesto en cualquiera de SEQ ID NO: 113-273. En un ejemplo, las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento tienen al menos 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 99 % de identidad de secuencia o hibridan en condiciones de rigurosidad media o alta a lo largo de al menos el 70 % de la longitud completa de cualquier ácido nucleico que codifique un polipéptido de FVII proporcionado en el presente documento. En otro ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede incluir las que tienen secuencias codónicas degradadas que codifican cualquiera de los polipéptidos de FVII proporcionados en el presente documento.

## F. Evaluación de actividades de polipéptidos de FVII modificados

Las actividades y propiedades de polipéptidos de FVII pueden evaluarse *in vitro* y/o *in vivo*. Los expertos en la materia conocen ensayos para dicha evaluación y se sabe que correlacionan actividades ensayadas y resultados con actividades terapéuticas e *in vivo*. En un ejemplo, las variantes de FVII pueden evaluarse en comparación con FVII no modificado y/o de tipo silvestre. En otro ejemplo, la actividad de polipéptidos de FVII modificados puede evaluarse después de exposición *in vitro* o *in vivo* a AT-III y compararse con la de polipéptidos de FVII modificados que no se han expuesto a AT-III. Dichos ensayos pueden realizarse en presencia o ausencia de FT. Los ensayos *in vitro* incluyen cualquier ensayo de laboratorio conocido por un experto en la materia, tal como por ejemplo, ensayos basados en células incluyendo ensayos de coagulación, ensayos de unión, ensayos de proteínas y ensayos de biología molecular. Los ensayos *in vivo* incluyen ensayos de FVII en modelos animales así como administración a seres humanos. En algunos casos, la actividad de FVII *in vivo* puede determinarse evaluando la sangre, el suero u otro fluido corporal para determinantes de ensayo. Las variantes de FVII también pueden ensayarse *in vivo* para evaluar una actividad o propiedad, tal como efecto terapéutico.

Típicamente, los ensayos descritos en el presente documento son con respecto a la forma activada bicatenaria de FVII, es decir FVIIa. Dichos ensayos también pueden realizarse con la forma monocatenaria, tal como para proporcionar un control negativo ya que dicha forma típicamente no contiene actividad proteolítica o catalítica requerida para la actividad de coagulación de FVII. Además, dichos ensayos también pueden realizarse en presencia de cofactores, tales como FT, lo que en algunos casos aumenta la actividad de FVII.

### 1. Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* ejemplares incluyen ensayos para evaluar la modificación y actividad de polipéptidos. Las modificaciones pueden evaluarse usando ensayos *in vitro* que evalúan la  $\gamma$ -carboxilación y otras modificaciones postraduccionales, ensayos de proteínas y ensayos conformacionales conocidos en la técnica. Los ensayos para actividad incluyen, pero sin limitación, medición de la interacción de FVII con otros factores de coagulación, tales como FT, factor X y factor IX, ensayos proteolíticos para determinar la actividad proteolítica de polipéptidos de FVII, ensayos para determinar la unión y/o afinidad de polipéptidos de FVII para fosfatidilserinas y otros fosfolípidos, y ensayos basados en células para determinar el efecto de polipéptidos de FVII en la coagulación.

Las concentraciones de polipéptidos de FVII modificados pueden evaluarse por métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitación, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), SDS-PAGE; métodos de Bradford, Lowry, BCA; absorbancia UV y otros métodos de marcaje de proteínas cuantificables, tales como, pero sin limitación, métodos inmunológicos, radiactivos y fluorescentes y métodos relacionados.

La evaluación de productos de escisión de reacciones de proteólisis, incluyendo escisión de polipéptidos de FVII o productos producidos por actividad proteasa de FVII, puede realizarse usando métodos incluyendo, pero sin limitación, escisión de sustrato cromogénico, HPLC, análisis de SDS-PAGE, ELISA, transferencia de Western, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, secuenciación NH<sub>2</sub>-terminal y marcaje de proteínas.

También pueden evaluarse las propiedades estructurales de polipéptidos de FVII modificados. Por ejemplo, puede realizarse cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) y microscopía crioelectrónica (crio-EM) de polipéptidos de FVII modificados para evaluar la estructura tridimensional de los polipéptidos de FVII y/u otras propiedades de polipéptidos de FVII, tales como unión con Ca<sup>2+</sup> o cofactor.

Adicionalmente, la presencia y el grado de degradación de FVII pueden medirse por técnicas convencionales tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), y transferencia de Western de

muestras que contienen FVII sometidas a electroforesis. Los polipéptidos de FVII que se han expuesto a proteasas también pueden someterse a secuenciación N terminal para determinar la localización o cambios en sitios de escisión de los polipéptidos de FVII modificados.

#### 5 a. Modificación postraducciona

Los polipéptidos de FVII también pueden evaluarse con respecto a la presencia de modificaciones postraduccionales. Dichos ensayos se conocen en la técnica e incluyen ensayos para medir la glucosilación, hidroxilación y carboxilación. En un ensayo ejemplar para glucosilación, puede realizarse análisis de carbohidratos, por ejemplo, con análisis de SDS page de polipéptidos de FVII expuestos a hidracinólisis o tratamiento con endoglucosidasa. La hidracinólisis libera glucanos ligados a N y O de glucoproteínas por incubación con hidracina anhídrida, mientras que la liberación de endoglucosidasa implica a PNGasa F, que libera la mayoría de N-glucanos de glucoproteínas. La hidracinólisis o el tratamiento con endoglucosidasa de polipéptidos de FVII genera un extremo reductor que puede marcarse con un marcador fluoróforo o cromóforo. Los polipéptidos de FVII marcados pueden analizarse por electroforesis de carbohidratos asistidas por fluoróforo (FACE). El marcador fluorescente para glucanos también puede usarse para análisis de monosacáridos, realización de perfiles o identificación genética de patrones de glucosilación complejos por HPLC. Los ejemplos de métodos de HPLC incluyen cromatografía de interacción hidrófila, interacción electrónica, intercambio de iones, interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño. Las sondas de glucanos ejemplares incluyen, pero sin limitación, 3-(acetilamino)-6-aminoacridina (AA-Ac) y ácido 2-aminobenzoico (2-AA). También pueden detectarse restos de carbohidratos mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen el polipéptido de FVII glucosilado. Un ensayo ejemplar para medir la  $\beta$ -hidroxilación comprende análisis de HPLC de fase inversa de polipéptidos de FVII que se ha sometido a hidrólisis alcalina (Przywiecki *et al.* (1987) PNAS 84: 7856-7860). La carboxilación y  $\gamma$ -carboxilación de polipéptidos de FVII puede evaluarse usando espectrometría de masas con análisis de desorción e ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF), como se describe en la técnica (véase, por ejemplo Harvey *et al.* J Biol Chem 278: 8363-8369, Maun *et al.* Prot Sci 14: 1171-1180). La interacción de un polipéptido de FVII que contiene el propéptido (pro-FVII) con la carboxilasa responsable de la modificación de  $\gamma$ -carboxilato postraducciona también puede evaluarse. La constante de disociación ( $K_d$ ) después de incubación de carboxilasa con polipéptidos pro FVII marcados con fluoresceína puede medirse determinando la cantidad de carboxilasa unida por anisotropía (Lin *et al.* (2004) J Biol Chem 279: 6560-6566).

#### b. Actividad proteolítica

Los polipéptidos de FVII modificados pueden ensayarse con respecto a actividad proteolítica. La actividad proteolítica de FVII puede medirse usando sustratos cromogénicos tales como Cromozima t-PA (MeSO<sub>2</sub>-D-Phe-Gly-Arg-pNA), S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA), S-2266 (H-D-Val-Leu-Arg-pNA), S-2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), Spectrozyme FXa y Spectrozyme FVIIa (CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>-D-CHA-But-Arg-pNA). Los polipéptidos de FVII, solos o en presencia de FT, se incuban con diversas concentraciones de sustrato cromogénico. La escisión del sustrato puede controlarse por la absorbancia y la tasa de hidrólisis de sustrato determinada por regresión lineal usando software fácilmente disponible.

La activación de sustratos de factor de coagulación, tales como FX, por polipéptidos de FVII también puede evaluarse. Los polipéptidos de FVII, con o sin preincubación con FT, pueden incubarse con FX purificado (disponible en el mercado). La cantidad de FXa activo producido como consecuencia de incubación de polipéptidos de FVII se mide como actividad de FXa para un sustrato cromogénico, tal como S-2222 o Spectrafluor FXa (CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>-D-CHA-Gly-Arg-AMC.AcOH), que se controla mediante cambios en la absorbancia (Harvey *et al.* J Biol Chem 278: 8363-8369, véase también Ejemplo 4 posterior). También puede incluirse una fuente de fosfolípidos en la incubación de FVII y FX (Nelsestuen *et al.* (2001) J Biol Chem 276: 39825-31).

#### 50 c. Actividad de coagulación

Los polipéptidos de FVII pueden ensayarse con respecto a actividad de coagulación usando ensayos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, algunos de los ensayos incluyen, pero sin limitación, un ensayo de coagulación de dos estadios (Liebman *et al.*, (1985) PNAS 82: 3879-3883); el ensayo de tiempo de protrombina (PT, que puede medir la actividad dependiente de FT de FVIIa en la ruta extrínseca); ensayos que son modificaciones del ensayo de PT; el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT, que puede medir la actividad independiente de FT de FVIIa); tiempo de coagulación activada (ACT); tiempo de coagulación activada recalcificada; el tiempo de Coagulación de Lee-White; o tromboelastografía (TEG) (Pusateri *et al.* (2005) Critical Care 9: S15-S24). Por ejemplo, la actividad de coagulación de un polipéptido de FVII modificado puede determinarse por un ensayo basado en PT donde FVII se diluye en plasma deficiente en FVII, y se mezcla con reactivo de tiempo de protrombina (FT recombinante con fosfolípidos y calcio), tal como el disponible como Innovin™ de Dade Behring. La formación de coágulos se detecta ópticamente y se determina el tiempo hasta la coagulación y se compara frente a plasma deficiente en FVII solamente.

65

**d. Unión con y/o inhibición por otras proteínas y moléculas**

Los ensayos de inhibición pueden usarse para medir la resistencia de polipéptidos de FVII modificados a inhibidores de FVII, tales como, por ejemplo, AT-III e IRFT, o moléculas tales como  $Zn^{2+}$ . La evaluación de inhibición para otros inhibidores también puede ensayarse e incluye, pero sin limitación, otros inhibidores de serina proteasa, y anticuerpos específicos de FVII. La inhibición puede evaluarse mediante incubación de, por ejemplo, AT-III, IRFT o  $Zn^{2+}$  con polipéptidos de FVII que se han preincubado con y/o sin FT. La actividad de FVII puede después medirse usando uno cualquiera o más de los ensayos de actividad o coagulación descritos anteriormente, y la inhibición por AT-III, IRFT o  $Zn^{2+}$  puede evaluarse comparando la actividad de polipéptidos de FVII incubados con el inhibidor, con la actividad de polipéptidos de FVII que no se incubaron con el inhibidor.

Los polipéptidos de FVII pueden ensayarse con respecto a la unión con otros factores de coagulación e inhibidores. Por ejemplo, las interacciones directas e indirectas de FVII con cofactores, tales como FT, sustratos, tales como FX y FIX, e inhibidores, tales como antitrombina III, IRFT y heparina pueden evaluarse usando cualquier ensayo de unión conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, inmunoprecipitación, purificación en columna, SDS-PAGE no reductor, ensayos de BIAcore®, resonancia de plasmón superficial (RPS), transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), polarización de fluorescencia (FP), calorimetría de valoración isotérmica (ITC), dicroísmo circular (CD), ensayos de complementación de fragmentos proteicos (PCA), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), espectroscopia, dispersión de la luz, equilibrio de sedimentación, cromatografía de filtración en gel de zona pequeña, retardo en gel, transferencia de western lejano, polarización de fluorescencia, identificación genética de proteínas con radicales hidroxilo, presentación en fagos y diversos sistemas de dos híbridos. En un ejemplo, la unión con  $Zn^{2+}$  se evalúa usando análisis de equilibrio (Petersen *et al.*, (2000) *Protein Science* 9: 859-866)

**e. Afinidad de fosfolípidos**

La unión y/o afinidad de polipéptido de FVII modificado con fosfatidilserina (PS) y otros fosfolípidos puede determinarse usando ensayos bien conocidos en la técnica. Pueden usarse fosfolípidos altamente puros (por ejemplo, concentraciones conocidas de PS bovina y fosfatidilcolina (PC) de huevo, que están disponibles en el mercado, tal como de Sigma, en disolvente orgánico para preparar vesículas fosfolípicas unilamelares pequeñas. La unión del polipéptido de FVII con estas vesículas de PS/PC puede determinarse por dispersión de la luz relativa a  $90^\circ$  de la luz incidente. La intensidad de la dispersión de la luz con PC/PS solamente y con PC/PS/FVII se mide para determinar la constante de disociación (Harvey *et al.* *J Biol Chem* 278: 8363-8369). La resonancia de plasmón superficial, tal como en un instrumento biosensor de BIAcore, también puede usarse para medir la afinidad de polipéptidos de FVII por membranas fosfolípicas (Sun *et al.* *Blood* 101: 2277-2284).

**2. Modelos animales no humanos**

Pueden usarse modelos animales no humanos para evaluar la actividad, eficacia y seguridad de polipéptidos de FVII modificados. Por ejemplo, pueden usarse animales no humanos como modelos para una enfermedad o afección. Pueden inyectarse a animales no humanos sustancias inductoras de enfermedad y/o fenotipo antes de la administración de variantes de FVII, tales como cualquier variante de FVII expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 113-273, para controlar los efectos en la progresión de enfermedad. También son útiles modelos genéticos. Pueden generarse animales, tales como ratones, que imitan una enfermedad o afección por la sobreexpresión, infraexpresión o anulación de uno o más genes, tal como, por ejemplo, ratones con anulación del factor VIII que presentan hemofilia A (Bi *et al.* (1995) *Nat Gen* 10: 119-121). Dichos animales pueden generarse por técnicas de producción de animales transgénicos bien conocidas en este campo o usando cepas mutantes de origen natural o inducidas. Los ejemplos de modelos animales no humanos útiles de enfermedades asociadas con FVII incluyen, pero sin limitación, modelos de trastornos de sangrado, en particular hemofilia, o enfermedad trombótica. También pueden usarse modelos animales no humanos para lesión para evaluar una actividad, tal como la actividad de coagulación, de polipéptidos de FVII. Estos modelos animales no humanos pueden usarse para controlar la actividad de variantes de FVII en comparación con un polipéptido de FVII de tipo silvestre.

También pueden usarse modelos animales para controlar la estabilidad, semivida y eliminación de polipéptidos de FVII modificados. Dichos ensayos son útiles para comparar polipéptidos de FVII modificados y para calcular dosis y regímenes de dosis para ensayos adicionales de animales no humanos y seres humanos. Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado, tal como cualquier variante de FVII proporcionada en el presente documento incluyendo, por ejemplo, cualquiera expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 113-273, puede inyectarse en la vena de la cola de ratones. Las muestras de sangre se toman después en puntos temporales después de la inyección (tales como minutos, horas y días después) y después se puede controlar el nivel de los polipéptidos de FVII modificados en muestras corporales incluyendo, pero sin limitación, suero o plasma en puntos temporales específicos por ejemplo por ELISA o radioinmunoensayo. También pueden ensayarse muestras de sangre de diversos puntos temporales después de inyección de los polipéptidos de FVII con respecto a actividad de coagulación usando diversos métodos, tales como se describen en el Ejemplo 9. Estos tipos de estudios farmacocinéticos pueden proporcionar información con respecto a la semivida, eliminación y estabilidad de los polipéptidos de FVII, que pueden ayudar a determinar dosificaciones adecuadas para la administración como un procoagulante.

Pueden ensayarse polipéptidos de FVII modificados, tales como cualquiera expuesto en cualquiera de SEQ ID NO: 113-273, con respecto a eficacia terapéutica usando modelos animales para hemofilia. En un ejemplo no limitante, puede usarse un modelo animal tal como un ratón. Los modelos de ratón de hemofilia están disponibles en la técnica y pueden emplearse para ensayar polipéptidos de FVII modificados. Por ejemplo, un modelo de ratón de hemofilia A que se produce por inyección con anticuerpos anti FVIII pueden usarse para evaluar la actividad coagulante de polipéptidos de FVII (véase por ejemplo Ejemplo 6, y Tranholm *et al.* Blood (2003)102: 3615-3620). También puede usarse un modelo de ratón de hemofilia B para ensayar los polipéptidos de FVII (Margaritis *et al.* (2004) J Clin Invest 113: 1025-1031). También existen modelos de trastorno de sangrado no de ratón. La actividad de polipéptidos de FVII puede evaluarse en ratas con sangrado inducido por warfarina o sangrado inducido por melagatrán (Diness *et al.* (1992) Thromb Res 67: 233-241, Elg *et al.* (2001) Thromb Res 101: 145-157) y conejos con sangrado inducido por heparina (Chan *et al.* (2003) J Thromb Haemost 1: 760-765). También pueden usarse perros endogámicos con hemofilia A, hemofilia B y enfermedad de von Willebrand que presentan sangrado grave en estudios animales no humanos con polipéptidos de FVII (Brinkhous *et al.* (1989) PNAS 86: 1382-1386). La actividad de polipéptidos de FVII también puede evaluarse en un modelo de conejo de sangrado en el que se induce trombocitopenia por una combinación de irradiación gamma y el uso de anticuerpos de plaquetas (Tranholm *et al.* (2003) Thromb Res 109: 217-223).

Además de animales con trastornos de sangrado generalizado, también pueden usarse modelos de lesión y traumatismo para evaluar la actividad de polipéptidos de FVII, y su seguridad y eficacia como un producto terapéutico coagulante. Los ejemplos no limitantes de dichos modelos incluyen un modelo de estenosis coronaria de conejo (Fatorutto *et al.* (2004) Can J Anaesth 51: 672-679), un modelo de lesión de hígado de grado V en cerdos (Lynn *et al.* (2002) J Trauma 52: 703-707), un modelo de lesión de hígado de grado V en cerdos (Martinowitz *et al.* (2001) J Trauma 50: 721-729) y un modelo de aortotomía de cerdos (Sondeen *et al.* (2004) Shock 22: 163-168).

### 3. Ensayos clínicos

Muchos ensayos están disponibles para evaluar la actividad de FVII para su uso clínico. Dichos ensayos pueden incluir la evaluación de la coagulación, estabilidad de proteínas y semivida *in vivo*, y ensayos fenotípicos. Los ensayos fenotípicos y ensayos para evaluar el efecto terapéutico del tratamiento con FVII incluyen la evaluación de los niveles de FVII en sangre (por ejemplo medición de FVII en suero antes de la administración y puntos temporales después de las administraciones incluyendo, después de la primera administración, inmediatamente después de la última administración y puntos temporales intermedios, corrigiendo con respecto al índice de masa corporal (IMC)), evaluación de la coagulación sanguínea *in vitro* usando los métodos descritos anteriormente después del tratamiento con FVII (por ejemplo ensayo de PT), y respuesta fenotípica al tratamiento con FVII incluyendo alivio de síntomas a lo largo del tiempo en comparación con sujetos tratados con un FVII no modificado y/o de tipo silvestre o placebo. Los pacientes tratados con polipéptidos de FVII pueden controlarse con respecto a pérdida de sangre, requisitos de transfusión, y hemoglobina. Los pacientes pueden controlarse regularmente a lo largo de un periodo de tiempo para administraciones rutinarias o repetidas, o después de la administración en respuesta a acontecimientos agudos, tales como hemorragia, traumatismo o procedimientos quirúrgicos.

### G. Formulación y administración

Se proporcionan en el presente documento composiciones para su uso en el tratamiento de trastornos de sangrado. Dichas composiciones contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido del factor VII como se describe en el presente documento. Se mezclan concentraciones eficaces de polipéptidos de FVII o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos con un vehículo o transportador farmacéutico adecuado para administración sistémica, tópica o local. Se incluyen compuestos en una cantidad eficaz para tratar el trastorno seleccionado. La concentración del compuesto activo en la composición dependerá de las tasas de absorción, inactivación, secreción del compuesto activo, el programa de dosificación y la cantidad administrada así como otros factores conocidos por los expertos en la materia.

Los vehículos o transportadores farmacéuticos adecuados para administración de los compuestos proporcionados en el presente documento incluyen cualquiera de dichos vehículos que los expertos en la materia saben que es adecuado para el modo particular de administración. También pueden proporcionarse composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de FVII descrito en el presente documento como un polvo liofilizado que se reconstituye, tal como con agua estéril, inmediatamente antes de su administración.

#### 1. Formulaciones

Pueden formularse composiciones farmacéuticas que contienen un FVII modificado de cualquier manera convencional mezclando una cantidad seleccionada del polipéptido con uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. La selección del vehículo o excipiente está dentro de la experiencia de la profesión de administración y puede depender de varios parámetros. Estos incluyen, por ejemplo, el modo de administración (es decir, modo sistémico, oral, nasal, pulmonar, local, tópico o cualquier otro) y el trastorno tratado. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden formularse para administración de dosificación individual (directa) o para dilución u otra modificación. Las concentraciones de los compuestos en las formulaciones



son eficaces para suministro de una cantidad, tras la administración, que es eficaz para el tratamiento pretendido. Típicamente, las composiciones se formulan para administración de una única dosificación. Para formular una composición, la fracción en peso de un compuesto o mezcla del mismo se disuelve, suspende, dispersa o mezcla de otro modo en un vehículo seleccionado a una concentración eficaz de modo que la afección tratada se alivie o mejore.

Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden formularse para administración a un sujeto como una proteína de FVIIa bicatenaria. Los polipéptidos de FVII modificados pueden activarse por cualquier método conocido en la técnica antes de la formulación. Por ejemplo, FVII puede experimentar autoactivación durante la purificación por cromatografía de intercambio iónico (Jurlander *et al.* (2001) *Semin Thromb Hemost* 27: 373-384). Los polipéptidos de FVII modificados también pueden activarse por incubación con FXa inmovilizado en perlas (Kemball-Cook *et al.* (1998) *J Biol Chem* 273: 8516-8521), o cualquier otro método conocido en la técnica (véase también Ejemplo 2 posterior). La inclusión de calcio en estos procedimientos asegura la activación completa y el plegamiento correcto de la proteína de FVIIa modificada. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento también pueden formularse para administración como una proteína monocatenaria. Los polipéptidos de FVII monocatenarios pueden purificarse de tal modo que eviten la escisión (véase, por ejemplo, documento US6677440). Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden formularse de modo que las formas monocatenaria y bicatenaria estén contenidas en la composición farmacéutica, en cualquier relación por selección apropiada del medio para eliminar o controlar la autoactivación.

El compuesto puede suspenderse en forma micronizada u otra adecuada o puede derivatizarse para producir un producto activo más soluble. La forma de la mezcla resultante depende de varios factores, incluyendo el modo pretendido de administración y la solubilidad del compuesto en el vehículo o transportador seleccionado. Las mezclas resultantes son soluciones, suspensiones, emulsiones y otras mezclas tales, y pueden formularse como una mezcla no acuosa o acuosa, cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, vendajes o cualquier otra formulación adecuada para administración sistémica, tópica o local. Para administración interna local, tal como, administración intramuscular, parenteral o intraarticular, los polipéptidos pueden formularse como una suspensión de solución en un medio de base acuosa, tal como solución salina tamponada de forma isotónica o se combinan con un soporte o bioadhesivo biocompatible que se pretende usar para administración interna. La concentración eficaz es suficiente para aliviar la afección diana y puede determinarse de forma empírica. Para formular una composición, la fracción en peso del compuesto se disuelve, suspende, dispersa o se mezcla de otro modo en un vehículo seleccionado a una concentración eficaz de modo que la afección diana se alivia o mejora.

En general, se preparan composiciones farmacéuticamente aceptables a la vista de las aprobaciones para una agencia reguladora u otras preparadas de acuerdo con farmacopea reconocida en general para su uso en animales y en seres humanos. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir transportadores tales como diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con los que se administra una isoforma. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceites de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es un vehículo típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones de dextrosa acuosa y glicerol como vehículo líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener junto con un principio activo: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato cálcico y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tales como goma arábiga, gelatina, glucosa, melaza, polivinilpirrolidona, celulosas y derivados de las mismas, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes tales conocidos por los expertos en la materia. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, glicerol monoestearato, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH, por ejemplo, acetato, citrato sódico, derivados de ciclodextrina, sorbitán monolaurato, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina y otros agentes tales. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo de un compuesto terapéutico y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Una composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y otros agentes tales. Las preparaciones para administración oral también pueden formularse convenientemente con inhibidores de proteasa, tales como inhibidor de Bowman-Birk, un inhibidor de Bowman-Birk conjugado, aprotinina y camostat. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, generalmente de forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para administración apropiada a un sujeto o paciente.

La formulación debería ajustarse al modo de administración. Por ejemplo, el FVII modificado puede formularse para administración parenteral por inyección (por ejemplo, por inyección de embolada o infusión continua). Las composiciones inyectables pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,4-butanodiol. Se emplean convencionalmente aceites fijos, estériles, como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite fijo insípido, incluyendo, pero sin limitación, mono o diglicéridos sintéticos, ácidos grasos (incluyendo ácido oleico), aceites vegetales de origen natural como aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón y otros aceites, o vehículos grasos sintéticos como etil oleato. Pueden incorporarse tampones, conservantes, antioxidantes y los ingredientes adecuados, según se requiera, o, como alternativa, pueden comprender la formulación.

Los polipéptidos pueden formularse como el único principio farmacéuticamente activo en la composición o pueden combinarse con otros principios activos. Los polipéptidos pueden dirigirse para suministro, tales como por conjugación con un agente de dirección, tal como un anticuerpo. Las suspensiones liposómicas, incluyendo liposomas dirigidos a tejido, también pueden ser adecuadas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden prepararse formulaciones de liposomas como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 4.522.811. El suministro liposómico también puede incluir formulaciones de liberación lenta, incluyendo matrices farmacéuticas tales como geles de colágeno y liposomas modificados con fibronectina (véase, por ejemplo, Weiner *et al.* (1985) *J Pharm Sci.* 74(9): 922-5). Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden contener además uno o más adyuvantes que facilitan el suministro, tal como, pero sin limitación, vehículos inertes o sistemas de dispersión coloidal. Pueden seleccionarse ejemplos representativos y no limitantes de dichos vehículos inertes de agua, alcohol isopropílico, fluorocarburos gaseosos, alcohol etílico, polivinilpirrolidona, propilenglicol, un material productor de gel, alcohol estearílico, ácido esteárico, espermaceti, sorbitán monooleato, metilcelulosa, así como combinaciones adecuadas de dos o más de los mismos. El compuesto activo se incluye en el vehículo farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios indeseables en el sujeto tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse de forma empírica ensayando los compuestos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos, tales como los ensayos proporcionados en el presente documento.

#### a. Dosificaciones

La cantidad o dosis precisa del agente terapéutico administrado depende del polipéptido de FVII particular, la vía de administración y otras consideraciones, tales como la gravedad de la enfermedad y el peso y estado general del sujeto. La administración local del agente terapéutico requerirá típicamente una dosificación menor que cualquier modo de administración sistémica, aunque la concentración local del agente terapéutico puede, en algunos casos, ser mayor después de la administración local que puede conseguirse con seguridad tras la administración sistémica. Si es necesario, una dosificación y duración particulares y protocolo de tratamiento pueden determinarse de forma empírica o extrapolarse. Por ejemplo, pueden usarse dosis ejemplares de polipéptidos de FVII recombinantes y nativos como un punto de partida para determinar las dosificaciones apropiadas. Por ejemplo, un polipéptido de FVII recombinante (rFVIIa) que se ha activado a rFVIIa, Novoseven®, se ha administrado a pacientes con hemofilia A o hemofilia B, que experimentan un episodio de sangrado, a una dosificación de 90 µg/kg por infusión de embolada durante 2 a 5 minutos, consiguiendo un nivel en circulación efectivo de al menos 2 µg/ml. La dosis se repite cada 2 horas hasta que se consigue la hemostasia. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden ser eficaces a cantidades y/o frecuencias de dosificación reducidas en comparación con dicho FVII recombinante. Por ejemplo, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden administrarse a una dosificación de 80 µg/kg, 70 µg/kg, 60 µg/kg, 50 µg/kg, 40 µg/kg, 30 µg/kg, 20 µg/kg, 15 µg/kg o menos. En algunos ejemplos, las dosificaciones pueden ser mayores, tales como 100 µg/kg, 110 µg/kg, 120 µg/kg, o mayores. La duración del tratamiento y el intervalo entre inyecciones variarán con la gravedad del sangrado y la respuesta del paciente al tratamiento, y pueden ajustarse en consecuencia. Pueden tenerse en cuenta factores tales como el nivel de actividad y semivida del FVII modificado en comparación con el FVII no modificado cuando se realizan determinaciones de dosificación. Las dosificaciones y los regímenes particulares pueden determinarse de forma empírica.

En otro ejemplo, un polipéptido de FVII recombinante (rFVIIa) que se ha activado a rFVIIa, Novoseven®, se ha administrado a pacientes con deficiencia de FVII congénita que experimentan un episodio de sangrado, a una dosificación de 15-30 µg/kg por infusión de embolada durante 2 a 5 minutos. La dosis se repite cada 4-6 horas hasta que se consiga hemostasia. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden ser eficaces a cantidades y/o frecuencias de dosificación reducidas en comparación con dicho FVII recombinante. Por ejemplo, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden administrarse a una dosificación de 20 µg/kg, 15 µg/kg, 10 µg/kg, 5 µg/kg, 3 µg/kg o menos. En algunos ejemplos, las dosificaciones pueden ser mayores, tales como 35 µg/kg, 40 µg/kg, 45 µg/kg, o mayores. La duración del tratamiento y el intervalo entre inyecciones variarán con la gravedad del sangrado y la respuesta del paciente al tratamiento, y pueden ajustarse en consecuencia. Pueden usarse factores tales como el nivel de actividad y semivida del FVII modificado

en comparación con el FVII no modificado en la realización de determinaciones de dosificación. Por ejemplo, un polipéptido de FVII modificado que muestra una semivida más larga que un polipéptido de FVII no modificado puede administrarse a dosis menores y/o menos frecuentemente que el polipéptido de FVII no modificado. De forma similar, las dosificaciones requeridas para efecto terapéutico usando un polipéptido de FVII modificado que presenta actividad coagulante aumentada en comparación con un polipéptido de FVII no modificado pueden reducirse en frecuencia y cantidad. Un experto en la materia puede determinar de forma empírica dosificaciones y regímenes particulares.

#### b. Formas de dosificación

Los compuestos farmacéuticos terapéuticamente activos y derivados de los mismos típicamente se formulan y administran en formas de dosificación unitarias o formas de dosificación múltiples. Las formulaciones pueden proporcionarse para administración a seres humanos y animales en formas de dosificación que incluyen, pero sin limitación, comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles, soluciones o suspensiones orales, y emulsiones de aceite en agua que contienen cantidades adecuadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo, transportador o diluyente farmacéutico requerido. Los ejemplos de formas de dosis unitarias incluyen ampollas y jeringas y comprimidos o cápsulas envasados individualmente. En algunos ejemplos, la dosis unitaria se proporciona como un polvo liofilizado que se reconstituye antes de su administración. Por ejemplo, un polipéptido de FVII puede proporcionarse como polvo liofilizado que se reconstituye con una solución adecuada para generar una solución de una única dosis para inyección. En algunos ejemplos, el polvo liofilizado puede contener el polipéptido de FVII y componentes adicionales, tales como sales, de modo que la reconstitución con agua destilada estéril dé como resultado un polipéptido de FVII en una solución tamponada o salina. Las formas de dosis unitarias pueden administrarse en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitarias idénticas envasadas en un único recipiente para administrar en forma de dosis unitaria segregada. Los ejemplos de formas de dosis múltiples incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o frascos de pintas o galones. Por lo tanto, la forma de dosis múltiple es una multitud de dosis unitarias que no se segregan en el envasado.

#### 2. Administración de polipéptidos de FVII modificados

Los polipéptidos de FVII proporcionados en el presente documento (es decir compuestos activos) pueden administrarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* poniendo en contacto una mezcla, tal como un fluido corporal u otra muestra tisular, con un polipéptido de FVII. Por ejemplo, cuando se administra un compuesto *ex vivo*, una muestra de fluido o tejido corporal de un sujeto puede ponerse en contacto con los polipéptidos de FVII que recubren un tubo o un filtro, tal como, por ejemplo, un tubo o filtro en una máquina de derivación. Cuando se administran *in vivo*, los compuestos activos pueden administrarse por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral, por vía nasal, por vía pulmonar, por vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intraarticular, por vía intracisternal, por vía intraocular, por vía intraventricular, por vía intratecal, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intratraqueal o por vía tópica, así como por cualquier combinación de dos o más cualesquiera de las mismas, en forma líquida, semilíquida o sólida y se formulan de una manera adecuada para cada vía de administración. Los polipéptidos de FVII modificados pueden administrarse una vez o más de una vez, tal como dos veces, tres veces, cuatro veces o cualquier número de veces que se requieran para conseguir un efecto terapéutico. Pueden efectuarse múltiples administraciones mediante cualquier vía o combinación de vías, y pueden administrarse cada hora, cada 2 horas, cada tres horas, cada cuatro horas o más.

La vía de administración más adecuada variará dependiendo de la patología para tratar, por ejemplo la localización del trastorno de sangrado. En general, los polipéptidos de FVII se administrarán por inyección de embolada intravenosa, con un tiempo de administración (infusión) de aproximadamente 2-5 minutos. En otros ejemplos, los niveles en sangre deseables de FVII pueden mantenerse por una infusión continua del agente activo como se determina por los niveles en plasma. Debería observarse que el médico a cargo sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia a menor dosificación debido a toxicidad, o disfunciones de médula ósea, hígado o riñón. Por el contrario, el médico a cargo también sabrá cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no es adecuada (evitando efectos secundarios tóxicos). En otros ejemplos, la localización del trastorno de sangrado podría indicar que la formulación FVII se administra mediante vías alternativas. Por ejemplo, la administración local, incluyendo administración al cerebro (por ejemplo, por vía intraventricular) podría realizarse cuando el paciente experimente sangrado en esta región. De forma similar, para el tratamiento de sangrado en las articulaciones, podría emplearse administración local por inyección del agente terapéutico en la articulación (es decir, por vía intraarticular, medio intravenoso o subcutáneo). En otros ejemplos, la administración tópica del agente terapéutico a la piel, por ejemplo formulado como una crema, gel o pomada o administración a los pulmones por inhalación o por vía intratraqueal, podría ser apropiada cuando el sangrado esté localizado en estas áreas.

En los casos donde los polipéptidos de FVII modificados se formulen como una preparación de liberación prolongada, las formulaciones de acción larga pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o por vía intramuscular) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, los compuestos

terapéuticos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

- 5 Las composiciones, si se desea, pueden presentarse en un envase, en un kit o dispositivo dosificador, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase, por ejemplo, contiene papel metálico o plástico, tal como un envase de blíster. El envase o dispositivo dosificador puede acompañarse de instrucciones para la administración. Las composiciones que contienen los agentes activos pueden envasarse como artículos de fabricación que contienen material de envasado, un agente proporcionado en el presente documento, y una etiqueta que indica el trastorno para el que se proporciona el agente.

### 3. Administración de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de FVII modificados (terapia génica)

- 15 También se proporcionan composiciones de moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de FVII modificados y vectores de expresión que los codifican que son adecuados para terapia génica. En lugar de suministrar la proteína, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo*, tal como por vía sistémica o por otra vía, o *ex vivo*, tal como por retirada de células, incluyendo linfocitos, introducción del ácido nucleico en el mismo, y reintroducción en el hospedador o un receptor compatible.

- 20 Pueden suministrarse polipéptidos de FVII modificados a células y tejidos por expresión de moléculas de ácido nucleico. Pueden administrarse polipéptidos de FVII modificados como moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de FVII modificados, incluyendo técnicas *ex vivo* y expresión *in vivo* directa. Pueden suministrarse ácidos nucleicos a células y tejidos por cualquier método conocido por los expertos en la materia. Las secuencias de ácido nucleico aisladas pueden incorporarse en vectores para manipulación adicional. Como se usa en el presente documento, vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se usan para introducir ADN heterólogo en células para expresión o replicación del mismo. La selección y el uso de dichos vehículos están dentro de la experiencia de la técnica.

- 30 Los métodos para administrar polipéptidos de FVII modificados por expresión de moléculas de ácido nucleico codificantes incluyen administración de vectores recombinantes. El vector puede diseñarse para permanecer episómico, tal como mediante la inclusión de un origen de replicación o puede diseñarse para integrarse en un cromosoma en la célula. También pueden usarse polipéptidos de FVII modificados en terapia de expresión génica *ex vivo* usando vectores no virales. Por ejemplo, pueden modificarse técnicamente células para expresar un polipéptido de FVII modificado, tal como integrando un ácido nucleico que codifica polipéptido de FVII modificado en una localización genómica, bien unido operativamente con secuencias reguladoras o de modo que se coloque unido operativamente con secuencias reguladoras en una localización genómica. Dichas células pueden administrarse después por vía local o sistémica a un sujeto, tal como un paciente que necesite tratamiento.

- 40 Los vectores virales incluyen, por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), poxvirus, virus del herpes, retrovirus y otros diseñados para terapia génica. Los vectores pueden permanecer episómicos o pueden integrarse en cromosomas del sujeto tratado. Un polipéptido de FVII modificado puede expresarse por un virus, que se administra a un sujeto que necesite tratamiento. Los vectores virales adecuados para terapia génica incluyen adenovirus, virus adenoasociado (AAV), retrovirus, lentivirus, virus vaccinia y otros indicados anteriormente. Por ejemplo, la tecnología de expresión de adenovirus se conoce bien en la técnica y también se conocen bien métodos de producción y administración de adenovirus. Están disponibles serotipos de adenovirus, por ejemplo, de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD). Los adenovirus pueden usarse *ex vivo*, por ejemplo, se aíslan células de un paciente que necesite tratamiento, y se transducen con un vector de adenovirus que expresa el polipéptido de FVII modificado. Después de un periodo de cultivo adecuado, las células transducidas se administran a un sujeto, por vía local y/o por vía sistémica. Como alternativa, se aíslan partículas de adenovirus que expresan polipéptidos de FVII modificados y se formulan en un vehículo farmacéuticamente aceptable para suministro de una cantidad terapéuticamente eficaz para prevenir, tratar o aliviar una enfermedad o afección de un sujeto. Típicamente, se suministran partículas de adenovirus a una dosis que varía de 1 partícula a  $10^{14}$  partículas por kilogramo de peso del sujeto, generalmente entre  $10^6$  o  $10^8$  partículas y  $10^{12}$  partículas por kilogramo de peso del sujeto. En algunas situaciones, es deseable proporcionar una fuente de ácido nucleico con un agente que se dirija a células, tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de superficie celular o una célula diana, o un ligando para un receptor de una célula diana. FVII también puede dirigirse para suministro en tipos celulares específicos. Por ejemplo, pueden usarse vectores adenovirales que codifican polipéptidos de FVII para expresión estable en células no en división, tales como células del hígado (Margaritis *et al.* (2004) *J Clin Invest* 113: 1025-1031). En otro ejemplo, pueden transducirse vectores virales o no virales que codifican polipéptidos de FVII en células aisladas para suministro posterior. Los tipos celulares adicionales para expresión y suministro de FVII podrían incluir, pero sin limitación, fibroblastos y células endoteliales.

- 65 Las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en cromosomas artificiales y otros vectores no virales. Pueden modificarse técnicamente cromosomas artificiales, tales como ACES (véase, Lindenbaum *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res.* 32(21): e172) para codificar y expresar la isoforma. Brevemente, los cromosomas artificiales de mamífero (MAC) proporcionan un medio para introducir grandes cargas útiles de información genética en la célula en un

formato de replicación autónoma, no integrado. De forma única entre los MAC, la Expresión de Cromosoma Artificial (ACE) basado en ADN de satélite de mamífero puede generarse de forma reproducible *de novo* en líneas celulares de especies diferentes y purificarse fácilmente a partir de los cromosomas de las células hospedadoras. Las ACE de mamífero purificadas pueden después reintroducirse en una diversidad de líneas celulares receptoras donde se han mantenido de forma estable durante periodos prolongados en ausencia de presión selectiva usando un Sistema de ACE. Usando este enfoque, se ha conseguido la carga específica de una o dos dianas génicas en células LMTK(-) y CHO.

Otro método para introducir ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de FVII modificados es una técnica de reemplazo génico de dos etapas en levadura, comenzando con un genoma de adenovirus completo (Ad2; Ketner *et al.* (1994) PNAS 91: 6186-6190) clonado en un Cromosoma Artificial de Levadura (YAC) y un plásmido que contiene secuencias de adenovirus para dirigirse a una región específica en el clon de YAC, un casete de expresión para el gen de interés y un marcador seleccionable positivo y negativo. Los YAC son de particular interés porque permiten la incorporación de genes mayores. Este enfoque puede usarse para la construcción de vectores basados en adenovirus que portan ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los polipéptidos de FVII modificados descritos para transferencia génica a células de mamífero o animales completos.

Los ácidos nucleicos pueden encapsularse en un vehículo, tal como un liposoma, o introducirse en una célula, tal como una célula bacteriana, particularmente una bacteria atenuada o introducirse en un vector viral. Por ejemplo, cuando se emplean liposomas, pueden usarse proteínas que se unen con una proteína de membrana de superficie celular asociada con endocitosis para dirección y/o para facilitar la captación, por ejemplo proteínas de la cápsida o fragmentos de las mismas tropicas para un tipo celular particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en ciclación, y proteínas que se dirigen a localización intracelular y potencian la semivida intracelular.

Para métodos *ex vivo* e *in vivo*, se introducen moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido de FVII modificado en células que son de un donante adecuado o el sujeto para tratar. Las células en las que un ácido nucleico puede introducirse para fines de terapia incluyen, por ejemplo, cualquier tipo celular disponible, deseado, apropiado para la enfermedad o afección para tratar, incluyendo pero sin limitación células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, tales como células madre obtenidas de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal y otras fuentes de las mismas.

Para tratamiento *ex vivo*, se retiran células de un donante compatible con el sujeto para tratar o células del sujeto para tratar, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas y se administran las células modificadas al sujeto. El tratamiento incluye administración directa, tal como, por ejemplo, encapsulado dentro de membranas porosas, que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 4.892.538 y 5.283.187). Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas y lípidos catiónicos (por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol) electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano y métodos de precipitación con fosfato cálcico. Pueden usarse métodos de suministro de ADN para expresar polipéptidos de FVII modificados *in vivo*. Dichos métodos incluyen suministro de liposomas de ácidos nucleicos y suministro de ADN desnudo, incluyendo un suministro local y sistémico tal como usando electroporación, ultrasonidos y suministro con fosfato cálcico. Otras técnicas incluyen microinyección, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas y fusión de esferoplastos.

La expresión *in vivo* de un polipéptido de FVII modificado puede ligarse a la expresión de moléculas adicionales. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido de FVII modificado puede ligarse a la expresión de un producto citotóxico tal como en un virus modificado técnicamente o expresado en un virus citotóxico. Dichos virus pueden dirigirse a un tipo celular particular que es una diana para un efecto terapéutico. El polipéptido de FVII modificado expresado puede usarse para potenciar la citotoxicidad del virus.

La expresión *in vivo* de un polipéptido de FVII modificado puede incluir unir operativamente un polipéptido de FVII modificado que codifica una molécula de ácido nucleico a secuencias reguladoras específicas tales como un promotor específico de célula o específico de tejido. Los polipéptidos de FVII modificados también pueden expresarse a partir de vectores que infectan específicamente y/o se replican en tipos celulares y/o tejidos diana. Los promotores inducibles pueden usarse para regular selectivamente la expresión de polipéptidos de FVII modificados. Un sistema de expresión regulable ejemplar es el sistema de expresión de gen inducible por doxiciclina, que se ha usado para regular la expresión de FVII recombinante (Srouf *et al.* (2003) Thromb Haemost. 90(3): 398-405).

Pueden administrarse al sujeto moléculas de ácido nucleico, como ácidos nucleicos desnudos o en vectores, cromosomas artificiales, liposomas y otros vehículos por administración sistémica, tópica, local y otras vías de administración. Cuando sea sistémica e *in vivo*, la molécula de ácido nucleico o vehículo que contiene la molécula de ácido nucleico puede dirigirse a una célula.

La administración también puede ser directa, tal como mediante administración de un vector o células que se dirigen típicamente a una célula o tejido. Por ejemplo, las células tumorales y en proliferación pueden ser células diana para expresión *in vivo* de polipéptidos de FVII modificados. Las células usadas para expresión *in vivo* de un polipéptido de FVII modificado también incluyen células autólogas del paciente. Dichas células pueden retirarse de un paciente, introducirse ácidos nucleicos para expresión de un polipéptido de FVII modificado, y después administrarse a un paciente tal como mediante inyección o injerto.

#### H. Usos terapéuticos

Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden usarse para el tratamiento de cualquier afección para la que se emplee FVII recombinante. Típicamente, dichos tratamientos incluyen en los que se desee coagulación aumentada, tal como respuestas hemostáticas aumentadas. Los polipéptidos de FVII modificados tienen actividad terapéutica solos o en combinación con otros agentes. Los polipéptidos modificados proporcionados en el presente documento se diseñan para conservar la actividad terapéutica pero muestran propiedades modificadas, particularmente resistencia aumentada a AT-III y actividad catalítica aumentada. Los polipéptidos modificados proporcionados en el presente documento también pueden mostrar resistencia aumentada a IRFT, resistencia aumentada a los efectos inhibidores de  $Zn^{2+}$ , propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como semivida en suero, unión y/o afinidad aumentada con plaquetas activadas, unión y/o afinidad aumentada con albúmina de suero y/o unión y/o afinidad aumentada con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Dichas propiedades modificadas, por ejemplo, pueden mejorar la eficacia terapéutica de los polipéptidos debido a actividad coagulante aumentada de los polipéptidos de FVII modificados. Esta sección proporciona usos ejemplares y métodos de administración. Estas terapias descritas son ejemplares y no limitan las aplicaciones de polipéptidos de FVII modificados.

Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden usarse en diversos métodos terapéuticos así como de diagnóstico en los que se emplea FVII. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, métodos de tratamiento de condiciones fisiológicas y médicas descritas y enumeradas posteriormente. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden mostrar mejora de las actividades *in vivo* y efectos terapéuticos en comparación con FVII de tipo silvestre, incluyendo dosificación menor para conseguir el mismo efecto, y otras mejoras en la administración y el tratamiento tales como menos administraciones y/o administraciones menos frecuentes, efectos secundarios reducidos y efectos terapéuticos aumentados. Aunque se entiende que los polipéptidos de FVII modificados pueden administrarse como un zimógeno de FVII (es decir forma monocatenaria), típicamente los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento se administran en forma bicatenaria activada después de, por ejemplo, autoactivación o activación por otros factores de coagulación, tales como durante la purificación.

En particular, se pretende que los polipéptidos de FVII modificados se usen en métodos terapéuticos en los que FVII se ha usado para el tratamiento. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, métodos de tratamiento de enfermedades y trastornos, tales como, pero sin limitación, trastornos de coagulación de la sangre, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilias, tales como hemofilia A, hemofilia B y deficiencia del factor VII, y trastornos sanguíneos adquiridos, tales como deficiencia del factor VII adquirida provocada por enfermedad hepática. También pueden usarse polipéptidos de FVII modificados en el tratamiento de enfermedades y trastornos de sangrado adicionales, tales como, pero sin limitación, trombocitopenia (por ejemplo, tal como debido a regímenes quimioterapéuticos), enfermedad de Von Willebrand, trastornos plaquetarios hereditarios (por ejemplo, enfermedad de piscina de almacenamiento tal como síndromes de Chediak-Higashi y Hermansky-Pudlak, disfunción de tromboxano A2, trombostenia de Glanzmann y síndrome de Bernard-Soulier), síndrome hemolítico-urémico, Telangectasia Hemorrágica Hereditaria, también conocida como síndrome de Rendu-Osler-Weber, púrpura alérgica (púrpura de Henoch Schonlein) y coagulación intravascular diseminada.

En algunos ejemplos, los sangrados para tratar por polipéptidos de FVII aparecen en órganos tales como el cerebro, región interna del oído, ojos, hígado, pulmón, tejido tumoral, tracto gastrointestinal. En otros ejemplos, el sangrado es difuso, tal como en gastritis hemorrágica y sangrado uterino profuso. Los pacientes con trastornos de sangrado, tales como por ejemplo, hemofilia A y B, con frecuencia tienen riesgo de complicaciones de sangrado durante la cirugía o el traumatismo. Dicho sangrado puede manifestarse como hemartrosis aguda (sangrado en las articulaciones), artropatía hemofílica crónica, hematomas (por ejemplo, muscular, retroperitoneal, sublingual y retrofaríngeo), hematuria (sangrado del tracto renal), sangrados del sistema nervioso central, sangrados gastrointestinales (por ejemplo, sangrados de UGI) y hemorragia cerebral, que también puede tratarse con polipéptidos de FVII modificados. Adicionalmente, puede tratarse cualquier sangrado asociado con la cirugía (por ejemplo, hepatectomía), o extracción dental con polipéptidos de FVII modificados. En un ejemplo, los polipéptidos de FVII modificados pueden usarse para tratar episodios de sangrado debido a traumatismo o cirugía, o recuento o actividad reducidos de plaquetas, en un sujeto. Los métodos ejemplares para pacientes que se someten a cirugía incluyen tratamientos para evitar la hemorragia y tratamientos antes, durante o después de las cirugías tales como, pero sin limitación, cirugía cardíaca, angioplastia, cirugía pulmonar, cirugía abdominal, cirugía espinal, cirugía cerebral, cirugía vascular, cirugía dental o cirugía de trasplante de órganos, incluyendo trasplante de médula ósea, corazón, pulmón, páncreas o hígado.

El tratamiento de enfermedades y afecciones con polipéptidos de FVII modificados puede efectuarse por cualquier vía adecuada de administración usando formulaciones adecuadas como se describen en el presente documento incluyendo, pero sin limitación, inyección, administración pulmonar, oral y transdérmica. El tratamiento se efectúa típicamente por administración de embolada intravenosa.

5 Si es necesario, una dosificación y duración y protocolo de tratamiento particulares pueden determinarse de forma empírica o extrapolarse. Por ejemplo, pueden usarse dosis ejemplares de polipéptidos de FVII recombinantes y nativos como un punto de partida para determinar dosificaciones apropiadas. Por ejemplo, un polipéptido de FVII recombinante (rFVIIa) que se ha activado a rFVIIa, Novoseven®, se ha administrado a pacientes con hemofilia A o  
10 hemofilia B, que experimentan un episodio de sangrado, a una dosificación de 90 µg/kg por infusión de embolada durante 2 a 5 minutos, consiguiendo un nivel en circulación eficaz de al menos 2 µg/ml con una semivida media de 2,7 horas. La dosis se repite cada 2 horas hasta que se consigue la hemostasia. Los polipéptidos de FVII modificados que tienen una actividad coagulante aumentada, debido a, por ejemplo, resistencia aumentada a AT-III, actividad catalítica aumentada, resistencia aumentada a los efectos inhibidores de Zn<sup>2+</sup>, resistencia aumentada a IRFT, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como semivida en suero aumentada, unión y/o afinidad aumentada con plaquetas activadas, unión y/o afinidad aumentada con albúmina de suero, y/o unión y/o afinidad  
15 aumentada con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , pueden ser eficaces a cantidades y/o frecuencias de dosificación reducidas en comparación con dicho FVII recombinante. Las dosificaciones para polipéptidos de FVII de tipo silvestre o no modificados pueden usarse como orientación para determinar las dosificaciones para polipéptidos de FVII modificados. Pueden usarse factores tales como el nivel de actividad y semivida del FVII modificado en comparación con el FVII no modificado para tomar dicha determinación. Las dosificaciones y los regímenes particulares pueden determinarse de forma empírica.

25 Los niveles y regímenes de dosificación pueden determinarse basándose en dosificaciones y regímenes conocidos y, si es necesario, pueden extrapolarse basándose en los cambios en las propiedades de los polipéptidos modificados y/o pueden determinarse de forma empírica basándose en una diversidad de factores. Dichos factores incluyen el peso corporal del individuo, la salud general, la edad, la actividad del compuesto específico empleado, el sexo, la dieta, el momento de administración, la tasa de secreción, la combinación farmacológica, la gravedad y la evolución de la enfermedad, y la disposición del paciente a la enfermedad y el criterio del médico tratante. El  
30 principio activo, el polipéptido, típicamente se combina con un vehículo farmacéuticamente eficaz. La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una única forma de dosificación o forma de dosificación múltiple puede variar dependiendo del hospedador tratado y el modo de administración particular.

35 El efecto de los polipéptidos de FVII en el tiempo de coagulación de la sangre puede controlarse usando cualquiera de los ensayos de coagulación conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, tiempo de protrombina de sangre completa (PT), el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), el tiempo de coagulación activada (ACT), el tiempo de coagulación activada recalcificada o el tiempo de Coagulación de Lee-White.

40 Tras la mejora de la condición de un paciente, puede administrarse una dosis de mantenimiento de un compuesto o composiciones, si es necesario; y la dosificación, la forma de dosificación, o la frecuencia de administración, o una combinación de las mismas puede modificarse. En algunos casos, un sujeto puede requerir tratamiento intermitente a largo plazo tras cualquier reaparición de síntomas de la enfermedad o basándose en dosificaciones programadas. En otros casos, pueden requerirse administraciones adicionales en respuesta a acontecimientos agudos tales como  
45 hemorragia, traumatismo o procedimientos quirúrgicos.

Las siguientes son algunas condiciones ejemplares para las que se ha usado FVII (administrado como FVIIa) como un agente de tratamiento solo o en combinación con otros agentes.

## 50 1. Trastornos de sangrado congénitos

### a. Hemofilia

55 La hemofilia congénita es un trastorno de la sangre recesivo en el que hay niveles reducidos de factores de coagulación en plasma, lo que conduce a la alteración de la cascada de coagulación y aumento del tiempo de coagulación sanguíneo. La hemofilia A, que representa aproximadamente el 85 % de todos los casos de hemofilia, resulta de una mutación o mutaciones en el gen del factor FVIII en el cromosoma X, lo que conduce a una deficiencia o disfunción de la proteína FVIII. La hemofilia B está causada por una deficiencia o disfunción del factor de coagulación, FIX, generalmente resultante de mutaciones o deleciones puntuales en el gen de FIX en el  
60 cromosoma X. La incidencia global de la hemofilia A es de aproximadamente 1 caso por cada 5000 individuos masculinos, y 1 caso por cada 25000 hombres para hemofilia B. La hemofilia A y B se clasifica adicionalmente como leve, moderada o grave. Un nivel en plasma con 5 %-25 % de factor VIII o IX con funcionamiento normal se clasifica como leve, 1 %-5 % es moderada y menos de 1 % es grave. La hemofilia C, con frecuencia denominada deficiencia de FIX, es una enfermedad relativamente leve y poco habitual, que afecta a aproximadamente 1 de cada 100000  
65 personas de una manera recesiva autosómica.

La hemofilia A y B se manifiesta clínicamente de muchas maneras. Cortes menores y abrasiones no darán como resultado sangrado excesivo, pero los traumatismos y las cirugías sí. El paciente también tendrá numerosos sangrados de articulaciones y músculos y se magullará fácilmente. La hemartrosis o sangrado de las articulaciones es una de las complicaciones principales en la hemofilia, y puede aparecer espontáneamente o en respuesta a traumatismo. Las articulaciones de bisagra, tales como la rodilla, el codo y el tobillo, se ven afectadas más frecuentemente. La cadera y el hombro se ven afectados mucho menos frecuentemente ya que la articulación de rótula tiene más musculatura alrededor, protegiéndola de este modo de la lesión. El sangrado puede provocar dolor agudo grave, movimiento restringido, y conducir a complicaciones secundarias incluyendo hipertrofia sinovial. Además, el sangrado recurrente de las articulaciones puede provocar sinovitis crónica, lo que puede provocar daño de las articulaciones, destruir el sinovio, el cartílago y el hueso. Las hemorragias con peligro para la vida, tales como una hemorragia intracraneal y sangrado en el sistema nervioso central, también afectan a sujetos hemofílicos. El sangrado intracraneal se produce en aproximadamente el 10 % de los pacientes con hemofilia grave, dando como resultado una tasa de mortalidad del 30 %. Por el contrario, la Hemofilia C es más leve. Apenas se ven sangrados espontáneos, y el sangrado en las articulaciones, tejidos blandos y músculos también es poco común. El sangrado se trata en general con transfusión de plasma congelado nuevo (FFP), terapia de reemplazo de FXI o, para tratamiento tópico, dicho tratamiento de heridas externas o extracciones dentales, pegamento de fibrina.

El tratamiento más común para la hemofilia A o B es terapia de reemplazo, en la que se administra al paciente FVIII o FIX. Las formulaciones están disponibles en el mercado como productos derivados de plasma o recombinantes, siendo ahora las proteínas recombinantes el tratamiento elegido en pacientes sin tratamiento previo. Aunque estas terapias pueden ser muy exitosas, surgen complicaciones si el paciente desarrolla inhibidores para el factor VIII o factor IX recién administrado. Son inhibidores anticuerpos IgG, principalmente de la subclase IgG4, que reaccionan con FVIII o FIX e interfieren con la función procoagulante. Los inhibidores afectan a aproximadamente 1 de cada 5 pacientes con hemofilia A grave. La mayoría de los sujetos desarrollan estos inhibidores poco después de la administración de las primeras infusiones de factor VIII, que es con frecuencia en la infancia temprana, aunque algunos sujetos los desarrollan más tarde. Los inhibidores también afectan a aproximadamente 1 de cada 15 personas con hemofilia A leve o moderada. Estos inhibidores se desarrollan habitualmente durante la adultez y no solamente destruyen FVIII exógeno administrado, sino que también destruyen FVIII endógeno. Como resultado, los hemofílicos leves y moderados se vuelven graves. Clínicamente, los pacientes con hemofilia A con inhibidores se clasifican en respuesta alta y baja de acuerdo con la fuerza de la respuesta anamnésica que experimentan cuando se vuelven a exponer a FVIII. Los inhibidores afectan a 1 de cada 100 pacientes con hemofilia B. En la mayoría de los casos, los inhibidores se desarrollan después de las primeras infusiones de factor IX terapéutico y pueden acompañarse de reacciones alérgicas.

Los polipéptidos de FVII modificados presentados en el presente documento pueden usarse para tratar a pacientes con hemofilia, particularmente pacientes con hemofilia con inhibidores. Se ha aprobado y licenciado un producto de FVIIa recombinante (NovoSeven, Novo Nordisk) para tratamiento de episodios de sangrado en pacientes con hemofilia A o B con inhibidores para FVIII o FIX y para la prevención del sangrado en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con hemofilia A o B con inhibidores para FVIII o FIX. El tratamiento con rFVIIa potencia la generación de trombina evitando al mismo tiempo el requisito de FVIIIa y/o FIXa. La coagulación se inicia en el sitio de lesión por la interacción de rFVIIa con FT, dando como resultado activación de FX inicial, generación de trombina y activación de plaquetas. Puede efectuarse coagulación completa por rFVIIa por los mecanismos dependientes de FT e independiente de FT, donde algo de la trombina generada puede resultar de la activación directa de FX en plaquetas activadas por rFVIIa solamente, que se une en sí mismo con plaquetas activadas mediante interacciones de baja afinidad con las membranas fosfolípídicas.

Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden usarse en terapias para hemofilia, incluyendo el tratamiento de episodios de sangrado y la prevención de sangrado en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos. Los polipéptidos de FVII modificados en el presente documento pueden proporcionar resistencia aumentada a AT-III, actividad catalítica aumentada, resistencia aumentada a los efectos inhibidores de  $Zn^{2+}$ , resistencia aumentada a IRFT, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como semivida en suero, unión y/o afinidad aumentada con plaquetas activadas, unión y/o afinidad aumentada con albúmina de suero y/o unión y/o afinidad aumentada con integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Los polipéptidos de FVII pueden presentar por lo tanto mayor actividad coagulante de una manera dependiente de FT (tal como mediante resistencia aumentada a IRFT) y/o de una manera independiente de FT (tal como mediante unión y/o afinidad aumentada con plaquetas activadas). Por lo tanto, los polipéptidos de FVII modificados pueden usarse para suministrar más terapias activas para hemofilia. Los ejemplos de mejoras terapéuticas usando polipéptidos de FVII modificados incluyen por ejemplo, pero sin limitación, dosificaciones menores, menos administraciones y/o administraciones menos frecuentes, efectos secundarios reducidos y efectos terapéuticos aumentados.

Los polipéptidos de FVII modificados típicamente se administran como polipéptidos de FVII activados (FVIIa). Los polipéptidos de FVII modificados pueden ensayarse con respecto a eficacia terapéutica, por ejemplo, usando modelos animales. Por ejemplo pueden tratarse ratones hemofílicos inducidos por anticuerpo, o cualquier otro modelo de enfermedad conocido para hemofilia, con polipéptidos de FVII modificados. La progresión de los síntomas y fenotipos de enfermedad se controla para evaluar los efectos de los polipéptidos de FVII modificados. Los polipéptidos de FVII modificados también pueden administrarse a sujetos tales como en ensayos clínicos para



evaluar las eficacias *in vivo* en comparación con controles de placebo y/o controles usando FVII no modificado.

#### b. Deficiencia de FVII

5 La deficiencia del factor VII es un trastorno de sangrado recesivo autosómico que afecta a aproximadamente 1 de cada 500000 personas. La deficiencia de FVII puede ser clínicamente leve, moderada o grave, caracterizándose la deficiencia leve a moderada por sangrado aumentado después de cirugía y traumatismo. Los pacientes con deficiencia de FVII grave (menos del 1 % de la actividad de FVII) experimentan síntomas similares a la hemofilia. Por ejemplo, los sujetos deficientes en FVII son propensos a sangrado de las articulaciones, sangrados nasales espontáneos, sangrado gastrointestinal, sangrado del tracto urinario. También se han presentado hemorragia intracerebral y sangrados musculares, mientras que las mujeres pueden experimentar menorragia grave (sangrado menstrual profuso). El tratamiento puede efectuarse por terapia de reemplazo. Un producto de FVIIa recombinante (NovoSeven®, Novo Nordisk) se ha aprobado y licenciado para el tratamiento de episodios de sangrado en pacientes con deficiencia de FVII congénita y para la prevención de sangrado en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con deficiencia de FVII congénita. Por lo tanto, los polipéptidos de FVII modificados en el presente documento pueden usarse de forma similar. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de episodios de sangrado y la prevención de sangrado en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes deficientes en FVII. Por ejemplo, a un paciente neonatal que presente deficiencia de FVII grave con hemorragia intracraneal puede administrársele polipéptidos de FVII modificados por embolada intravenosa para efectuar coagulación y mantener la hemostasia. En general los polipéptidos de FVII modificados se administran como polipéptidos de FVII activados (FVIIa).

#### c. Otros

25 Otros trastornos de sangrado pueden tratarse con los polipéptidos de FVII proporcionados en el presente documento para promover la coagulación. Las deficiencias congénitas de factores V y X también están presentes con tiempos de coagulación de sangre aumentados y pueden potencialmente tratarse con la administración de dosis terapéuticas de FVII. Por ejemplo, puede administrarse a un paciente con deficiencia de factor X rFVIIa para controlar el sangrado asociado con esplenectomía (Boggio *et al.* (2001) *Br J Haematol* 112: 1074-1075). Los episodios de sangrado espontáneos y asociados a cirugía asociados con enfermedad de von Willebrand (vWD) también pueden tratarse usando los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento. vWD es un trastorno de sangrado provocado por un defecto o una deficiencia de la proteína de coagulación de la sangre, factor de von Willebrand (vWF), y se estima que se produce en del 1 % al 2 % de la población. Los sujetos con vWD sufren magulladuras fácilmente, tienen sangrados nasales recurrentes, sangran después de extracción de dientes, tonsilectomía u otra cirugía, y las pacientes pueden tener sangrado menstrual aumentado. Pueden usarse polipéptidos de FVII modificados para aliviar el sangrado espontáneo y asociado a cirugía en pacientes con vWD (von Depka *et al.* (2006) *Blood Coagul Fibrin* 17: 311-316). Otros trastornos de sangrado relacionado con plaquetas, tales como por ejemplo, trombostenia de Glanzmann y síndrome de Hermansky-Pudlak también se asocian con actividad de coagulación endógena reducida. El sangrado espontáneo o asociado a cirugía en exceso en pacientes con trastornos de sangrado relacionado con plaquetas también pueden controlarse por dosis terapéuticas de los polipéptidos de FVII modificados. Por ejemplo, un paciente con trombostenia de Glanzmann que se somete a cirugía puede tratarse antes, durante y/o después de la cirugía con los polipéptidos de FVII modificados para prevenir pérdida de sangre importante (van Buuren *et al.* (2002) *Dig Dis Sci* 47: 2134-2136). En general, los polipéptidos de FVII modificados se administran como polipéptidos de FVII activados (FVIIa).

## 2. Trastornos de sangrado adquiridos

#### a. Trombocitopenia adquirida por quimioterapia

50 Los trastornos de sangrado pueden ser adquiridos, en lugar de congénitos. Por ejemplo, el tratamiento con quimioterapia, tal como para leucemia y otros cánceres, puede dar como resultado trombocitopenia. Esto se debe probablemente a una pérdida de producción de plaquetas en la médula ósea de pacientes que reciben quimioterapia, y típicamente sucede 6-10 días después de la medicación. El tratamiento de la trombocitopenia adquirida es habitualmente por transfusión de plaquetas, glóbulos rojos o plasma, que sirve para evitar cualquier sangrado espontáneo anómalo que pueda resultar de deficiencia de plaquetas. El sangrado en pacientes con trombocitopenia inducida por quimioterapia, o cualquier otra trombocitopenia adquirida o congénita, también puede controlarse por la administración de cantidades terapéuticas de los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede administrarse a un paciente trombocitopénico con sangrado incontrolado, tal como el del tracto gastrointestinal, una inyección de embolada intravenosa de una cantidad terapéutica de polipéptido de FVII para detener la hemorragia (Gerotziafas *et al.* (2002) *Am J Hematol* 69: 219-222). En general, los polipéptidos de FVII modificados se administran como polipéptidos de FVII activados (FVIIa).

#### b. Otras coagulopatías

65 Otras coagulopatías adquiridas pueden tratarse usando los polipéptidos de FVII modificados presentados en el

presente documento. La coagulopatía puede resultar de afecciones incluyendo, pero sin limitación, insuficiencia hepática fulminante (FHF; tal como provocada por fármacos hepatotóxicos, toxinas, enfermedades metabólicas, enfermedades infecciosas e isquemia), otra enfermedad hepática, incluyendo cirrosis y enfermedad asociada con enfermedad de Wilson, deficiencia de vitamina K (tal como provocada por tratamiento con antibióticos o dieta), síndrome urémico hemolítico, trombocitopenia trombótica (TTC) y coagulopatía intravascular diseminada (DIC). El tratamiento convencional es generalmente por transfusión con plasma, glóbulos rojos (RBC), o plaquetas, pero puede no tener éxito. En un ejemplo, los polipéptidos de FVII modificados pueden administrarse a un paciente con FHF que se somete a procedimientos invasivos para evitar el sangrado. El tratamiento convencional con plasma congelado nuevo (FFP) con frecuencia no tiene éxito y puede requerir grandes cantidades de plasma, lo que produce una sobrecarga de volumen y anasarca (una infiltración generalizada de fluido de edema en tejido conectivo subcutáneo). El tratamiento con cantidades terapéuticas de polipéptidos de FVII modificados por embolada intravenosa durante, antes y/o después de la cirugía invasiva, tal como por ejemplo, biopsia de hígado o trasplante de hígado, puede evitar el sangrado y establecer hemostasia en pacientes con FHF. El paciente puede controlarse por PT de la sangre para determinar la eficacia del tratamiento (Shami *et al.* (2003) *Liver Transpl* 9: 138-143). En otro ejemplo, puede administrarse FVII a un paciente con sangrado grave asociado con coagulopatía, tal como por ejemplo, sangrado intraabdominal postcesárea grave asociado con disfunción del hígado y DIC, que no respondió a infusiones de transfusiones convencionales (Moscardo *et al.* (2001) *Br J Haematol* 113: 174-176). Además, los polipéptidos de FVII modificados pueden usarse para tratar coagulopatía en pacientes neonatales y pediátricos. En un ejemplo particular, los pacientes neonatales y pediátricos no responden al tratamiento convencional, tal como infusión de RBC y plaquetas. Por ejemplo, a neonatos con hemorragia pulmonar grave asociada con PT aumentados que no respondieron a transfusión de RBC y plaquetas se les puede administrar polipéptidos de FVII modificados para reducir PT y establecer la hemostasia (Olomu *et al.* (2002) *J Perinatol* 22: 672-674). Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento muestran actividad de coagulación potenciada en comparación con polipéptidos de FVII no modificados, y pueden por lo tanto administrarse, por ejemplo, a dosis menores, menos frecuentemente y con menos reacciones adversas. Generalmente los polipéptidos de FVII modificados se administran como polipéptidos de FVII activados (FVIIa).

### c. Sangrado adquirido por trasplante

El sangrado grave después del trasplante de médula ósea (BMT) y trasplante de células madre (SCT) es una complicación relativamente común y con peligro para la vida asociada con estos procedimientos, debido a la reducción de plaquetas. Por ejemplo, la hemorragia alveolar difusa (DAH) es una complicación pulmonar de BMT con una incidencia estimada del 1-21 % en la población con trasplante, y una tasa de mortalidad del 60-100 %. El tratamiento convencional de dichos episodios de sangrado incluye tratamiento con corticosteroides y transfusión con plasma, plaquetas y/o RBC, aunque estos en gran medida no tienen éxito con una tasa de mortalidad global de aproximadamente el 50 % (Hicks *et al.* (2002) *Bone Marrow Transpl* 30: 975-978). La administración de FVII por embolada intravenosa, con o sin tratamiento simultáneo con corticosteroides y/o infusión de plaquetas, puede realizarse para tratar la DAH y establecer hemostasia (Hicks *et al.* (2002) *Bone Marrow Transpl* 30: 975-978). Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento muestran actividad de coagulación potenciada en comparación con polipéptidos de FVII no modificados, y podrían administrarse, por lo tanto, por ejemplo, a dosis menores, menos frecuentemente, durante una duración del tratamiento más corta, y con menos reacciones adversas para la misma actividad y eficacia biológica. En general los polipéptidos de FVII modificados se administran como polipéptidos de FVII activados (FVIIa).

### d. Sangrado inducido por terapia anticoagulante

Los pacientes que se someten a terapias anticoagulantes para tratamiento de afecciones, tales como tromboembolia, pueden mostrar episodios de sangrado tras la administración aguda de anticoagulantes, tales como warfarina, heparina y fondaparinux, o desarrollar trastornos hemorrágicos como resultado del uso a largo plazo de dichas terapias. Los tratamientos para episodios de sangrado típicamente incluyen administración de procoagulantes, tales como vitamina K, plasma, FIX exógeno y protaminas para neutralizar heparina. También puede realizarse administración de FVII exógeno para neutralizar el efecto de los anticoagulantes, aumentar el PT, aPTT y/u otros marcadores de la coagulación y establecer la hemostasia (Deveras *et al.* (2002) *Ann Inten Med* 137: 884-888). Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden usarse en tratamientos para controlar episodios de sangrado en pacientes con trastornos de sangrado adquiridos debido a tratamientos con anticoagulantes. En general los polipéptidos de FVII modificados se administran como polipéptidos de FVII activados (FVIIa).

### e. Hemofilia adquirida

Pueden desarrollarse espontáneamente inhibidores del factor VIII en individuos por lo demás sanos, dando como resultado una afección conocida como "hemofilia adquirida". La hemofilia adquirida es una afección poco habitual, con una incidencia anual de 0,2-1,0 por millón de población. Los autoanticuerpos son principalmente anticuerpos IgG4, que, cuando se unen a FVIII, inhiben la actividad de FVIII interfiriendo con la escisión por trombina, interacción con el factor de von Willebrand y/o unión a fosfolípidos. Esto da como resultado hemorragia con peligro para la vida en aproximadamente el 87 % de los pacientes afectados. Son sitios comunes de sangrado la piel, mucosa, músculos

y retroperitoneo, en contrastes con pacientes con hemofilia hereditaria que sangran predominantemente en articulaciones y músculos. La hemofilia adquirida puede tratarse con un concentrado de complejo de protrombina activado o factor VII activado recombinante (NovoSeven®, Novo Nordisk) para controlar episodios de sangrado. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento muestran actividad de coagulación potenciada en comparación con polipéptidos de FVII no modificados, y pueden por lo tanto administrarse, por ejemplo, a dosis menores, menos frecuentemente, durante una duración de tratamiento más corta, y con menos reacciones adversas para la misma actividad y eficacia biológica. En general, los polipéptidos de FVII modificados se administran como polipéptidos de FVII activados (FVIIa).

### 10 3. Sangrado por traumatismo y quirúrgico

Pueden usarse polipéptidos de FVII como terapia para tratar el sangrado asociado con pérdida de sangre perioperatoria y traumática en sujetos con sistemas de coagulación normales. Por ejemplo, pueden administrarse polipéptidos de FVII a un paciente para promover la coagulación y reducir la pérdida de sangre asociada con cirugía y, además, reducir la necesidad de transfusión sanguínea. En un ejemplo, pueden administrarse polipéptidos de FVII a sujetos que se someten a prostatectomía retropúbica. La prostatectomía retropúbica se asocia con frecuencia con pérdida de sangre importante y una necesidad posterior de transfusión. A sujetos que se someten a dicha cirugía o una similar se les puede proporcionar una embolada intravenosa de una cantidad terapéutica de FVII en la fase operatoria temprana para reducir la pérdida de sangre perioperatoria potenciando la coagulación en el sitio de cirugía. La reducción de pérdida de sangre da como resultado eliminación de la necesidad de transfusión sanguínea en estos pacientes (Friederich *et al.* (2003) *Lancet* 361: 201-205). Pueden administrarse polipéptidos de FVII a pacientes con coagulación normal que se someten a otros tipos de cirugía para efectuar hemostasia rápida y evitar la pérdida de sangre. Los ejemplos no limitantes de procedimientos quirúrgicos en los que pueden usarse FVII, típicamente administrado en la forma activada (es decir FVIIa) en una terapia para reducir el sangrado perioperatorio incluyen, pero sin limitación, cirugía de válvulas cardíacas (Al Douri *et al.* (2000) *Blood Coag Fibrinol* 11: S121-5127), reemplazo de la válvula aórtica (Kastrup *et al.* (2002) *Ann Thorac Surg* 74: 910-912), resección de hemangiopericitoma recurrente (Gerlach *et al.* (2002) *J Neurosurg* 96: 946-948), cirugía de cáncer (Sajdak *et al.* (2002) *Eur J Gynaecol Oncol* 23: 325-326) y cirugía en úlceras duodenales (Vlot *et al.* (2000) *Am J Med* 108: 421-423). El tratamiento con FVII puede promover la hemostasia en el sitio de cirugía y reducir o prevenir la pérdida de sangre, reduciendo o anulando de este modo la necesidad de transfusión. Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento se diseñan para mostrar actividad de coagulación potenciada en comparación con polipéptidos de FVII no modificados, y podrían por lo tanto administrarse, por ejemplo, a dosis menores, menos frecuentemente, y con menos reacciones adversas. Generalmente los polipéptidos de FVII modificados se administran como polipéptidos de FVII activados (FVIIa).

También pueden usarse polipéptidos del factor VII para promover la coagulación y evitar la pérdida de sangre en sujetos con lesión traumática. El traumatismo se define como una lesión al tejido vivo por un agente extrínseco, y es la cuarta causa principal de muerte en los Estados Unidos. El traumatismo se clasifica como traumatismo contuso (que da como resultado compresión interna, daño a los órganos y hemorragia interna) o traumatismo penetrante (una consecuencia de un agente que penetra en el cuerpo y destruye tejido, vasos y órganos, dando como resultado hemorragia externa). El traumatismo puede estar provocado por varios acontecimientos incluyendo, pero sin limitación, accidentes de vehículos (que provocan traumatismo contuso y/o penetrante), heridas de bala (que provocan traumatismo penetrante), heridas de apuñalamiento (que provocan traumatismo penetrante), accidentes de maquinaria (que provocan traumatismo penetrante y/o contuso), y caídas desde alturas significativas (que provocan traumatismo penetrante y/o contuso). La hemorragia descontrolada como resultado del traumatismo es responsable de la mayoría de la mortalidad asociada. La coagulopatía difusa es una complicación relativamente común asociada con pacientes de traumatismo, que aparece en hasta el 25-36 % de los sujetos. La coagulopatía puede desarrollarse poco después de la lesión, resultando de una diversidad de factores tales como dilución y consumo de factores de coagulación y plaquetas, fibrinólisis, acidosis e hipotermia. El tratamiento convencional implica terapia de reemplazo por transfusión con plasma congelado nuevo (FFP), plaquetas, RBC y/o crioprecipitado, corrección de acidosis y tratamiento de la hipotermia. Estas etapas son con frecuencia insuficientes para detener el sangrado y evitar la muerte. El tratamiento por administración de cantidades terapéuticas de FVII puede promover la coagulación y reducir la pérdida de sangre en pacientes de traumatismo. Por ejemplo, a un paciente con una herida de bala que presenta sangrado masivo, además de intervención quirúrgica, se le administra FVII para controlar el sangrado coagulopático (Kenet *et al.* (1999) *Lancet* 354: 1879). La terapia de coagulación con FVII puede reducir eficazmente la pérdida de sangre y hemorragia en pacientes con traumatismo contuso y penetrante (Rizoli *et al.* (2006) *Crit Care* 10: R178). Los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento se diseñan para mostrar actividad de coagulación potenciada en comparación con polipéptidos de FVII no modificados, y podrían por lo tanto administrarse, por ejemplo, a dosis menores, menos frecuentemente y con menos reacciones adversas. En general los polipéptidos de FVII modificados se administran como polipéptidos de FVII activados (FVIIa).

#### I. Terapias de combinación

Puede administrarse cualquiera de los polipéptidos de FVII modificados descritos en el presente documento en combinación con, antes de, simultáneamente con, o después de, otros agentes o procedimientos terapéuticos incluyendo, pero sin limitación, otros productos biológicos, compuestos de moléculas pequeñas y cirugía. Para

cualquier enfermedad o afección, incluyendo todas las ejemplificadas anteriormente, para la que se indica FVII (incluyendo FVIIa y rFVIIa) o se ha usado y para la que están disponibles otros agentes y tratamientos, FVII puede usarse en combinación con los mismos. Por lo tanto, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en el presente documento pueden usarse de forma similar. Dependiendo de la enfermedad o afección para tratar, las combinaciones ejemplares incluyen, pero sin limitación, combinación con otros factores de coagulación recombinantes o purificados en plasma, procoagulantes, tales como vitamina K, derivado de vitamina K e inhibidores de proteína C, plasma, plaquetas, glóbulos rojos y corticosteroides.

#### J. Artículos de fabricación y kits

Pueden envasarse compuestos farmacéuticos de polipéptidos de FVII modificados o ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de FVII modificados, o un derivado o una parte biológicamente activa de los mismos como artículos de fabricación que contienen material de envasado, una composición farmacéutica que es eficaz para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno hemostático, y una etiqueta que indica que el polipéptido de FVII modificado o molécula de ácido nucleico debe usarse para tratar una enfermedad o un trastorno hemostático.

Los artículos de fabricación descritos en el presente documento contienen materiales de envasado. Los expertos en la materia conocen bien materiales de envasado para su uso en envasado de productos farmacéuticos. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.352. Los ejemplos de materiales de envasado farmacéuticos incluyen, pero sin limitación, envases de blíster, frascos, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, frascos y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y modo pretendido de administración y tratamiento. Se contempla una amplia serie de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionados en el presente documento así como una diversidad de tratamientos para cualquier enfermedad o trastorno hemostático.

Los polipéptidos de FVII modificados y moléculas de ácido nucleico también pueden proporcionarse como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en el presente documento y un artículo para administración. Por ejemplo, pueden proporcionarse un FVII modificado con un dispositivo para administración, tal como una jeringa, un inhalador, una copa de dosificación, un cuentagotas o un aplicador. El kit puede incluir, opcionalmente, instrucciones para su aplicación incluyendo dosificaciones, regímenes de dosificación e instrucciones para modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en el presente documento y un artículo para diagnóstico. Por ejemplo, dichos kits pueden incluir un artículo para medir la concentración, cantidad o actividad de FVII o un sistema regulado por FVII de un sujeto.

Los siguientes ejemplos se incluyen para fines ilustrativos solamente y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

#### K. Ejemplos

##### Ejemplo 1

##### Clonación y expresión de FVII

##### A. Clonación de FVII

Los nucleótidos que codifican el polipéptido precursor de isoforma de FVII humano de 466 aminoácidos (P08709; expuesto en SEQ ID NO: 1) se clonaron en el vector de expresión de mamíferos, pCMV Script (Stratagene; SEQ ID NO: 99), que contiene un promotor de citomegalovirus (CMV). Brevemente, se usaron los oligonucleótidos CBO-125 (SEQ ID NO: 100) y CBO-126 (SEQ ID NO: 101) como cebadores directo e inverso, respectivamente, para amplificar la secuencia de FVII por PCR usando ADNc de FVII humano (Invitrogen) como el molde. El cebador CBO-125 contenía un sitio de restricción BamHI (en negrita), una secuencia de Kozak (doble subrayado), seguido de 18 nucleótidos con homología para el extremo 5' de la secuencia de ADNc de FVII (subrayado), incluyendo el codón de inicio ATG. El cebador CBO-126 contenía un sitio de restricción EcoRI (en negrita), un codón de terminación (doble subrayado) y 21 nucleótidos con homología para el extremo 3' de la secuencia de ADNc de FVII (subrayado).

Cebador directo CBO-125

5' gcatcatgacgtgacggatccgaccatggtctcccaggccctc 3'

Cebador inverso CBO-126

5' gatcgtacgatacgtgaattcctagggaaatggggctcgcaggag 3'

Se usaron condiciones de reacción y termociclación de PCR convencionales junto con el kit de PCR KoD HiFi (EMD Biosciences), como se recomienda por el fabricante. El producto de PCR se digirió con enzimas de restricción BamHI y EcoRI y se ligó en los sitios de restricción BamHI y EcoRI del vector pCMV Script usando técnicas moleculares convencionales. El vector se transformó después en *Escherichia coli*. Se cultivaron colonias seleccionadas y se recogieron células bacterianas para purificación del plásmido usando técnicas de biología molecular rutinarias.

## B. Generación de variantes de FVII

Se generaron variantes de FVII usando el kit de Mutagénesis Dirigida QuikChange II XL (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con oligonucleótidos específicamente diseñados que actuaron como cebadores que incorporaban una mutación particular en ADN de nueva síntesis. El método QuikChange implica la amplificación lineal de ADN molde por la ADN polimerasa de alta afinidad PfuUltra. Los cebadores complementarios que incluyen la mutación deseada se extendieron durante la ciclación usando vector pCMV Script superenrollado bicatenario, purificado, que contenía la secuencia de ADNc de FVII clonada como un molde. La extensión de los cebadores dio como resultado la incorporación de la mutación de interés en cadenas de nueva síntesis, y dio como resultado un plásmido mutado con muescas escalonadas. Después de la amplificación, el ácido nucleico se trató con Dpn I, que digiere las cadenas parentales dam metiladas del vector pCMV Script derivado de *E. coli*. Esto dio como resultado la “selección” de los plásmidos mutados de nueva síntesis, que no estaban metilados. El ADN del vector que contenía la mutación o las mutaciones deseadas se transformó en células *E. coli* ultracompetentes XL10-Gold, donde la ligasa bacteriana reparó las muescas y permitió que se produjera replicación normal.

La Tabla 13 posterior expone las variantes de FVII que se generaron. En algunos casos, se generaron variantes de FVII en las que se insertó una secuencia de unión para integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  en diversas regiones del polipéptido de FVII. Se insertó una de tres secuencias de unión a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  diferentes: SFGRGDIRNV (SEQ ID NO: 110); CSFGRGDIRNVC (SEQ ID NO: 111); o GGGSCSFGRGDIRNVC (SEQ ID NO: 112). Las secuencias de unión a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  se insertaron en el extremo C terminal del polipéptido de FVII después del resto de aminoácido P406 por numeración de FVII maduro, o se insertaron por delección y reemplazo de los restos de aminoácidos de FVII S103 a S111, H115 a S126 o T127 a P134 por numeración de FVII maduro. También se generaron otras variantes de FVII en las que se insertó una secuencia de unión a albúmina de suero. Estas variantes de FVII contenían una de siete secuencias de unión a albúmina de suero diferentes: QRLMEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID NO: 103), IEDICLPRWGCLWE (SEQ ID NO: 104), DICLPRWGCLWED (SEQ ID NO: 105), IEDICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 106), GGGSIDICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 107), DICLPRWGCLWED (SEQ ID NO: 108), o GGGSDICLPRWGCLWED (SEQ ID NO: 109). Las secuencias de unión a albúmina de suero se insertaron en el extremo C terminal del polipéptido de FVII después del resto de aminoácido P406 por numeración de FVII maduro, o se insertaron por delección y reemplazo de los restos de aminoácidos de FVII S103 a S111, H115 a S126 o T127 a P134 por numeración de FVII maduro. Las variantes de FVII de “Intercambio de Gla FIX” (es decir un polipéptido de FVII en el que el dominio Gla endógeno se ha reemplazado con el dominio Gla de FIX) contienen restos de aminoácidos Y1 a Y45 de SEQ ID NO: 83 en el extremo N terminal. En algunos ejemplos, las variantes de “Intercambio de Gla FIX” contienen una o más sustituciones de aminoácidos en la parte de dominio Gla de FIX. Se incluyen mutaciones que están en la parte de dominio Gla de FIX entre llaves y se hace referencia a ellas usando posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido de FIX de tipo silvestre maduro, o el dominio Gla de FIX de tipo silvestre expuesto en SEQ ID NO: 83. Por ejemplo, {Intercambio de Gla FIX/M19K} indica que el polipéptido de FVII modificado contiene un dominio Gla de FIX heterólogo en el que la metionina en la posición 19 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83 se reemplaza con una lisina. En la Tabla 13 posterior están representados los restos de aminoácidos en los que se inserta la secuencia de unión a albúmina de suero o integrina de plaquetas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  en el polipéptido de FVII, y la secuencia de aminoácidos de la secuencia de unión. Por ejemplo, H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF indica que los restos de aminoácidos H115 a S126 se han suprimido y reemplazado con una secuencia de unión a albúmina de suero con la secuencia de aminoácidos QRLMEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID NO: 103).

Tabla 13. Variantes del factor VII

Variante (numeración de FVII maduro)	Variante (numeración de quimotripsina)	Polipéptido de FVII SEQ ID NO
Tipo silvestre	Tipo silvestre	3
Q286N	Q143N	113
Q286E	Q143E	114
Q286D	Q143D	115
Q286S	Q143S	116
Q286T	Q143T	117
Q286R	Q143R	118
Q286K	Q143K	119
Q286A	Q143A	120
Q286V	Q143V	121
Q286M	Q143M	122
Q286L	Q143L	123
Q286Y	Q143Y	124
Intercambio de Gla FIX/Q286R	Intercambio de Gla FIX/Q143R	131
H257A/Q286R	H117A/Q143R	132
S222A/Q286R	S82A/Q143R	133
S222A/H257A/Q286R	S82A/H117A/Q143R	134

ES 2 577 055 T3

Variante (numeración de FVII maduro)	Variante (numeración de quimotripsina)	Polipéptido de FVII SEQ ID NO
Intercambio de Gla FIX/ S222A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/S82A/Q143R	135
Intercambio de Gla FIX/H257A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/H117A/Q143R	136
Intercambio de Gla FIX /S222A/H257A/ Q286R	Intercambio de Gla FIX /S82A/H117A/ Q143R	137
Q286R/M298Q	Q143R/IM156Q	138
Q286R/M298Q/K341Q	K192Q/Q143R/M156Q	139
K199E/Q286R/M298Q	K60cE/Q143R/M156Q	140
Intercambio de Gla FIX/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/Q143R/M156Q	141
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V	142
Q286R/A292N/A294S/Q366V	Q143R/A150N/A152S/Q217V	143
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	144
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V	145
H257S/Q286R	H117S/Q143R	146
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	147
S222A/H257A/Q286R/Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	148
Q286R/H373A	Q143R/H224A	149
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	150
V158D/E296V/M298Q	V158D/E296V/M298Q	158
Q286R/K341D	Q143R/K192D	151
Q286R/Q366D	Q143R/Q217D	152
Q286R/Q366N	Q143R/Q217N	153
Q286R/M298Q/Q366D	Q143R/M156Q/Q217D	154
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	155
Q286R/H373F	Q143R/H224F	156
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	157
T239S	T99S	159
T239N	T99N	160
T239Q	T99Q	161
T239V	T99V	162
T239L	T99L	163
T239H	T99H	164
T239I	T99I	165
P321K	P170iK	166
P321E	P170iE	167
P321Y	P170iY	168
P321S	P170iS	169
Q366D	Q217D	170
Q366E	Q217E	171
Q366N	Q217N	172
Q366T	Q217T	173
Q366S	Q217S	174
Q366V	Q217V	175
Q366I	Q217I	176
Q366L	Q217L	177
Q366M	Q217M	178
H373D	H224D	179
H373E	H224E	180
H373S	H224S	181
H373F	H224F	182
H373A	H224A	183
Q366D/H373E	Q217D/H224E	184
Q366V/H373V	Q217V/H224V	185
Q366V/H373L	Q217V/H224L	186
Q366V/H373I	Q217V/H224I	187
K161S	K24S	188
K161A	K24A	189
K161V	K24V	190
H216S	H76S	191
H216A	H76A	192
H216K	H76K	193

ES 2 577 055 T3

Variante (numeración de FVII maduro)	Variante (numeración de quimotripsina)	Polipéptido de FVII SEQ ID NO
H216R	H76R	194
S222A	S82A	195
S222K	S82K	196
S222V	S82V	197
S222D	S82D	200
S222N	S82N	198
S222E	S82E	199
H257A	H117A	201
H257S	H117S	202
S222K/H257A	S82K/H117A	203
H216A/H257A	H76A/H117A	204
H216A/S222A	H76A/S82A	205
S52A	S[52]A	206
S60A	S[60]A	207
E394N/P395A/R396S	E245N/P246A/R247S	208
R202S	R62S	209
A292N/A294S	A150N/A152S	210
G318N	G170fN	211
A175S	A39S	212
K109N	K-26N	213
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	214
A51N	A-84N	215
T130N/E132S	T[130]N/E[132]S	216
S50A/S62A	S[50]A/S[62]A	217
A122N/G124S/E394N/P395A/R396S	A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/ R247S	218
A122N/G124S/E394N/P395A/R396S/G318N	A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/ R247S/G170fN	219
S52N/P54S	S[52]N/P[54]S	220
S119N/L121S	S[119]N/L[121]S	221
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	222
Q66N/Y68S	Q[66]N/Y[68]S	223
S52N/P54S/A122N/G124S/E394N/P395A/R396S	S[52]N/P[54]S/A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/ R247S	224
K109N/A292N/A294S	[K109N]/A150N/A152S	225
K109N/A175S	[K109N]/A39S	226
V158T/L287T/M298K	V21T/L144T/M156K	256
V158D/L287T/M298K	V21D/L144T/M156K	257
S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWED DF	S[103]S[111]delinsQRLMEDICLP RWGCLWEDDF	227
H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWED DF	H[115]S[126]delinsQRLMEDICL PRWGCLWEDDF	228
T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWED DF	T[128]P[134]delinsQRLMEDICLP RWGCLWEDDF	229
S103S111delinsIEDICLPRWGCL WE	S[103]S[111]delinsIEDICLPRWG CLWE	230
H115S126delinsIEDICLPRWGCL WE	H[115]S[126]delinsIEDICLPRWG CLWE	231
T128P134delinsIEDICLPRWGCL WE	T[128]P[134]delinsIEDICLPRWG CLWE	232
S103S111delinsDICLPRWGCLWE D	S[103]S[111]delinsDICLPRWGC LWED	233
H115S126deinsDICLPRWGCLWE D	H[115]S[126]delinsDICLPRWGC LWED	234
T128P134delinsDICLPRWGCLWE D	T[128]P[134]delinsDICLPRWGC LWED	235
P406insIEDICLPRWGCLW	P257insTEDICLPRWGCLW	236
P406insGGGSIEDICLPRWGCLW	P257insGGGSIEDICLPRWGCL W	237
P406insDICLPRWGCLWED	P257insDICLPRWGCLWED	238
P406insGGGSDICLPRWGCLWED	P257insGGGSDICLPRWGCLWE D	239
S103S111delinsSFGRGDIRNV	S[103]S[111]delinsSFGRGDIRNV	240
H115S126delinsSFGRGDIRNV	H[115]S[126]delinsSFGRGDIRN V	241
T127P134delinsSFGRGDIRTN	T[128]P[134]delinsSFGRGDIRNV	242
P406insCSFGRGDIRNVC	P257insCSFGRGDIRNVC	243
P406insGGGSCSFGRGDIRNVC	P257insGGGSCSFGRGDIRNVC	244
Intercambio de Gla FIX/S222A	Intercambio de Gla FIX/S82A	245
Intercambio de Gla FIX/H257A	Intercambio de Gla FIX/H117A	246
Intercambio de Gla FIX/S222A/H257A	Intercambio de Gla FIX/S82A/H117A	247

ES 2 577 055 T3

Variante (numeración de FVII maduro)	Variante (numeración de quimotripsina)	Polipéptido de FVII SEQ ID NO
S222A/M298Q	S82A/M156Q	248
H257A/M298Q	H117A/M156Q	249
S222A/H257A/M298Q	S82A/H117A/M156Q	250
S222A/A292N/A294S/Q366V	S82A/A150N/A152S/Q217V	251
A175S/S222A/Q366V	A39S/S82A/Q217V	252
S222A/Q366V	S82A/Q217V	253
H257S/Q366V	H117S/Q217V	254
S222A/H373A	S82A/H224A	255
S103S111delinsIEDICLPRWGCL WE/G237V	S[103]S[111]delinsIEDICLPRWG CLWE/G97V	258
S103S111delinsDICLPRWGCLWE D/G237V	S[103]S[111]delinsDICLPRWGC LWED/G97V	259
H115S126delinsQRLMEDICLPRW GCLWEDDF/G237V	H[115]S[126]delinsQRLMEDICL PRWGCLWEDDF/G97V	260
H115S126delinsIEDICLPRWGCL WE/G237V	H[115]S[126]delinsIEDICLPRWG CLWE/G97V	261
H115S126delinsDICLPRWGCLWE D/G237V	H[115]S[126]delinsDICLPRWGC LWED/G97V	262
T128P134delinsQRLMEDICLPRW GCLWEDDF/G237V	T[128]P[134]delinsQRLMEDICLP RWGCLWEDDF/G97V	263
T128P134delinsIEDICLPRWGCL WE/G237V	T[128]P[134]delinsIEDICLPRWG CLWE/G97V	264
S103S111delinsQRLMEDICLPRW GCLWEDDF/G237V	S[103]S[111]delinsQRLMEDICLP RWGCLWEDDF/G97V	265
T128P134delinsDICLPRWGCLWE D/G237V	T[128]P[134]delinsDICLPRWGC LWED/G97V	266
S103S111delinsSFGRGDERNV/G2 37V	S[103]S[111]delinsSFGRGDIRNV /G97V	267
H115S126delinsSFGRGDIRINV/G2 37V	H[115]S[126]delinsSFGRGDIRN V/G97V	268
T128P134delinsSFGRGDIRNV/G2 37V	T[128]P[134]delinsSFGRGDIRNV /G97V	269
M298Q/H373F	M156Q/H224F	270
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	271
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	272
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	273
{Intercambio de GlaFIX/E40L}/Q286R/M298 Q	{Intercambio de GlaFIX/E[40]L}/Q143R/M1 56Q	274
{Intercambio de GlaFIX/K43I}/Q286R/M298 Q	{Intercambio de GlaFIX/K[43]I}/Q143R/M1 56Q	275
{Intercambio de GlaFIX/Q44S}/Q286R/M298 Q	{Intercambio de GlaFIX/Q[44]S}/Q143R/M 156Q	276
{Intercambio de GlaFIX/M19K}/Q286R/M29 8Q	{Intercambio de GlaFIX/M[19]K}/Q143R/M 156Q	277
{Intercambio de GlaFIX/M19K/E40L/K43I/Q 44S}/Q286R/M298Q	{Intercambio de GlaFIX/M[19]K/E[40]L/K[43]I/Q[44]S}/Q14 3R/M156Q	278
T128N/P129A/Q286R	T[128]N/P[129]A/Q143R	279
T128N/P129A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/Q 143R/M156Q	280
T128N/P129A/Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H224F	281
V158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	282
T128N/P129A/V158D/E296V/M29 8Q	T[128]N/P[129]A/V21D/E154V/M 156Q	283
T128N/P129A/S222A	T[128]N/P[129]A/S82A	284
Intercambio de GlaFIX/T128N/P129A/S222A/ Q286R	Intercambio de GlaFIX/T[128]N/P[129]A/S8 2A/Q143R	285
Intercambio de GlaFIX/T128N/P129A/Q286R /M298Q	Intercambio de GlaFIX/T[128]N/P[129]A/Q1 43R/M156Q	286
T128N/P129A/S222A/H257A/Q286 R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/H117A/Q 143R/M156Q	287
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H37 3F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/ H224F	288
S52A/S60A/V158D/E296V/M298Q	S[52]A/S[60]A/V21D/E154V/M15 6Q	289
S52A/S60A/Q286R	S[52]A/S[60]A/Q143R	290
S52A/S60A/S222A	S[52]A/S[60]A/S82A	291
Intercambio de GlaFIX/S52A/S60A/S222A/Q 286R	Intercambio de GlaFIX/S[52]A/S[60]A/S82A /Q143R	292
S52A/S60A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q 143R/M156Q	293
S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/ M298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H117A/Q14 3R/M156Q	298



ES 2 577 055 T3

Variante (numeración de FVII maduro)	Variante (numeración de quimotripsina)	Polipéptido de FVII SEQ ID NO
S52A/S60A/Q286R/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/H224F	296
S52A/S60A/Q286R/M298Q/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q/H2 24F	297
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	298
T239V/Q286R	T99V/Q143R	299
S222A/T239V	S82A/T99V	300
Intercambio de GlaFIX/S222A/T239V/Q286R	Intercambio de GlaFIX/S82A/T99V/Q143R	301
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	302
S222A/T239V/H257A/Q286R/M29 8Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/M156 Q	303
Intercambio de GlaFIX/T239V/Q286R/M298 Q	Intercambio de GlaFIX/T99V/Q143R/M 156 Q	304
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	305
T239V/Q286R/M298Q/H373F	T99V/Q143R/M156Q/H224F	306
V158D/T239I/E296V/M298Q	V21D/T99I/E154V/M156Q	307
T239I/Q286R	T99I/Q143R	308
S222A/T239I	S82A/T99I	309
Intercambio de GlaFIX/S222A/T239I/Q286R	Intercambio de GlaFIX/S82A/T99I/Q143R	310
T239I/Q286R/M298Q	T99I/Q143R/M156Q	311
S222A/T239I/H257A/Q286R/M298 Q	S82A/T99I/H117A/Q143R/M156Q	312
Intercambio de GlaFIX/T239I/Q286R/M298Q	Intercambio de GlaFIX/T99I/Q143R/M156Q	313
T239I/Q286R/H373F	T99I/Q143R/H224F	314
T239I/Q286R/M298Q/H373F	T99I/Q143R/M156Q/H224F	315
Intercambio de GlaFIX/S222A/Q286R/H373F	Intercambio de GlaFIX/S82A/Q143R/H224F	316
Intercambio de GlaFIX/S222A/Q286R/M298 Q	Intercambio de GlaFIX/S82A/Q143R/M156 Q	317
Intercambio de GlaFIX/S222A/Q286R/M298 Q/H373F	Intercambio de GlaFIX/S82A/Q143R/M156 Q/H224F	318
V158D/E296V/M298Q/H373F	V21D/E154V/M156Q/H224F	319
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H37 3F	V21D/Q143R/E154V/M156Q/H22 4F	320
H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	321
H257S/Q286R/M298Q	H117S/Q143R/M156Q	322
Intercambio de GlaFIX/S222A/H257S/Q286R	Intercambio de GlaFIX/S82A/H117S/Q143R	323
S222A/H257S/Q286R/M298Q	S82A/H117S/Q143R/M156Q	324
H257S/Q286R/M298Q/H373F	H117S/Q143R/M156Q/H224F	325
S222A/Q286R/M298Q/H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	326
Intercambio de GlaFIX/Q366V	Intercambio de GlaFIX/Q217V	327
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	328
T128N/P129A/A175S/Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/Q217V	329
A122N/G124S/A175S/Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/Q217V/	330
T128N/P129A/A175S/S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A	331
A122N/G124S/A175S/S222A	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A	332
T128N/P129A/A175S/Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/Q 143R	333
A122N/G124S/A175S/Q286R	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R	334
Intercambio de GlaFIX/T128N/P129A/A175S/ S222A/Q286R	Intercambio de GlaFIX/T[128]N/P[129]A/A3 9S/S82A/Q143R	335
Intercambio de GlaFIX/A122N/G124S/A175S /S222A/Q286R	Intercambio de GlaFIX/A[122]N/G[124]S/A 39S/S82A/Q143R	336
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298 Q	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M 156Q	337
A122N/G124S/A175S/Q286R/M29 8Q	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M 156Q	338
T128N/P129A/A175S/S222A/H257 A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/H1 17A/Q143R/M156Q	339
A122N/G124S/A175S/S222A/H257 A/Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/H1 17A/Q143R/M156Q	340
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298 Q/H373F	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M 156Q/H224F	341
A122N/G124S/A175S/Q286R/M29 8Q/H373F	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M 156Q/H224F	342
T128N/P129A/M298Q	T[128]N/P[129]A/M 156Q	354
{Intercambio de Gla FIX /K43I}/T128N/P129A/Q286R/M298 Q	{Intercambio de Gla FIX /K[43I]}/ T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	355
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q36 6N	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/ Q217N	356
{Intercambio de Gla FIX /K43I}/Q286R/M298Q/Q366N	{Intercambio de Gla FIX /K[43I]}/Q143R/M156QQ217N	357

Variante (numeración de FVII maduro)	Variante (numeración de quimotripsina)	Polipéptido de FVII SEQ ID NO
{Intercambio de Gla FIX /K43I}/ T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q36 6N	{Intercambio de Gla FIX /K[43I]}/ T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q Q217N	358
T128N/P129A/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/M 156Q/H224F	359
V158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	360
M298Q/Q366N/H373F	M156Q/Q217N/H224F	361
T239V/M298Q/H373F	T99V/M156Q/H224F	362
T239I/M298Q/H373F	T99I/M156Q/H224F	363
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/ Q217N/H224F	364
T239V/Q286R/M298Q/Q366N	T99V/Q143R/M156Q/Q217N	365
T239I/Q286R/M298Q/Q366N	T99I/Q143R/M156Q/Q217N	366
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298 Q	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M 156Q	367
T128N/P129A/S222A/T239V/H257 A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/T99V/H1 17A/Q143R/M156Q	368
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298 Q/H373F	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M 156Q/H224F	369
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298 Q	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M1 56Q	370
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298 Q/H373F	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M1 56Q/H224F	371

### C. Expresión de polipéptidos de FVII

5 Para el análisis de expresión inicial por ELISA y Transferencia de Western, se expresaron polipéptidos de FVII en células BHK-21. Para ensayos bioquímicos, tales como los descritos posteriormente, los polipéptidos de FVII se expresaron en células 293-F Freestyle™ (Invitrogen).

10 El polipéptido de Factor VII de tipo silvestre (SEQ ID NO: 3) y polipéptidos de FVII variantes se expresaron inicialmente en la línea celular de riñón de cría de hámster BHK-21 (ATCC CRL 1632). Se cultivaron células BHK-21 en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, Invitrogen) con suero de ternero fetal al 10 % (FCS) en placas de cultivo de 100 mm a 37° °C y CO<sub>2</sub> 5 %. Después del cultivo hasta aproximadamente 90 % de confluencia, las células se transfectoron con 24 µg de ADN plasmídico de FVII usando el kit de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) como se enseña por el fabricante. El medio se reemplazó 6 horas después de la transfección con EMEM sin suero que contenía vitamina K1 1 µg/ml (Sigma) y las células se incubaron durante 72 horas adicionales. Se ensayó la expresión de FVII en el medio de cultivo celular por ELISA o Transferencia de Western.

15 Para análisis posteriores usando ensayos bioquímicos, se expresaron el polipéptido del Factor VII de tipo silvestre (SEQ ID NO: 3) y polipéptidos de FVII variantes en células 293-F Freestyle™ (Invitrogen). Las células se cultivaron en medio 293 Freestyle™ (Invitrogen) a 37 °C y CO<sub>2</sub> 8 % en matraces de Erlenmeyer con tapones ventilados. Las células se transfectoron usando el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, después del crecimiento a 1x10<sup>6</sup> células/ml, las células se centrifugaron y el medio se intercambié. Las células se transfectoron después con 240 µg de ADN plasmídico de FVII para cada 240 ml de células usando 293fectin (Invitrogen). Además, se añadieron 50 µl de una reserva de Vitamina K<sub>1</sub> de 1 mg/ml (Sigma) en etanol para cada 240 ml de células. Las células se cultivaron durante 5 días y después se recogió sobrenadante de cultivo. La expresión de FVII en el medio de cultivo celular se ensayó por ELISA.

20 En algunos ejemplos, se expresaron polipéptidos de FVII de tipo silvestre y variantes en células CHO-Express (CHOX) (Excellgene). Se mantuvieron células CHO Express (CHOX) en medio Completo DM202 (SAFC BioSciences) y se usaron para inocular cultivos de siembra de producción. Se dejaron crecer cultivos de siembra hasta 5 x 10<sup>6</sup> células viables/ml y se usaron aproximadamente 60 ml para inocular aproximadamente 0,6 l de medio Completo DM202 (la densidad de inoculación es 0,4 x 10<sup>6</sup> vc/ml) para generar un cultivo de producción. Este cultivo de producción se dejó crecer durante 4 días hasta alcanzar 8-12 x 10<sup>6</sup> vc/ml el día de la transfección. Se formó un complejo de transfección usando ADN plasmídico de Factor VII (6 mg) y 23,1 mg de Polietilenimina (PEI). El complejo de transfección se diluyó después en 0,5 l de medio de transfección Opti-MEM sin suero (Invitrogen), que se añadió al cultivo de producción de 0,6 l. Después de 5 horas de transfección el cultivo se diluyó adicionalmente con ~1 l de medio ProCHO5 (Lonza) complementado con L-glutamina 8 mM y Vitamina K1 4 mg/l. Se permitió que el cultivo de matraz de agitación de 2,2 l se expresara durante 5 - 7 días antes de recoger el Factor VII en bruto. Después se recogieron sobrenadantes de cultivo por filtración y se purificó FVII.

30 Se realizó expresión de una de las variantes de FVII (Q286R/M298Q) en una línea celular estable. Esta línea se generó en Excellgene (Monthey, Valais, Suiza) por transfección de células CHOX. Brevemente, se cultivaron células en presencia de metotrexato, después se sembraron por dilución limitante a una célula por pocillo en placas de 96 pocillos. Los clones que producían los mayores niveles de FVII variante se determinaron por ELISA. Un clon (clon 52) se clonó adicionalmente por una segunda dilución limitante y se sembró en placas de 96 pocillos. Las colonias se cultivaron a 37 °C en medio DM204A (SAFC BioSciences), complementado con L-glutamina 8 mM, cisteína 1 mM, vitamina K1 1 mg/l. Se descubrió que 24 clones tenían mayores niveles de expresión de Q286R/M298Q, por

análisis de ELISA, que el clon original 52. Estos 24 clones se expandieron adicionalmente en placas de 6 pocillos durante 6 días de cultivo, seguido de cultivo en matraces de agitación de 40 ml durante 4 días. Cada etapa de cultivo se realizó a 37 °C en medio DMA204A, complementado como antes. Después de los cuatro días de cultivo, los clones se congelaron a  $1 \times 10^7$  células viables/ml. Los niveles de Q286R/M298Q producidos por cada clon se determinaron por ELISA. El clon 5F7 fue el mayor productor, generando típicamente 25 - 35 mg/l de Q286R/M298Q.

## 1. ELISA

Se usó un inmunoensayo para cuantificar la cantidad de FVII humano y FVIIa en una muestra. Se usaron anticuerpos policlonales para FVII humano para capturar y detectar la proteasa en la solución. El inmunoensayo puede usarse para determinar la concentración de proteínas de medio acondicionado o una reserva purificada o para determinar la concentración de FVII en otra muestra, por ejemplo, una muestra de plasma humano o de ratón. La concentración de línea basal de FVII en sangre humana es de aproximadamente 50 nM y la forma enzimáticamente activa FVIIa, es aproximadamente 1 nM.

Para determinar la cantidad de proteína FVII o FVIIa humana en muestras se realizó un ELISA de tipo sándwich. Se recubrieron placas Maxisorp immuno de fondo plano de noventa y seis pocillos (Nunc) con 100  $\mu$ l/pocillo de avidina 5 ng/ $\mu$ l (NeutrAvidin, Pierce Biotech.). Las placas se cubrieron y se incubaron con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) seguido de lavado cuatro veces en PBS con Tween-20 (PBST) 0,01 %. Las placas se bloquearon durante un mínimo de 1 hora a TA con agitación por incubación con albúmina de suero bovino (BSA) 1 % (p/v) en PBS añadida a cada pocillo a 200  $\mu$ l/pocillo. Las placas bloqueadas se almacenaron después a 4 °C hasta su uso (hasta 2 semanas).

Antes de su uso, las placas se lavaron cuatro veces en PBST para retirar la BSA, y se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de una solución de 1 ng/ $\mu$ l de anticuerpo anti Factor VII biotinilado (R&D Systems) a cada pocillo y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos con agitación para permitir la formación del complejo con la avidina que la recubre. Se retiró el anticuerpo no unido en exceso lavando la placa con PBST (cuatro veces).

Se añadieron diluciones dobles en serie de un patrón de FVII (American Diagnostica; diluido en PBST), que variaba de 50 ng/ $\mu$ l a 0,8 ng/ $\mu$ l, a la placa a 100  $\mu$ l/pocillo. Se incluyó un pocillo que contenía PBST sin ningún FVII como un control solamente de tampón. Para ensayar muestras purificadas (antes y después de la activación, véase Ejemplo 3) de FVII o FVIIa, la muestra se diluyó en primer lugar 1:25 en PBST, y después se realizaron diluciones dobles en serie de modo que se ensayaron diluciones 25 veces, 50 veces, 100 veces y 200 veces. Las muestras diluidas se añadieron a los pocillos por duplicado a 100  $\mu$ l/pocillo. Para ensayar las muestras de plasma que contenían FVII o FVIIa, la muestra de plasma se diluyó 1:100 y 1:400 en PBST y se añadió a los pocillos por duplicado a 100  $\mu$ l/pocillo. También se incluyó una muestra de plasma sin FVII o FVIIa para determinar los niveles de fondo. Las placas se incubaron después durante 30 minutos a TA con agitación para permitir que cualquier FVII o FVIIa en la muestra formara complejo con el anticuerpo anti FVII.

Después de incubación con la muestra, las placas se lavaron 4 veces con PBST. Un anticuerpo secundario, Equino anti FVII humano o Murino monoclonal anti FVII humano (American Diagnostica), se diluyó 1:5000 en PBST y se añadió a cada pocillo a un volumen de 100  $\mu$ l. Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación para permitir que el anticuerpo añadido se uniera con el FVII o los complejos de FVII en la placa. Para retirar el anticuerpo secundario en exceso, las placas se lavaron con PBST (4 veces). Para detectar el anticuerpo secundario unido, se añadieron 100  $\mu$ l de conjugado de HRP de cabra anti equino a una dilución 1:5000 en PBST, o 100  $\mu$ l de conjugado de HRP de cabra anti ratón a una dilución 1:20.000 en PBST a cada pocillo. Después de incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación, las placas se lavaron cuatro veces con PBST y se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de una solución que contenía una mezcla 1:1 de sustrato de TMB y solución de peróxido de hidrógeno (Pierce Biotech). Las placas se agitaron durante aproximadamente 1 minuto a temperatura ambiente antes de la adición de 100  $\mu$ l/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M para detener la reacción. La densidad óptica a 450 nm se midió usando un lector de Placas M5 de Molecular Device y se restó el valor de fondo para la placa (medido con PBST solamente) del valor medido de cada pocillo. Se generó una curva patrón representando la concentración de los patrones de FVII frente a la absorbancia. Se generó típicamente un intervalo de curva patrón de aproximadamente 0,2 - 50 ng/ml en las condiciones de ELISA anteriores. Después se determinó la concentración de cada muestra usando la curva patrón y multiplicando por el factor de dilución, y se indicó un promedio y desviación típica.

## 2. Transferencia de Western

También se ensayó la expresión de FVII en medio de cultivo celular por transferencia de Western. Las alícuotas que contenían la muestra no diluida o diluciones dobles en serie en PBS del medio de cultivo celular de células transfectadas con FVII (células BHK-21 o CHO) se marcaron Conc. 1 (no diluido), Conc. 2 (dilución doble) y Conc. 3 (dilución cuádruple). Las muestras se cargaron en un gel de SDS page junto a 10, 25 y 50 nanogramos de rFVII purificado de plasma de control (American Diagnostica). La proteína de FVII producida por células BHK-21 o CHO se detectó por transferencia de Western usando un anticuerpo equino policlonal primario anti FVII (American

Diagnostica; usado a la concentración sugerida por el fabricante) y un anticuerpo secundario anti IgG equino conjugado con HRP (una dilución 1:2000 de solución 1 mg/ml de Zymed Laboratories). En algunos ejemplos, el FVII se detectó por transferencia de Western usando un anticuerpo de conejo primario anti Factor VIIa humano (Hematologic Technologies) y un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con HRP (Invitrogen). Se realizó comparación de los niveles de expresión con el rFVII purificado de plasma de control. Los resultados muestran que estaban presentes concentraciones que variaban de aproximadamente 20 ng a más de 50 ng de FVII en las alícuotas de cultivo celular.

## Ejemplo 2

### Purificación y activación de polipéptidos de FVII

Se purificaron polipéptidos de FVII usando una columna de Flujo Rápido de Q Sepharose, o CaptoQ (GE Healthcare), en la que se adsorberán polipéptidos de FVII con dominios Gla funcionales, seguido de una etapa de elución de calcio. Típicamente, el sobrenadante de cultivo del transfectado se diluyó 2 veces con una solución que contenía Tris 20 mM pH 8,0 y Tween 20 0,01 %, y después se añadió EDTA 500 mM pH 8,0 a la muestra diluida hasta una concentración final de 1,5 mM. Las muestras se filtraron antes de cargarse en la columna de Flujo Rápido de Q Sepharose o CaptoQ, que se había preequilibrado primero con Tampón B (Tris 20 mM pH 8,0, NaCl 1 M, Tween 20 0,01 %), después Tampón A (Tris 20 mM pH 8,0, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,01 %). Después de cargar, la columna se lavó con Tampón A hasta que la absorbancia del flujo continuo a 280 nm alcanzó una línea basal. El tampón A se reemplazó con Tampón C (Tris 20 mM pH 8,0, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,01 %, CaCl<sub>2</sub> 5 mM) y se realizó un lavado de bomba para reemplazar completamente el tampón en las líneas. Tras completar el lavado de bomba, se aplicó Tampón C a la columna a 8 ml/min para eluir los polipéptidos de FVII, que se recogieron en fracciones. Después de la elución, la columna se lavó con Tampón B recogiendo al mismo tiempo fracciones, hasta que el pigmento rosa (del medio de cultivo) se retiró de la columna por lavado. La columna se lavó después con Tampón A para reequilibrarla para su reutilización.

Las fracciones eluidas se purificaron adicionalmente usando una columna Mono Q o QHiTrap (GE Healthcare), que se preequilibró inicialmente con Tampón B, y después con Tampón A. Las fracciones recogidas con Tampón C anteriores, que contenían FVII, se agruparon y se diluyeron 2 veces con Tampón A, antes de añadirse EDTA, pH 8,0, a una concentración final de 40 mM. Se tomaron opcionalmente alícuotas pequeñas (por ejemplo 100 µl) en este punto para su análisis, tal como por ELISA. La muestra combinada se cargó en la columna Mono Q (o QHiTrap), después se lavó con Tampón A. Para eluir los polipéptidos de FVII unidos, se procesó un gradiente del 0 % al 30 % de Tampón B a través de la columna y se recogieron las fracciones. La columna se lavó después con Tampón B seguido de Tampón A para reequilibrar para su reutilización.

En algunos ejemplos, después de la primera columna de Capto Q, se intercambiaron los tampones de fracciones agrupadas por diafiltración a Tampón D (MES 20 mM, pH 6,0, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 0,1 M, Tween 20 0,01 %) después se cargó en una columna de SP-HP que se había preequilibrado con Tampón D. Después de lavar con Tampón D, se aplicó un gradiente de NaCl 0,1 M a NaCl 1,0 M a la columna y se recogieron las fracciones. Después se ajustaron las fracciones que contenían FVII a pH 8,0 y se diluyeron 2 veces en Tampón E (Tris 20 mM, pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tween 20 0,01 %) y se aplicaron a una columna de Q H-HP que se había preequilibrado con Tampón E. Esta columna se lavó después con Tampón E y el FVII se eluyó por un gradiente de NaCl 0 – 1 M en Tampón E.

Se activaron polipéptidos de FVII purificados a FVIIa usando el Factor Xa biotinilado del Kit de Escisión y Retirada de la Proteasa de Restricción de Factor Xa (Roche). Típicamente, se agruparon 7 fracciones de la purificación de Mono Q en un tubo cónico de 15 ml y se añadieron 388 µl de CaCl<sub>2</sub> 500 mM, 38,9 µl de BSA 10 % en agua destilada y 3,2 µg de Factor Xa biotinilado. Después de incubación durante 14-16 horas a 37 °C, se añadieron 250 µl de Avidina Inmovilizada (Pierce) y la muestra se mezcló a 4 °C durante 30 minutos. La solución resultante se filtró después a través de una columna Econo-pak (Bio-Rad) y el filtrado se mezcló con otros 250 µl de Avidina Inmovilizada durante 30 minutos adicionales. La solución se filtró de nuevo y el filtrado se concentró a aproximadamente 300-500 µl usando un filtro de centrifuga Amicon Ultra-4 de 10 kDa (Millipore). La concentración de FVIIa se analizó después por ELISA (como se describe en el Ejemplo 1.C.1) y se controló el nivel de activación del Factor VII por transferencia de Western. Se realizó transferencia de Western esencialmente como se describe en el Ejemplo 1.C.2, pero usando en su lugar anticuerpo de conejo anti Factor VIIa humano (Haematologic Technologies, Inc.) a 1:2000 durante 1 hora como el anticuerpo primario, seguido de HRP de Cabra Anti IgG de Conejo (H+L) (Invitrogen) a 1:5000 durante 30 minutos.

## Ejemplo 3

### Determinación de la concentración de proteasa catalíticamente viable en una solución

La concentración de FVIIa catalíticamente viable en una solución de reserva se determinó valorando un complejo de Factor VIIa y Factor Tisular soluble (FTs) con un inhibidor peptídico irreversible de FVIIa, Phe-Phe-Arg-Clorometilcetona (FFR-CMK). El inhibidor se une con FVIIa pero no con FVII. La incubación extendida a una alta

concentración de FVIIa (50 nM) asegura la valoración completa de la proteasa. La actividad residual del complejo de FVIIa/FT después de incubación con FFR-CMK se midió para determinar la concentración de FVIIa catalíticamente viable en la solución de reserva original.

5 Se pretrató una placa de ensayo de media área transparente de 96 pocillos (Nunc) añadiendo 150 µl/pocillo de tampón de placa 1 x (Tris 100 mM pH 8,4, NaCl 100 mM, BSA 0,01 %, Tween-20 0,01 %) a cada pocillo e incubando la placa a 37 °C durante un mínimo de 1 hora. El tampón se retiró completamente transfiriendo a una toalla de papel y centrifugando la placa boca abajo para retirar cualquier tampón restante, y la placa se secó al aire durante 1 hora y se almacenó cubierta a temperatura ambiente (TA).

10 Para preparar la mezcla de reacción de FVIIa/FTs/FFR-CMK, se diluyó en primer lugar una reserva de FVIIa (American Diagnostica; diluido a 5 µM en glicerol 50 % (v/v) y se almacenó frío en alícuotas a -20 °C) o una variante de FVIIa hasta 500 nM en tampón de ensayo directo 1 x (Tris 100 mM pH 8,4, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, BSA 0,01 %). La mezcla de FVIIa/FTs se realizó después mezclando 90 µl de agua destilada con 36 µl de tampón de ensayo directo 5 x, 18 µl de FVIIa 500 nM, y 18 µl de FTs 5 µM (Factor de Coagulación III humano recombinante/factor tisular soluble; R&D Systems; la solución de reserva usada fue de 19,6 mM en glicerol 50 % y se diluyó a 5 µM en tampón de ensayo directo 1 x y se almacenó durante hasta dos semanas a 4 °C). Después se permitió que los componentes formaran complejo durante 5 minutos a temperatura ambiente.

20 Se diluyó una solución de reserva de FFR-CMK 10 mM (BaChem) en DMSO (almacenado a -20 °C) en agua hasta 3,5 µM. Usando una fila de una placa de almacenamiento opaca de polipropileno (Costar), se realizaron diluciones dobles en serie en agua del FFR-CMK a través de 11 pocillos de una placa opaca de 96 pocillos, conteniendo el último pocillo de la fila solamente agua como control. Esta es la solución de serie de inhibidor de FFR-CMK 10x. En cada pocillo de una fila de la placa de ensayo de media área transparente de 96 pocillos pretratada, se añadieron 10,8 µl de la mezcla de FVIIa/FTs, seguido de 1,2 µl de la serie de inhibidores de FFR-CMK 10x. Las soluciones se mezclaron bien y la placa se centrifugó a < 3000 rpm durante 5 minutos para retirar gotas en los pocillos. La placa se cubrió y se incubó durante 8 horas a 37 °C.

30 Para ensayar la actividad residual del complejo de FVIIa/FT, se preparó en primer lugar una mezcla del sustrato Spectrozyme FVIIa (American Diagnostica, n.º 217L; reserva reconstituida de un vial de 50 µmoles en 5 ml de agua destilada hasta 10 mM y se almacenó a 4 °C) y tampón directo 5x (Tris 500 mM pH 8,4, NaCl 500 mM, CaCl<sub>2</sub> 25 mM y BSA 0,05 %) mezclando 360 µl de tampón de ensayo directo 5 x con 180 µl de una solución 10 mM de Spectrozyme FVIIa y 1080 µl de agua. A cada pocillo de la placa de ensayo, se añadieron 108 µl de la solución de sustrato preparada. Los pocillos se mezclaron y la placa se incubó a 37 °C. El aumento de absorbancia a 405 nm se midió cada 30 segundos durante 1 hora a 37 °C en un lector de placas Spectramax Gemini M5 de Molecular Devices.

40 Usando software SoftMax Pro (Molecular Devices), se midieron las tasas de absorbancia y se determinó la actividad fraccional de proteasas incubadas con un inhibidor dividiendo la tasa medida por la tasa de la proteasa no inhibida. La actividad fraccional se representó gráficamente frente a la concentración de FFR-CMK, y se descartaron los puntos que eran > 90 % o < 10 % de la actividad no inhibida. Después se dibujó una línea a través de los puntos restantes para determinar la ordenada en el origen, que representa la concentración de proteasa activa en la solución. Los valores de múltiples ensayos se midieron y promediaron y se determinó la desviación típica.

#### 45 **Ejemplo 4**

##### **Determinación de la actividad catalítica de FVIIa para su sustrato, Factor X**

50 La actividad catalítica de las variantes de FVIIa para su sustrato, Factor x (FX), se evaluó indirectamente en un ensayo fluorogénico ensayando con respecto a la actividad de FXa, generado tras la activación por FVIIa, en el sustrato sintético Spectrafluor FXa.

##### **A. Actividad catalítica dependiente de FT de FVIIa de tipo silvestre para su sustrato, Factor X**

55 Se evaluó la actividad catalítica dependiente de FT de FVIIa de tipo silvestre en un ensayo fluorogénico en el que se incluía una forma lipídada de factor tisular (FT) purificado para proporcionar actividad óptima de FVIIa. Se determinó la actividad enzimática de FXa para Spectrafluor FXa (CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>-D-CHA-Gly-Arg-AMC.AcOH) midiendo el aumento de absorbancia del fluoróforo libre generado, AMC (7-amino-4-metilcoumarina), en función del tiempo.

60 Brevemente, el polipéptido de FVIIa de tipo silvestre se diluyó inicialmente hasta 0,5 µM en tampón de ensayo 1x (Tris 100 mM pH 8,4, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, y BSA 0,01 %), después se diluyó adicionalmente a 0,1 nM en tampón de ensayo. Se reconstituyó FT de longitud completa lipídado (Innovin; Dade Behring) en 20 ml de agua para realizar una solución 3 nM y se diluyó hasta 0,2 nM en tampón de ensayo 1x. Se mezclaron cuatrocientos µl de FVIIa 0,1 nM con 400 µl de FT 0,2 nM y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La solución se diluyó adicionalmente por dos diluciones dobles en tampón de ensayo 1x que contenía FT 0,2 nM para obtener un total de

tres diluciones de FVIIa de FVIIa 0,05 nM, 0,025 nM o 0,0125 nM conteniendo cada una FT 0,2 nM (soluciones de FVIIa/FT).

5 El sustrato, Factor X (FX; American Diagnostica; 80 µg) se reconstituyó en 135,6 µl de agua destilada para proporcionar una reserva 10 µM y se almacenó en alícuotas a -80 °C. Las alícuotas no se congelaron y se descongelaron más de una vez. La reserva de FX se diluyó a 800 nM en tampón de ensayo directo, después se diluyó en serie 2 veces para obtener soluciones de FX que variaban de 800 nM a 50 nM.

10 Se reconstituyó Spectrofluor Xa (American Diagnostica; 10 µmoles) en tampón destilado a 5 mM y se almacenó a 4 °C. A una placa de ensayo de área media negra de 96 pocillos (Costar), se añadieron 5 µl de Spectrofluor Xa (American Diagnostica) a cada pocillo. Después se añadieron 25 µl de la solución de FX a cada pocillo. A la última fila de pocillos de la placa, también se incluyó en el ensayo un control negativo en el que no se añadió FX. Por duplicado, se añadieron las tres concentraciones de las soluciones de FT/FVIIa a 20 µl a pocillos de columnas respectivas de la placa de modo que cada dilución de FT/FVIIa se ensayó frente a cada dilución de FX, sin contener un conjunto de columnas FT/FVIIa añadido (es decir FX solo). Las placas se mezclaron agitando. La fluorescencia se midió a lo largo del tiempo con un espectrofluorímetro preparado para leer cada 30 segundos durante 1 hora a 37 °C (Ex: 380 nm, EM: 450 nm, Punto de corte: 435 nm), y el tiempo se presentó en unidades de tiempo cuadráticas. Después del ensayo, se generó una curva patrón de fluorescencia de AMC en el mismo lector de placas para convertir de unidades de fluorescencia a µM de sustrato liberado en el ensayo. Se diluyó 1 AMC 1 mm en DMSO (Invitrogen) a 0,02 mM en tampón de ensayo 1x. Se realizaron seis diluciones en serie dobles del AMC que variaban de 20 nM a 0,625 nM en tampón de ensayo 1x. Se midió la fluorescencia del AMC usando las mismas condiciones de ensayo que se han descrito anteriormente y se representó una gráfica de fluorescencia frente a concentración de AMC. Se calculó la pendiente de la línea, que actuó como el factor de conversión para UFR a µM en cálculos posteriores.

25 Se calcularon las constantes cinéticas para activación por FVIIa de FX realizando análisis de regresión lineal en la inversa de la concentración de sustrato frente a la inversa de la velocidad de escisión de sustrato (en unidades de segundos<sup>2</sup>), con  $V_{máx, FVIIa}$  calculada como la inversa de la ordenada en el origen,  $K_m, FVIIa$  como la pendiente en la ordenada en el origen, y  $V_{máx} / K_m, FVIIa$  como la inversa de la pendiente. El valor de  $k_{cat}$  se derivó después usando la ecuación:

$$K_{cat}/K_m, FVIIa = V_{máx}/K_m, FVIIa \times 1/(0,5 \times k_2 \times [FVIIa \text{ en } \mu\text{M}] \times (\text{UFR}/\text{factor de conversión } \mu\text{M}))$$

35 donde  $k_2 = ([S] \times k_{cat, FXa}) / (K_m, FXa + [S])$ , donde  $k_{cat, FXa}$  y  $K_m, FXa$  son las constantes para escisión de FXa de SpectrofluorXa determinado experimentalmente usando patrones de FXa como  $k_{cat, FXa} = 117 \text{ s}^{-1}$ , y  $K_m, FXa = 164 \text{ } \mu\text{M}$ .

Usando las condiciones de ensayo anteriores, se determinó que la constante cinética  $k_2$  era de  $88,1 \text{ s}^{-1}$ .

40 La  $K_m$  y  $k_{cat}$  para cada una de las variantes de FVIIa se determinó para evaluar la actividad catalítica,  $k_{cat}/K_m$  ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) de cada uno para su sustrato, FX (Tabla 14). Se evaluó la proteasa FVIIa de tipo silvestre y se descubrió que mostraba una actividad de  $1,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . La activación por el factor VIIa del Factor X, como se mide en Krishnaswamy, *et al.* (J. Biol. Chem. (1998) 273: 8 4378-86) es de  $2,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

## 45 B. Análisis de la actividad catalítica de variantes de FVIIa para el sustrato, Factor X

La actividad catalítica de las variantes de FVIIa para el sustrato, Factor X (FX), se evaluó indirectamente en dos tipos de ensayos cromogénicos ensayando con respecto a la actividad de FXa, generado tras la activación por FVIIa, en el sustrato sintético Spectrafluor FXa. Los dos ensayos se realizaron bien en presencia o bien en ausencia de factor tisular lipídado, para evaluar la actividad tanto dependiente de FT como independiente de FT. Las variantes de FVII se expresaron, purificaron y activaron a FVIIa como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 1 y 2. Aunque la mayoría de las variantes de FVII se expresaron solamente en células 293-F Freestyle™, algunas también se expresaron en células BHK-21.

### 55 *Ensayo indirecto dependiente de factor tisular lipídado*

Se evaluó la actividad catalítica de las variantes de FVII en presencia del factor tisular usando el ensayo descrito en la sección A del Ejemplo 4, anterior, con modificaciones menores. Una de dichas modificaciones fue el uso de una proteasa de sustrato de Factor X que se había tratado con ERG-CMK y FFR-CMK para reducir la actividad de fondo (Molecular Innovations). Se realizaron dos tipos de análisis de datos usando dos ensayos separados; un ensayo de análisis de intervalo lineal y un ensayo de análisis de intervalo hiperbólico. El ensayo de análisis de intervalo lineal usó un intervalo de concentraciones de Factor X entre 0 y 150 nM para asegurar una medición precisa de las constantes cinéticas en el intervalo lineal de la curva de dosis. Por el contrario, el ensayo de análisis de intervalo hiperbólico usó un intervalo de concentraciones de Factor X entre 0 y  $1,44 \text{ } \mu\text{M}$  para asegurar la medición precisa de las constantes cinéticas con una curva de dosis de saturación (hiperbólica).

65

El ensayo indirecto de factor tisular lipídado con análisis de datos de intervalo lineal se realizó esencialmente como se describe en la sección A del Ejemplo 4, anterior, con las siguientes modificaciones. Las soluciones de variante de FVIIa/FT se prepararon como soluciones de FVIIa 0,1 nM/FT 0,4 nM y se incubaron durante 30 minutos antes de diluirse dos veces en FT 0,4 nM hasta una solución que contenía FVIIa 1,5625 pM/FT 0,4 nM. Se mezclaron veinticinco  $\mu\text{l}$  de la solución de FVIIa/FT con 25  $\mu\text{l}$  de una solución de sustrato que contenía Spectrofluor FXa 1,0 mM (American Diagnostica) y uno de 300 nM, 200 nM, 133,3 nM, 88,9 nM, 59,3, 39,5 nM, 36,3 nM o 0 nM de Factor X (Molecular Innovations). Por lo tanto, las concentraciones finales para el ensayo fueron de FVIIa 0,8 pM, FT 0,2 nM, Spectrofluor FXa 0,5 mM y Factor X 150 nM, 100 nM, 66,7 nM, 44,4 nM, 29,6 nM, 19,8 nM, 13,2 nM o 0 nM (Molecular Innovations) en 50  $\mu\text{l}$ /pocillo. La curva patrón de AMC, que actuó como el factor de conversión para UFR a  $\mu\text{M}$  en cálculos posteriores, se expandió para incluir un intervalo de dosis que abarcaba AMC de 0  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ .

El ensayo indirecto de factor tisular lipídado con análisis de datos de intervalo hiperbólico se realizó esencialmente como se ha descrito en la sección A del Ejemplo 4, anterior, con las siguientes modificaciones. Las soluciones de variante de FVIIa/FT se prepararon como soluciones de FVIIa 0,1 nM/FT 0,4 nM y se incubaron durante 30 minutos antes de diluirse dos veces en FT 0,4 mM hasta 1,5625 pM (o 0,78 pM para proteasas que se esperaba que tuvieran alta actividad) de FVIIa/FT 0,4 nM. Se mezclaron veinticinco  $\mu\text{l}$  de la solución de FVIIa/FT con 25  $\mu\text{l}$  de una solución de sustrato que contenía Spectrofluor FXa 1,0 mM (American Diagnostica) y uno de 1440 nM, 720 nM, 360 nM, 180 nM, 90 nM, 45 nM, 22,5 nM o 0 nM de Factor X (Molecular Innovations). Por lo tanto, las concentraciones finales para el ensayo fueron de FVIIa 0,8 (o 0,39) pM, FT 0,2 nM, Spectrofluor FXa 0,5 mM y Factor X 7 nM, 720 nM, 360 nM, 180 nM, 90 nM, 45 nM, 22,5 nM, 11,25 nM o 0 nM (Molecular Innovations) en 50  $\mu\text{l}$ /pocillo. Los parámetros de  $k_{\text{cat}}$  y  $K_{\text{m}}$  se calculan usando la ecuación hiperbólica de Michaelis Menten de la forma ( $V_{\text{máx}}/(1+(K_{\text{m}}/x))$ ). La curva patrón de AMC, que actuó como el factor de conversión para UFR a  $\mu\text{M}$  en cálculos posteriores, se expandió para incluir un intervalo de dosificación que abarcaba AMC de 0  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ .

Para determinar las constantes de tasa cinética para la activación por FVIIa o variante de FVIIa de FX, los datos sin procesar recogidos con la aplicación SoftMax Pro (Molecular Devices) se exportaron como archivos.XML. Se realizaron análisis lineales y no lineales de datos adicionales con XLfit4, un paquete software para ajuste de curvas automático y análisis estadístico dentro del ambiente de hojas de cálculo de Microsoft Excel (Software IDBS).

Para datos recogidos usando el ensayo de intervalo lineal, las constantes cinéticas  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) se calculan directamente a partir de la pendiente de análisis de regresión lineal de la concentración de FX frente a la velocidad de la escisión de sustrato fluorogénico (en  $\mu\text{M}/\text{s}^2$ ) donde  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = \text{pendiente}/[\text{FVIIa}] \times 0,5 \times k_2$ . Se determinó que el factor de corrección  $k_2$  era 45 usando el método descrito en la sección A del Ejemplo 4 y constantes cinéticas para escisión de FXa de Spectrofluor FXa de  $k_{\text{cat},\text{FXa}} = 56 \text{ s}^{-1}$  y  $K_{\text{m},\text{FXa}} = 126 \text{ nM}$ , determinado experimentalmente con FX activado (FXa) que se valoró por sitio activo previamente con AT-III/heparina. Los puntos de datos de exclusión que dieron como resultado valores de  $R^2$  menores de 0,98 aseguraron la linealidad de los conjuntos de datos usados en la rutina de ajuste.

Los análisis de datos recogidos usando el ensayo de intervalo hiperbólico se calcularon a partir de análisis de regresión no lineal de la concentración de FX frente a la velocidad de la escisión de sustrato fluorogénico (en  $\mu\text{M}/\text{s}^2$ ). Los parámetros de  $k_{\text{cat}}$  y  $K_{\text{m}}$  individuales se calculan como parámetros de ajuste usando la ecuación hiperbólica de Michaelis Menten de la forma ( $V_{\text{máx}}/(1+(K_{\text{m}}/x))$ ) donde  $k_{\text{cat}} = V_{\text{máx}}/[\text{FVIIa}] \times 0,5 \times k_2$ . La constante cinética,  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  se calculó a partir de los parámetros ajustados individuales  $k_{\text{cat}}$  y  $K_{\text{m}}$ .

#### 45 **Ensayo indirecto independiente de factor tisular**

La actividad catalítica de las variantes de FVIIa en presencia de factor tisular se evaluó en un ensayo directo similar al descrito anteriormente excepto que no se incluyó factor tisular en el ensayo. Por lo tanto, el ensayo para evaluar la actividad independiente de FT se realizó esencialmente como se ha descrito anteriormente, con las siguientes modificaciones. Las soluciones de variante de FVIIa se diluyeron a 50 nM (o 5 nM para variantes que se esperaba que tuvieran alta actividad independiente de FT). Se mezclaron veinticinco  $\mu\text{l}$  de cada solución de FVIIa con 25  $\mu\text{l}$  de una solución de sustrato que contenía Spectrofluor FXa 1,0 mM (American Diagnostica) y uno de 1050 nM, 700 nM, 466,7 nM, 311,1 nM, 207,4 nM, 138,3 nM, 92,2 nM o 0 nM de Factor X (Molecular Innovations). Por lo tanto, las concentraciones finales para el ensayo fueron de FVIIa 25 nM (o 2,5 nM para variantes de alta actividad), Spectrofluor FXa 0,5 mM y Factor X 525 nM, 350 nM, 233,3 nM, 155,6 nM, 103,7 nM, 69,1 nM, 46,1 nM o 0 nM (Molecular Innovations) en 50  $\mu\text{l}$ /pocillo. Se realizaron análisis de datos como se ha descrito para el ensayo de intervalo lineal, anteriormente sin modificaciones.

La Tabla 14 proporciona la actividad catalítica de variantes de FVIIa como se mide en Ensayo Indirecto dependiente de FT usando polipéptidos de FVIIa expresados a partir de células 293-F y células BHK-21, y la actividad catalítica como se mide en un ensayo indirecto independiente de FT usando polipéptidos de FVIIa expresados a partir de células 293-F y/o células BHK-21. Los resultados se presentan como la constante cinética para la actividad catalítica,  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), y también se expresan como un porcentaje de la actividad del FVIIa de tipo silvestre, donde la actividad es actividad catalítica,  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) de cada variante de FVIIa para su sustrato, FX. El uso del análisis de datos de intervalo lineal o hiperbólico también se indica para los valores presentados en las tablas. No

5 todas las variantes de FVIIa se ensayaron en cada ensayo. Varias variantes de FVIIa mostraron actividad catalítica aumentada en comparación con la molécula de FVIIa de tipo silvestre. Por ejemplo, el polipéptido de FVIIa que contenía solamente la mutación Q286R (Q286R-FVIIa), tiene una actividad catalítica de entre 2 y 3 veces la de FVIIa de tipo silvestre, y el polipéptido de FVIIa que contiene las mutaciones Q286R y M298Q (Q286R/M298Q-FVIIa), tienen actividad catalítica de más de 3 veces la de FVIIa de tipo silvestre.



Tabla 14. Actividad catalítica de variantes de FVIIa  
 Ensayo indirecto dependiente de FT con polipéptidos de FVIIa de células 293-F

Ensayo indirecto dependiente de FT con polipéptidos de FVIIa de células 293-F	Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Formato de Ensayo	$k_{cat}/K_M$ (M-V)	$k_{cat}/K_M$ (% WT)
Q286N		Q143N	hiperbólico	$4,88 \times 10^7$	100
Q286E		Q143E	hiperbólico	$1,14 \times 10^7$	23
Q286D		Q143D	hiperbólico	$6,04 \times 10^8$	12
Q286S		Q143S	hiperbólico	$4,64 \times 10^7$	95
Q286T		Q143T	hiperbólico	$2,44 \times 10^7$	50
Q286R		Q143R	lineal	$1,11 \times 10^7$	323
Q286K		Q143K	hiperbólico	$5,44 \times 10^7$	112
Q286A		Q143A	hiperbólico	$8,55 \times 10^7$	175
Q286V		Q143V	hiperbólico	$1,65 \times 10^7$	34
H216S		H76S	lineal	$4,74 \times 10^7$	138
H216A		H76A	lineal	$5,98 \times 10^7$	175
H216K		H76K	hiperbólico	$6,51 \times 10^7$	133
H216R		H76R	hiperbólico	$9,44 \times 10^7$	193
S222A		S82A	lineal	$5,73 \times 10^7$	167
S222K		S82K	lineal	$8,02 \times 10^7$	234
H257A		H117A	lineal	$3,90 \times 10^7$	114
H257S		H117S	lineal	$5,90 \times 10^7$	172
K161S		K24S	hiperbólico	$5,99 \times 10^7$	123
K161A		K24A	lineal	$4,22 \times 10^7$	123
K161V		K24V	hiperbólico	$5,45 \times 10^7$	112
H373D		H224D	lineal	$1,79 \times 10^7$	52

Ensayo Indirecto Dependiente de FT con polipéptidos de FVIIa de células 293-F					
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Formato de Ensayo	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> V)	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	
H373E	H224E	lineal	$2,79 \times 10^7$	81	
H373S	H224S	lineal	$2,75 \times 10^7$	80	
H373F	H224F	lineal	$5,11 \times 10^7$	149	
H373A	H224A	lineal	$3,11 \times 10^7$	91	
S52A	S[52]A	lineal	$4,66 \times 10^7$	136	
S60A	S[60]A	lineal	$5,15 \times 10^7$	150	
Q366D	Q217D	lineal	$1,88 \times 10^7$	55	
Q366E	Q217E	lineal	$4,77 \times 10^7$	139	
Q366N	Q217N	lineal	$5,64 \times 10^7$	165	
Q366T	Q217T	lineal	$3,42 \times 10^7$	100	
Q366S	Q217S	lineal	$2,70 \times 10^7$	79	
Q366V	Q217V	lineal	$6,59 \times 10^7$	192	
E394N/P395A/R396S	E245N/P246A/R247S	lineal	$5,32 \times 10^7$	155	
R202S	R62S	lineal	$2,57 \times 10^7$	75	
A292N/A294S	A150N/A152S	lineal	0	0	
G318N	G170fN	lineal	$5,50 \times 10^7$	161	
A175S	A39S	lineal	$3,32 \times 10^7$	97	
K109N	K[109]N	lineal	$3,97 \times 10^7$	174	
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	lineal	$5,27 \times 10^7$	154	
T130N/E132S	T[130]N/E[132]S	lineal	$6,35 \times 10^7$	185	
A122N/G124S/E394N/P395A/R396S	A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/R247S	lineal	$4,88 \times 10^7$	142	

Ensayo Indirecto Dependiente de FT con polipéptidos de FVIIa de células 293-F					
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Formato de Ensayo	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> V)	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	
V158T/L287T/M298K	V21T/L144T/M156K	lineal	$4,50 \times 10^6$	13	
V158D/L287T/M298K	V21D/L144T/M156K	lineal	$4,48 \times 10^6$	13	
S103S111delinsSFGRGDIRNV	S[103]S[111]delinsSFGRGDIRNV	lineal	$4,83 \times 10^7$	141	
P406insCSFGRGDIRNVC	P257insCSFGRGDIRNVC	lineal	$6,16 \times 10^7$	180	
P406insGGGSCSFGRGDIRNV C	P257insGGGSCSFGRGDIRNVC	lineal	$7,47 \times 10^7$	218	
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	lineal	$5,96 \times 10^7$	174	
S222A/Intercambio de Gla FIX	S82A/Intercambio de Gla FIX	lineal	$6,55 \times 10^7$	189	
H257A/Intercambio de GlaFIX	H117A/Intercambio de Gla FIX	lineal	$6,45 \times 10^7$	186	
S222A/H257A/Intercambio de Gla FIX	S82A/H117A/Intercambio de Gla FIX	lineal	$5,77 \times 10^7$	168	
Q286R/Intercambio de Gla FIX	Q143R/Intercambio de Gla FIX	lineal	$1,11 \times 10^8$	323	
Q286R/H257A	Q143R/H117A	lineal	$1,27 \times 10^8$	371	
Q286R/S222A	Q143R/S82A	lineal	$1,42 \times 10^8$	415	
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	lineal	$9,51 \times 10^7$	278	
Q286R/S222A/ Intercambio de Gla FIX	Q143R/S82A/Intercambio de Gla FIX	lineal	$1,61 \times 10^8$	470	
Q286R/H257A/Intercambio de Gla FIX	Q143R/H117A/Intercambio de Gla FIX	lineal	$8,09 \times 10^7$	234	
Q286R/S222A/H257A/Intercambio de Gla FIX	Q143R/S82A/H117A/Intercambio de Gla FIX	lineal	$7,75 \times 10^7$	226	
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q	lineal	$3,93 \times 10^7$	115	
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE	lineal	$7,74 \times 10^7$	226	
T239S	T99S	lineal	$1,74 \times 10^7$	51	
T239Q	T99Q	lineal	$1,74 \times 10^7$	51	
T239V	T99V	lineal	$9,57 \times 10^7$	279	

Ensayo Indirecto Dependiente de FT con polipéptidos de FVIIa de células 293-F					
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Formato de Ensayo	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> V)	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	
T239L	T99L	lineal	$3,77 \times 10^7$	110	
T239H	T99H	lineal	$9,90 \times 10^6$	29	
T239I	T99I	lineal	$3,50 \times 10^7$	102	
S222A/H257A/M298Q	S82A/H117A/M156Q	lineal	$7,75 \times 10^7$	224	
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	lineal	$2,00 \times 10^8$	583	
S222A/H257A	S82A/H117A	lineal	$5,02 \times 10^7$	147	
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	lineal	$8,08 \times 10^7$	236	
A175S/S222A/Q366V	A39S/S82A/Q217V	lineal	$3,78 \times 10^7$	109	
K109N/A175S	K[109]N/A39S	lineal	$3,67 \times 10^7$	107	
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V	lineal	$1,27 \times 10^8$	369	
Q286M	Q143M	lineal	$5,25 \times 10^7$	153	
Q286L	Q143L	lineal	$2,02 \times 10^7$	59	
Q286Y	Q143Y	lineal	$1,61 \times 10^7$	47	
Q366I	Q217I	lineal	$9,37 \times 10^7$	274	
Q366L	Q217L	lineal	$6,87 \times 10^7$	201	
Q366M	Q217M	lineal	$6,61 \times 10^7$	193	
S222V	S82V	lineal	$6,04 \times 10^7$	176	
S222D	S82D	lineal	$5,34 \times 10^7$	156	
S222N	S82N	lineal	$6,82 \times 10^7$	199	
S222E	S82E	lineal	$5,48 \times 10^7$	160	
H216A/H257A	H76A/H117A	lineal	$6,62 \times 10^7$	193	

Ensayo Indirecto Dependiente de FT con polipéptidos de FVII con polipéptidos de FVIIa de células 293-F					
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Formato de Ensayo	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> V)	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	
H216A/S222A	H76A/S82A	lineal	$5,46 \times 10^7$	159	
H257S/Q286R	H117S/Q143R	lineal	$3,93 \times 10^7$	115	
H257S/Q366V	H117S/Q217V	lineal	$6,71 \times 10^7$	194	
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	lineal	$1,58 \times 10^8$	457	
S222A/H257A/Q286R/Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	lineal	$1,86 \times 10^8$	538	
Q366V/H373V	Q217V/H224V	lineal	$1,84 \times 10^7$	53	
Q366V/H373L	Q217V/H224L	lineal	$3,07 \times 10^7$	89	
Q286R/H373A	Q143R/H224A	lineal	$5,89 \times 10^7$	172	
S222A/H373A	S82A/H224A	lineal	$3,64 \times 10^7$	106	
Q286R/M298Q/K341D	Q143R/M156Q/K192D	lineal	$1,18 \times 10^7$	34	
Q286R/K341D	Q143R/K192D	lineal	$1,11 \times 10^7$	32	
Q286R/Q366D	Q143R/Q217D	lineal	$1,53 \times 10^7$	45	
Q286R/Q366N	Q143R/Q217N	lineal	$5,42 \times 10^7$	158	
Q286R/M298Q/Q366D	Q143R/M156Q/Q217D	lineal	$1,91 \times 10^7$	56	
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	lineal	$1,04 \times 10^8$	305	
Q286R/H373F	Q143R/H224F	lineal	$9,08 \times 10^7$	265	
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	lineal	$1,51 \times 10^8$	440	
M298Q/H373F	M156Q/H224F	lineal	$8,49 \times 10^7$		
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	lineal	$2,92 \times 10^7$	85	
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	lineal	$2,98 \times 10^7$	87	
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	lineal	$2,79 \times 10^7$	81	

Ensayo Indirecto Dependiente de FT con polipéptidos de FVIIa de células 293-F					
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Formato de Ensayo	$k_{cat}/K_M$ (M-V)	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	
M298Q	M156Q	lineal	$1,4 \times 10^6$	409	
<b>Ensayo Indirecto Dependiente de FT con polipéptidos de FVIIa de células BHK-21</b>					
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Formato de Ensayo	$k_{cat}/K_M$ (M-V)	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	
WT	WT	lineal	$5,42 \times 10^7$	100	
Q286R	Q143R	lineal	$1,01 \times 10^8$	187	
H216A	H76A	lineal	$5,98 \times 10^7$	110	
S222A	S82A	lineal	$6,42 \times 10^7$	118	
H257A	H117A	lineal	$4,96 \times 10^7$	91	
H257S	H117S	lineal	$7,65 \times 10^7$	141	
H373F	H224F	lineal	$4,82 \times 10^7$	89	
S52A	S[52]A	lineal	$3,50 \times 10^7$	65	
S60A	S[60]A	lineal	$3,22 \times 10^7$	59	
Q366D	Q217D	lineal	$9,80 \times 10^6$	18	
Q366N	Q217N	lineal	$3,44 \times 10^7$	63	
Q366V	Q217V	lineal	$1,86 \times 10^8$	342	
G318N	G170N	lineal	$5,46 \times 10^7$	101	
A175S	A39S	lineal	$2,12 \times 10^7$	39	
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	lineal	$8,05 \times 10^7$	148	
A51N	A[51]N	lineal	$1,02 \times 10^8$	188	
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A	lineal	$1,05 \times 10^8$	193	
P406insGGGSCSFGRGDIRNV C	P257insGGGSCSFGRGDIRN VC	lineal	$9,54 \times 10^7$	176	

Ensayo Indirecto Dependiente de FT con polipéptidos de FVIIa de células 293-F					
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Formato de Ensayo	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> V)	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	
S119N/L121S	S119N/L[121]S	lineal	$5,75 \times 10^7$	106	
T128N/P129A	T128N/P[129]A	lineal	$8,76 \times 10^7$	161	
Q286R/S222A	Q143R/S82A	lineal	$1,24 \times 10^8$	229	
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	lineal	$1,06 \times 10^8$	196	
Q286R/S222A/ Intercambio de Gla FIX	Q143R/S82A/Intercambio de Gla FIX	lineal	$8,52 \times 10^7$	157	
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	lineal	$1,85 \times 10^8$	341	
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q	lineal	$3,11 \times 10^7$	57	
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE	lineal	$9,18 \times 10^7$	169	
P321K	P170iK	lineal	$3,43 \times 10^7$	63	
P321E	P170iE	lineal	$5,59 \times 10^7$	103	
P321Y	P170iY	lineal	$4,48 \times 10^7$	83	
P321S	P170iS	lineal	$5,53 \times 10^7$	102	
T239N	T99N	lineal	$1,64 \times 10^7$	30	
T239Q	T99Q	lineal	$1,70 \times 10^7$	31	
T239V	T99V	lineal	$9,81 \times 10^7$	181	
T239L	T99L	lineal	$5,24 \times 10^7$	97	
T239H	T99H	lineal	$1,25 \times 10^7$	23	
T239I	T99I	lineal	$4,67 \times 10^7$	86	
S222A/M298Q	S82A/M156Q	lineal	$7,13 \times 10^7$	131	
H257A/M298Q	H117A/M156Q	lineal	$1,28 \times 10^8$	236	
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	lineal	$1,94 \times 10^8$	358	

Ensayo Indirecto Dependiente de FT con polipéptidos de FVIIa de células 293-F					
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Formato de Ensayo	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> V)	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	
Q286R/M298Q/Intercambio de Glu FIX	Q143R/M156Q/Intercambio de Glu FIX	lineal	$2,64 \times 10^8$	487	
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V	lineal	$7,92 \times 10^7$	146	
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	lineal	$7,63 \times 10^7$	141	
K109N/A175S	K109N/A39S	lineal	$2,45 \times 10^7$	45	
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V	lineal	$1,44 \times 10^8$	265	
Q286R/M298Q/K341D	Q143R/M156Q/K192D	lineal	$1,35 \times 10^7$	25	
Q286R/H373F	Q143R/H224F	lineal	$1,18 \times 10^8$	218	
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	lineal	$2,01 \times 10^8$	371	
M298Q/H373F	M156Q/H224F	lineal	$8,69 \times 10^7$	160	
A122N/G124S/A175S	A122N/G124S/A39S	lineal	$1,93 \times 10^7$	36	
M298Q	M156Q	lineal	$9,34 \times 10^7$	172	
Ensayo Indirecto Independiente de FT					
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	de	Célula 293-F	Células BHK-21	
			$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	$k_{cat}/K_M$ (% WT)
WT	WT		$2,26 \times 10^1$	100	$1,58 \times 10^1$
Q286N	Q143N		$3,03 \times 10^1$	134	
Q286E	Q143E		4,80	21	
Q286D	Q143D		$3,50 \times 10^{11}$	2	
Q286S	Q143S		$2,66 \times 10^1$	118	
Q286T	Q143T		$1,51 \times 10^1$	67	
Q286R	Q143R		$4,87 \times 10^1$	215	$4,08 \times 10^1$
Q286K	Q143K		$3,95 \times 10^1$	175	
Q286A	Q143A		$2,11 \times 10^1$	93	
Q286V	Q143V		2,35	10	



S222A	S82A	7,36 x 10 <sup>1</sup>	326	3,10 x 10 <sup>1</sup>	197
H257A	H117A	2,02 x 10 <sup>1</sup>	89	1,18 x 10 <sup>1</sup>	75
H257S	H117S	1,75 x 10 <sup>1</sup>	77	1,33 x 10 <sup>1</sup>	84
Q366D	Q217D	6,30	28	2,30	15
Q366E	Q217E	2,38 x 10 <sup>1</sup>	105	1,36 x 10 <sup>1</sup>	86
Q366N	Q217N	2,26 x 10 <sup>1</sup>	100		
Q366T	Q217T	2,48 x 10 <sup>1</sup>	110		
Q366S	Q217S	1,02 x 10 <sup>1</sup>	45		
Q366V	Q217V	2,90 x 10 <sup>1</sup>	128	8,36 x 10 <sup>1</sup>	530
A51N	A[51]N			2,07 x 10 <sup>1</sup>	91
V158T/L287T/M298K	V21T/L144T/M156K	4,65	21		
V158D/L287T/M298K	V21D/L144T/M156K	2,50	11		
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A			1,68 x 10 <sup>1</sup>	106
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A			1,43 x 10 <sup>1</sup>	91
Q286R/Intercambio de Gla FIX	Q143R/Intercambio de Gla FIX	4,37 x 10 <sup>1</sup>	193		
Q286R/H257A	Q143R/H117A	1,07 x 10 <sup>1</sup>	47		
Q286R/S222A	Q143R/S82A	1,00 x 10 <sup>2</sup>	444	3,18 x 10 <sup>1</sup>	202
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A			9,60 x 10 <sup>1</sup>	61
Q286R/S222A/ Intercambio de Gla FIX	Q143R/S82A/Intercambio de Gla FIX	1,82 x 10 <sup>2</sup>	804	3,63 x 10 <sup>1</sup>	230
Q286R/S222A/H257A/Intercambio de Gla FIX	Q143R/S82A/H117A/Intercambio de Gla FIX	2,79 x 10 <sup>1</sup>	123		
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q			3,02 x 10 <sup>2</sup>	1916
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q	1,50 x 10 <sup>2</sup>	665	3,65 x 10 <sup>1</sup>	2319
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE	8,69 x 10 <sup>1</sup>	385	2,29 x 10 <sup>2</sup>	1451
P321K	P170iK			1,13 x 10 <sup>1</sup>	71
S222A/M298Q	S82A/M156Q			7,85 x 10 <sup>2</sup>	4981
H257A/M298Q	H117A/M156Q			4,12 x 10 <sup>1</sup>	262
S222A/H257A/Q286R/M 298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	6,09 x 10 <sup>2</sup>	2695	1,90 x 10 <sup>2</sup>	1208
Q286R/M298Q/Intercambio de Gla FIX	Q143R/M156Q/Intercambio de Gla FIX			7,52 x 10 <sup>2</sup>	4775
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V			2,38 x 10 <sup>1</sup>	151
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	3,87 x 10 <sup>1</sup>	171	1,23 x 10 <sup>1</sup>	78
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V			3,21 x 10 <sup>1</sup>	204

Q286M	Q143M	$1,07 \times 10^1$	47		
Q286L	Q143L	3,20	14		
Q286Y	Q143Y	$9,50 \times 10^{-1}$	4		
Q366I	Q217I	$6,29 \times 10^1$	278		
Q366L	Q217L	$2,54 \times 10^1$	112		
Q366M	Q217M	$4,05 \times 10^1$	179		
Q286R/K341D	Q143R/K192D	1,80	8		
Q286R/Q366D	Q143R/Q217D	1,00	4		
Q286R/Q366N	Q143R/Q217N	2,75	12		
Q286R/M298Q/Q366D	Q143R/M156Q/Q217D	6,80	30		
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M136Q/Q217N	$2,12 \times 10^2$	94		
Q286R/H373F	Q143R/H224F			$2,20 \times 10^1$	139
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	$2,16 \times 10^2$	957	$3,17 \times 10^2$	2009
M298Q/H373F	M156Q/H224F			$2,36 \times 10^2$	1499
M298Q	M156Q	$4,59 \times 10^2$	2029	$3,1 \times 10^2$	1969

En un conjunto adicional de experimentos, la actividad catalítica de polipéptidos de FVIIa producidos en células BHK-21 se analizó usando los ensayos indirectos independientes de FT y dependientes de FT descritos anteriormente con modificaciones menores. Se produjeron varias variantes en células CHO además de células BHK-21 o exclusivamente en células CHO. Las variantes se ensayaron en condiciones idénticas independientemente de la línea celular usada. Para el ensayo catalítico dependiente de FT (usando análisis lineal), los polipéptidos de FVIIa se valoraron en primer lugar en sitio activo con 4-metilumbeliferil p'-guanidinobenzoato (MUGB) para determinar la concentración de FVIIa, como se describe en el Ejemplo 12, posterior. Para maximizar el número de puntos de datos en el intervalo lineal, la concentración máxima de FX en el ensayo se ajustó a 25 nM (es decir 0-25 nM en lugar de 0-150 nM). El FX usado en el ensayo se activó (es decir FXa) y se valoró con fluoresceína-mono-p'-guanidinobenzoato (FMGB), como se describe en el Ejemplo 15, posterior. Las constantes cinéticas para escisión de sustrato de Spectrafluor FXa se determinaron en este FXa valorado en sitio activo y se demostró que eran:  $K_m$  de 190,2  $\mu\text{M}$  y una  $k_{\text{cat}}$  de 340  $\text{s}^{-1}$ . La diferencia primaria está en  $k_{\text{cat}}$  y se debe principalmente a las determinaciones de sitio activo mejoradas. Estos parámetros proporcionan un valor de factor de corrección  $k_2$  revisado de 246,4 que se usa en el análisis lineal para determinar la actividad catalítica de los polipéptidos de FVIIa en presencia de FT.

Para el ensayo catalítico independiente de FT, los polipéptidos de FVIIa se valoraron en primer lugar en sitio activo con 4-metilumbeliferil p'-guanidinobenzoato (MUGB) para determinar la concentración de FVIIa, como se describe en el Ejemplo 12, posterior. El FX usado en el ensayo se activó (es decir FXa) y se valoró con fluoresceína-mono-p'-guanidinobenzoato (FMGB), como se describe en el Ejemplo 15. Las constantes cinéticas para escisión de sustrato de Spectrafluor FXa se determinaron en este FXa valorado en sitio activo y se demostró que eran:  $K_m$  de 190,2  $\mu\text{M}$  y una  $k_{\text{cat}}$  de 340  $\text{s}^{-1}$ . Estos parámetros proporcionan un valor del factor de corrección  $k_2$  revisado de 246,4 que se usa en el análisis para determinar la actividad catalítica de los polipéptidos de FVIIa en ausencia de FT.

La Tabla 15 expone la actividad catalítica de cada uno de los polipéptidos variantes de FVIIa ensayados. Los resultados se presentan como la constante cinética para actividad catalítica,  $k_{\text{cat}}/K_m$  ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), y también se expresan como un porcentaje de la actividad del FVIIa de tipo silvestre, donde la actividad es actividad catalítica,  $k_{\text{cat}}/K_m$  ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) de cada variante de FVIIa para su sustrato, FX. La desviación típica (DT), el coeficiente de variación (como porcentaje; %CV) y el número de ensayos realizados (n) también se proporcionan. Algunas de las variantes presentadas aumentaron notablemente la actividad catalítica en comparación con el polipéptido de FVII de tipo silvestre. Por ejemplo, la variante de intercambio de Gla FIX/Q286R/M298Q mostró una actividad catalítica dependiente de FT más de 6 veces la del polipéptido de FVII de tipo silvestre. La actividad catalítica aumentada de las variantes de FVIIa fue más pronunciada en el ensayo independiente de FT. Por ejemplo, las variantes de intercambio de Gla FIX/Q366V tuvieron más de 9 veces más actividad catalítica que FVIIa de tipo silvestre, las variantes Intercambio de Gla FIX/ Q286R/M298Q, {Intercambio de Gla FIX/E40L}/Q286R/M298Q, {Intercambio de Gla FIX/K43I}/ Q286R/M298Q, y {Intercambio de Gla FIX/Q44S}/Q286R/M298Q tuvieron más de 70-80 veces más actividad catalítica que FVIIa de tipo silvestre, y la variante S52A/S60A/V158D/E296V/M1298Q tuvo más de 220 veces más actividad catalítica que FVIIa de tipo silvestre.

Tabla 15. Actividad catalítica de variantes de FVIIa

Ensayo dependiente de FT	Mutación (numeración de FVII madiuro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	DT	%CV	$k_{cat}/K_M$ (%) WT	n
WT (NovoSeven®)		WT (NovoSeven®)	3,98E+07	1,02E+07	26 %	106 %	30
WT (NovoSeven-RT®)		WT (NovoSeven-RT®)	3,48E+07	8,33E+06	24 %	93 %	10
WT		WT	3,75E+07	5,44E+06	15 %	100 %	13
WT †		WT †	3,76E+07	7,09E+06	19 %	100 %	10
T128N/P129A		T[128]N/P[129]A	4,65E+07	1,09E+07	23 %	124 %	5
Intercambio de Glu FIX		Intercambio de Glu FIX	5,38E+07	9,08E+05	2 %	144 %	2
K109N		K[109]N	5,54E+07	8,57E+06	15 %	148 %	2
A122N/G124S		A[122]N/G[124]S	3,87E+07	4,96E+06	13 %	103 %	2
S52A/S60A		S[52]A/S[60]A	3,56E+07	4,63E+06	13 %	95 %	2
M298Q		M156Q	6,76E+07	7,38E+06	11 %	180 %	6
M298Q †		M156Q †	7,46E+07	9,42E+06	13 %	198 %	4
T128N/P129A/M298Q †		T[128]N/P[129]A/M156Q †	6,29E+07	1,28E+07	20 %	167 %	4
V158D/E296V/M298Q		V21D/E154V/M156Q	1,81E+08	4,43E+07	25 %	482 %	8
V158D/E296V/M298Q †		V21D/E154V/M156Q †	1,65E+08	4,08E+07	25 %	441 %	10
T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q		T[128]N/P[129]A/V21D/E154V/M156Q	2,01E+08	1,54E+07	8 %	537 %	4
S52A/S60AA/158D/E296V/ M1298Q		S[52]A/S[60]A/V21D/E154/ M156Q	2,00E+08	4,31E+05	0 %	532 %	2
Q286R		Q143R	8,06E+07	1,43E+07	18 %	215 %	5
T128N/P129A/Q286R		T[128]N/P[129]A/Q143R	8,45E+07	1,90E+07	22 %	226 %	6
T128N/P129A/Q286R †		T[128]N/P[129]A/Q143R †	6,20E+07			165 %	1
S52A/S60A/Q286R		S[52]A/S[60]A/Q143R	4,10E+07	6,71E+06	16 %	109 %	4

Ensayo dependiente de FT						
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$K_{cat}/K_M$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	DT	%CV	$K_{cat}/K_M$ (% WT)	n
S222A	S82A	4,07E+07	1,17E+07	29 %	109 %	4
T128N/P129A/S222A	T[128]N/P[129]A/S82A	6,25E+07	6,78E+06	11 %	167 %	4
S52A/S60A/S222A	S[52]A/S[60]A/S82A	3,91E+07	8,75E+06	22 %	104 %	3
H257S	H117S	1,18E+08	2,02E+07	17 %	316 %	2
H373F	H224F	5,58E+07	2,05E+07	37 %	149 %	2
Q366V	Q217V	5,48E+07	2,69E+06	5 %	146 %	2
Intercambio de GlaFIX/Q366V	Intercambio de GlaFIX/Q217V	9,11E+07	2,50E+07	27 %	243 %	3
A175S	A39S	2,11E+07	6,10E+06	29 %	56 %	3
K109N/A175S	K[109]N/A39S	1,74E+07	4,29E+06	25 %	46 %	5
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	1,73E+07	1,28E+06	7 %	46 %	2
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	8,59E+06	1,82E+06	21 %	23 %	2
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	1,05E+07	1,12E+06	11 %	28 %	2
Q286R/H257A	Q143R/H117A	9,91E+07	1,74E+07	18 %	264 %	2
Q286R/H257A †	Q143R/H117A †	3,08E+07	1,52E+07	49 %	82 %	4
Q286R/S222A	Q143R/S82A	1,11E+08	3,21E+07	29 %	296 %	4
Intercambio de Gla FIX/ T128N/P129A/ S222A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/ T[128]N/P[129]A/ S82A/Q143R	1,47E+08	2,53+07	17 %	393 %	3
Intercambio de Gla FIX/ T128N/P129A/ S222A/Q286R †	Intercambio de Gla FIX/ T[128]N/P[129]A/ S82A/Q143R †	1,43E+08	1,63E+07	11 %	379 %	2
Intercambio de Gla FIX/ S52A/S60A/S222A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/ S[52]A/S[60]A/S82A/Q143R	7,24E+07	2,36E+06	3 %	193 %	2
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	6,98E+07	1,64E+07	23 %	186 %	3
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	1,66E+08	3,86E+07	23 %	442 %	14

Ensayo dependiente de FT						
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	DT	%CV	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	n
Q286R/M298Q †	Q143R/M156Q †	1,34E+08	2,37E+07	18 %	356 %	15
Q286R/M298Q §	Q143R/M156Q §	1,54E+08	3,86E+07	25 %	408 %	6
Intercambio de Glu FIX/ Q286R/M298Q	Intercambio de Glu FIX/ Q143R/M156Q	2,55E+08	6,16E+07	24 %	680 %	6
Intercambio de Glu FIX/ Q286R/M298Q †	Intercambio de Glu FIX/ Q143R/M156Q †	2,30E+08	5,10E+07	22 %	613 %	4
T128N/P129A/Q286R/ M298Q	T128N/P129A/Q143R/ M156Q	1,86E+08	2,64E+07	14 %	497 %	6
T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	T128N/P129A/Q143R/ M156Q †	1,50E+08	4,16E+07	28 %	398 %	4
Intercambio de Glu FIX/T128N/P129A/Q286R/ M298Q	Intercambio de Glu FIX /T128N/P129A/Q143R/ M156Q	2,11E+08	4,41 E+07	21 %	562 %	3
Intercambio de Glu FIX /T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	Intercambio de Glu FIX /T128N/P129A/Q143R/ M156Q †	1,99E+08	6,79E+07	34 %	529 %	5
{Intercambio de Glu FIX/E40L/ Q286R/M298Q	{Intercambio de Glu FIX/E[40]L/ Q143R/M156Q	2,08E+08	4,39E+07	21 %	556 %	4
{Intercambio de Glu FIX/K43I/ Q286R/M298Q	{Intercambio de Glu FIX/K[43]I/ Q143R/M156Q	2,73E+08	5,21E+07	19 %	727 %	5
{Intercambio de Glu FIX/K43I/ Q286R/M298Q †	{Intercambio de Glu FIX/K[43]I/ Q143R/M156Q †	2,91E+08	4,30E+07	15 %	774 %	5
{Intercambio de Glu FIX/Q44S/ Q286R/M298Q	{Intercambio de Glu FIX/Q[44]S/ Q143R/M156Q	1,98E+08	2,75E+07	14 %	529 %	3
{Intercambio de Glu FIX/M19K/ Q286R/M298Q	{Intercambio de Glu FIX/M[19]K/ Q143R/M156Q	1,41E+08	5,22E+06	4 %	375 %	2
S52A/S60A/ Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156 Q	1,25E+08	1,14E+07	9 %	333 %	4
Intercambio de Glu FIX /S52A/S60A/ Q286R/M298Q †	Intercambio de Glu FIX/S[52]A/S[60]A/Q143R/M15 S 6Q †	1,80E+08	1,81E+07	10 %	480 %	3
{Intercambio de Glu FIX/M19K/E40L/K43I/Q44 S/ Q286R/M298Q	{Intercambio de Glu FIX/M[19]K/E[40]L/K[43]I/ Q[44]I/ Q286R/M298Q	1,21E+08	7,07F+06	6 %A	322 %	0
{Intercambio de Glu FIX/K43I/T128N/P129A/ Q286R/M298Q †	{Intercambio de Glu FIX/K[43]I/T128N/P129A/Q143R/M156Q †	2,71E+08	6,41 E+07	24 %	720 %	5
T239V	T99V	4,64E+07	8,38E+0,6	18 %	124 %	2
T239I	T99I	2,62E+07	6,51E+0,6	25 %	70 %	2
H257A/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	1,67E+07	4,27E+06	26 %	45 %	5

Ensayo dependiente de FT						
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	DT	%CV	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	n
S222A/H257A/Q286R/ M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	1,65E+08	1,76E+07	11 %	440 %	4
T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/H117A/Q143R/M156Q	1,55E+08	5,77E+07	37 %	414 %	9
T128N/P129A/S222A/ H257A/Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/S82A/H117A/Q143R/M156Q †	1,73E+08	1,41 E+07	8 %	461 %	2
S52A/S60A/S222A/H257A/ Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H 117A /Q143R/M156Q	2,49E+08	8,78E+06	4 %	665 %	3
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	7,10E+07	3,16E+07	44 %	189 %	11
S222A/H257A/Q286R/ Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	1,00E+08	1,03E+07	10 %	268 %	4
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	1,17E+08	3,05 E+07	26 %	312 %	7
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N †	T[129]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N †	1,42E+08	4,17E+07	29 %	377 %	3
{Intercambio de Gla FIX/K43I}/Q286R/M298Q/Q366N †	{Intercambio de Gla FIX/K43I}/Q143R/M156Q/Q217N †	1,69E+08	3,89E+07	23 %	450 %	5
{Intercambio de Gla FIX/K43I}/T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N †	{Intercambio de Gla FIX/K43I}/T128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N †	2,52E+08	1,36E+07	5 %	669 %	2
Q286R/H373F	Q143R/H224F	9,01E+07	7,73E+06	9 %	240 %	2
T128N/P129A/ Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H224F	6,91E+07	2,15E+07	31 %	184 %	12
S52A/S60A/ Q286R/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/H224 F	9,44E+07	1,43E+07	15 %	252 %	3
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	1,36E+08	1,92E+07	14 %	364 %	5
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/H224F	1,33E+08	4,77E+07	36 %	354 %	17
S52A/S60A/Q286R/M298Q/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q/H224F	1,77E+08	3,63E+07	21 %	472 %	3
M298Q/H373F	M156Q/H224F	7,21E+07	1,76E+07	24 %	192 %	4
T128N/P129A/M298Q/H373F †	T[128]N/P[129]A/M156Q/H224F †	6,07E+07	1,29E+07	21 %	161 %	2
V158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156 Q	1,49E+08	3,59E+07	24 %	397 %	11
S222A/T239V	S82A/T99V	7,49E+07	2,57E+06	3 %	200 %	3

Ensayo dependiente de FT						
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$K_{cat}/K_M$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	DT	%CV	$K_{cat}/K_M$ (% WT)	n
Intercambio de Glia FIX/S222A/T239V/Q286R	Intercambio de Glia FIX/S82A/T99V/Q143R	2,03E+08	3,16E+07	16 %	541 %	3
Intercambio de Glia FIX/S222A/T239V/Q286R †	Intercambio de Glia FIX/S82A/T99V/Q143R †	9,94E+07	1,83E+07	18 %	264 %	3
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	1,72E+08	4,92E+07	29 %	459 %	5
Intercambio de Glia FIX/T239V/Q286R/M298Q	Intercambio de Glia FIX/T99V/Q143R/M156Q	2,53E+08	4,78E+07	19 %	675 %	3
Intercambio de Glia FIX/T239V/Q286R/M298Q †	Intercambio de Glia FIX/T99V/Q143R/M156Q †	1,79E+08	3,81 E+07	21 %	477 %	4
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q †	T128N/P129A/T99V/Q143R/M156Q †	1,04E+08	2,43E+07	23 %	276 %	4
S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q	2,14E+08	4,48E+07	21 %	571 %	5
T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q †	T128N/P129A/S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q †	1,21E+08	5,58E+06	5 %	323 %	3
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	1,06E+08	1,34E+07	13 %	283 %	2
T239V/Q286R/M298Q/H373F	T99V/Q143R/M156Q/H224F	1,70E+08	1,13E+07	7 %	454 %	2
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q/H373F †	T128N/P129A/T99V/Q143R/M156Q/H224F †	2,36E+08	2,77E+07	12 %	627 %	3
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	1,45E+08	1,18E+07	8 %	387 %	4
T239V/Q286R	T99V/Q143R	5,79E+07	1,39E+07	24 %	155 %	3
S222A/T239I	S82A/T99I	3,05E+07	9,26E+06	30 %	81 %	4
Intercambio de GliaFIX/S222A/T239I/Q286R	Intercambio de Glia FIX/S82A/T99I/Q143R	6,77E+07	4,44E+06	7 %	181 %	2
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	1,13E+08	3,68E+06	3 %	301 %	2
Intercambio de Glia FIX / T239V/Q286R/M298Q	Intercambio de Glia FIX/T99V/Q143R/M156Q	1,25E+08	2,13E+07	17 %	334 %	2
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q †	T128N/P129A/T99V/Q143R/M156Q †	8,17E+07	8,17E+06	10 %	217 %	3
S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q	1,14E+08	2,22E+07	19 %	304 %	3
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	6,18E+07	9,27E+06	15 %	165 %	3
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	2,22E+08	1,39E+07	6 %	591 %	2



Ensayo dependiente de FT							
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	DT	%CV	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	n	
V158D/T239V/E296V/M298Q †	V21D/T99V/E154V/M156Q †	1,65E+08	2,12E+06	1 %	438 %	2	
T239V/Q286R	T99V/Q143R	8,84E+07	7,16E+05	1 %	236 %	2	
T239I/Q286R/M298Q/ H237F	T99I/Q143R/M156Q/H224F	1,08E+08	2,32E+07	21 %	289 %	7	
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q/ H237F †	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143 R/M156Q/H224F †	1,30E+08	2,51E+07	19 %	345 %	5	
H257S/Q286R/M298Q	H117S/Q143R/M156Q	1,40E+08	8,97E+06	6 %	372 %	4	
Intercambio de Glu FIX/Q286R/S222A/H257S	Intercambio de Glu FIX /Q143R/S82A/H117S	8,53E+07	1,66E+07	20 %	227 %	3	
S222A/H257S/Q286R/ M298Q	S82A/H117S/Q143R/M156Q	1,58E+08	1,76E+07	11 %	420 %	2	
H257S/Q286R/M298Q/ H373F	H117S/Q143R/M156Q/H224 F	1,52E+08	3,35E+07	22 %	407 %	7	
S222A/Q286R/M298Q/ H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	1,48E+08	2,23E+06	2 %	395 %	2	
Intercambio de Glu FIX/S222A/ Q286R/M298Q/H373F	Intercambio de Glu FIX S82A/Q143R/M156Q/H224F	2,84E+08	4,85E+07	17 %	758 %	3	
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	1,29E+08	1,86E+07	14 %	343 %	3	
Intercambio de Glu FIX/ S222A/Q286R/M298Q	Intercambio de Glu FIX S82A/Q143R/M156Q	2,10E+08	4,28E+07	20 %	559 %	5	
T128N/P129A/A175S/Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/Q217V	3,38E+07	3,06E+06	9 %	90 %	2	
A122N/G124S/A175S/ Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/Q217V	3,02E+07	7,05E+06	23 %	80 %	5	
T128N/P129A/A175S/ S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A	1,72E+07	3,18E+06	18 %	46 %	3	
A122N/G124S/A175S/ S222A	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A	2,08E+07	5,05E+06	24 %	56 %	5	
T128N/P129A/A175S/ Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R	3,33E+07	1,46E+06	4 %	89 %	3	
A122N/G124S/A175S/ Q286R	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R	4,11E+07	5,27E+06	13 %	110 %	5	
Intercambio de Glu FIX/ S222A/Q286R/H373F	Intercambio de Glu FIX/ S82A/Q143R/H224F	1,22E+08	3,17E+07	26 %	327 %	8	
V158D/E296V/M298Q/ H373F	V21D/E154V/M156Q/H224F	1,51E+08	8,39E+06	6 %	402 %	3	
H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	1,13E+08	1,55E+07	14 %	301 %	3	

Ensayo dependiente de FT						
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	DT	%CV	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	n
Intercambio de Glu A175S/S222A/Q286R	Intercambio de Glu A/Q143R	3,88E+07	2,74E+06	7 %	104 %	3
Intercambio de Glu A122N/G124S/A175S/S222A/Q286R	Intercambio de Glu A/Q143R	4,13E+07	8,99E+06	22 %	110 %	6
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q	T128N/P129A/A39S/Q143R/M156Q	7,21E+07	1,14E+07	16 %	192 %	3
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q	A122N/G124S/A39S/Q143R/M156Q	7,43E+07	1,10E+07	15 %	198 %	3
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T128N/P129A/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	6,89E+07	3,36E+06	5 %	184 %	3
A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	A122N/G124S/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	8,40E+07	5,72E+06	7 %	224 %	3
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q/H373F	T128N/P129A/A39S/Q143R/M156Q/H224F	5,72E+07	3,36E+06	6 %	153 %	3
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F	A122N/G124S/A39S/Q143R/M156Q/H224F	8,39E+07	9,99E+06	12 %	224 %	3
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F	V21D/Q143R/E154V/M156Q/H224F	2,39E+08	3,82E+07	16 %	638 %	5
M298Q/Q366N/H373F †	M156Q/Q217N/H224F †	7,05E+07	1,78E+07	25 %	188 %	3
T239V/M298Q/H373F †	T99V/M156Q/H224F †	4,43E+07	1,10E+07	25 %	118 %	3
T239I/M298Q/H373F †	T99I/M156Q/H224F †	3,47E+07	4,57E+06	13 %	92 %	3
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F †	T128N/P129A/Q143R/M156Q/Q217N/H224F †	1,33E+08	1,81E+07	14 %	355 %	2
T239V/Q286R/M298Q/Q366N †	T99V/Q143R/M156Q/Q217N †	1,85E+08	5,96E+07	32 %	491 %	4
T239I/Q286R/M298Q/Q366N †	T99I/Q143R/M156Q/Q217N †	7,40E+07	1,40E+07	19 %	197 %	4
Ensayo independiente de FT						
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	DT	%CV	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	n
WT (NovoSeven®)	WT (NovoSeven®)	9,8	3,0	30 %	88 %	14
WT (NovoSeven-RT®)	WT (NovoSeven-RT®)	12,4	4,3	35 %	112 %	12
WT	WT	11,1	2,7	25 %	100 %	5

Ensayo dependiente de FT						
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	DT	%CV	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	n
WT †	WT †	6,9	2,2	31 %	100 %	7
T128N/P129A	T128N/P129A	17,0	5,2	31 %	153 %	3
Intercambio de Gla FIX	Intercambio de Gla FIX	41,3	3,0	7 %	373 %	2
A122N/G124S	A122N/G124S	3,4	0,6	16 %	31 %	2
S52A/S60A	S152A/S160A	3,8			34 %	1
M298Q †	M156Q †	69,9	49,4	71 %	1013 %	3
T128N/P129A/M156Q †	T128N/P129A/M156Q †	90,8	70,8	78 %	1316 %	5
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	1221,7	307,0	25 %	11025 %	4
V158D/E296V/M298Q †	V21D/E154V/M156Q †	984,5	308,4	31 %	14265 %	2
T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q	T128N/P129A/V21D/E154V/M156Q	1375,8	140,3	10 %	12415 %	3
S52A/S60A/V158D/E296V/M1298Q	S152A/S160A/V21D/E154V /M156Q	1760,1	575,0	33 %	15883 %	3
Q286R	Q143R	10,3	0,7	7 %	93 %	3
T128N/P129A/Q286R	T128N/P129A/Q143R	8,7	4,3	50 %	78 %	5
T128N/P129A/Q286R †	T128N/P129A/Q143R †	10,5	5,6	53 %	152 %	6
S52A/S60A/S82A	S152A/S160A/S82A	10,2	4,7	47 %	92 %	3
T128N/P129A/S222A	T128N/P129A/S82A	4,8			43 %	1
S52A/S60A/S222A	S152A/S160A/S82A	19,6			177 %	1
H257S	H117S	3,1	1,1	35 %	28 %	7
Q366V	Q217V	4,3	0,6	14 %	39 %	2
Intercambio de Gla FIX/Q366V	Intercambio de Gla FIX/Q217V	90,0	17,7	20 %	812 %	2
Q286R/H257A	Q143R/H117A	4,3	2,1	49 %	39 %	3

Ensayo dependiente de FT							
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	DT	%CV	$k_{cat}/K_M$ (%) WT)	n	
Q286R/H257A †	Q143R/H117A †	2,5	0,0	0 %	36 %	2	
Intercambio de Glu FIX/ T128N/P129A/ S222A/Q286R	Intercambio de Glu FIX/T128N/P129J/ S82A/Q143R	15,5	2,9	18 %	140 %	4	
Intercambio de Glu FIX/ T128N/P129A/ S222A/Q286R †	Intercambio de Glu FIX/ T128N/P129J/ S82A/Q143R †	21,3	6,5	31 %	309 %	5	
Intercambio de Glu FIX/ S52A/S60A/S222A/Q286R	Intercambio de Glu FIX/S52J/A/S60J/S82A/Q143R	2,9			26 %	1	
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	21,3	6,5	31 %	193 %	5	
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	79,9	18,9	24 %	721 %	5	
Q286R/M298Q †	Q143R/M156Q †	162,4	79,9	49 %	2353 %	12	
Q286R/M298Q §	Q143R/M156Q §	135,1	7,3	5 %	1957 %	2	
Intercambio de Glu FIX/ Q286R/M298Q	Intercambio de Glu FIX/ Q143R/M156Q	672,7	79,1	12 %	6070 %	4	
Intercambio de Glu FIX/ Q286R/M298Q †	Intercambio de Glu FIX/ Q143R/M156Q †	678,2	249,0	37 %	9826 %	11	
T128N/P129A/Q286R/M298Q	T128N/P129J/Q143R/M156Q	81,6	13,4	16 %	736 %	4	
T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	T128N/P129J/Q143R/ M156Q †	212,5	135,4	64 %	3079 %	10	
Intercambio de Glu FIX/T128N/P129A/Q286R/ M298Q	Intercambio de Glu FIX/T128N/P129J/Q143R/M156Q	83,8	35,3	42 %	756 %	6	
Intercambio de Glu FIX /T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	Intercambio de Glu FIX /T128N/P129J/Q143R/M156Q †	751,9	305,3	41 %	10895 %	6	
{Intercambio de Glu FIX/E40L}/ Q286R/M298Q	{Intercambio de Glu FIX/E40L}/ Q143R/M156Q	814,1	89,0	11 %	7346 %	2	
{Intercambio de Glu FIX/K43}/ Q286R/M298Q	{Intercambio de Glu FIX/K43}/ Q143R/M156Q	902,4	360,6	40 %	8144 %	11	
{Intercambio de Glu FIX/K43}/ Q286R/M298Q †	{Intercambio de Glu FIX/K43}/ Q143R/M156Q †	794,2	178,7	23 %	11508 %	6	
{Intercambio de Glu FIX/Q44S}/ Q286R/M298Q	{Intercambio de Glu FIX/Q44S}/ Q143R/M156Q	729,0	4,5	1 %	6578 %	2	
{Intercambio de Glu FIX/M19K}/ Q286R/M298Q	{Intercambio de Glu FIX/M19K}/ Q143R/M156Q	512,0	51,4	10 %	4620 %	2	
S52A/S60A/ Q286R/M298Q	S52J/A/S60J/Q143R/M156 Q	216,8	1,6	1 %	1956 %	2	
Intercambio de Glu FIX /S52A/S60A/ Q286R/M298Q	Intercambio de Glu FIX/S52J/ S60J/Q143R/M156Q	988,7	207,5	21 %	14327 %	2	

Ensayo dependiente de FT						
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	DT	%CV	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	n
{Intercambio de Glu FIX/K43J/T128N/P129A/Q286R/M298Q † S222A/H257A/Q286R/M298Q	Glu {Intercambio de Glu FIX/K43J/T128N/P129A/Q143R/M156Q † S82A/H117A/Q143R/M156Q	389,4	34,3	9 %	5642 %	2
T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T128N/P129A/S82A/H117A/Q143R/M156Q	345,3	99,9	29 %	3116 %	3
T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/M298Q †	T128N/P129A/S82A/H117A/Q143R/M156Q †	24,8	17,2	69 %	224 %	4
S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	S152A/S160A/S82A/H117A/Q143R/M156Q	82,6	40,2	49 %	1196 %	3
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	115,6	62,9	54 %	1043 %	2
S222A/H257A/Q286R/Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	7,7	1,8	23 %	69 %	2
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	12,5	2,8	23 %	113 %	2
T129N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N †	T129N/P129A/Q143R/M156Q/Q217N †	65,9	33,4	51 %	595 %	5
{Intercambio de Glu FIX/K43J/Q286R/M298Q/Q217N †	{Intercambio de Glu FIX/K43J/Q143R/M156Q/Q217N †	64,6	28,7	44 %	936 %	4
{Intercambio de Glu FIX/K43J/T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N †	{Intercambio de Glu FIX/K43J/T128N/P129A/Q143R/M156Q/Q217N †	84,9	76,5	90 %	1230 %	4
Q286R/H373F	Q143R/H224F	218,5	137,8	63 %	3166 %	3
T128N/P129A/Q286R/H373F	T128N/P129A/Q143R/H224F24F	81,6	123,7	152 %	736 %	9
S52A/S60A/Q286R/H373F	S152A/S160A/Q143R/H224 F	6,6	0,9	13 %	59 %	2
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F †	T128N/P129A/Q143R/M156Q/H224F †	30,1			272 %	1
S52A/S60A/Q286R/M298Q /H373F	S152A/S160A/Q143R/M156 Q/H224F					
M298Q/H373F	M156Q/H224F					
T128N/P129A/M298Q/H373F	T128N/P129A/M156Q/H224F	30,7	8,9	29 %	277 %	4
V158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156 Q	63,3	10,8	17 %	571 %	3
		96,4	47,0	49 %	870 %	5
		91,6	48,0	52 %	1327 %	3
		1023,9	339,3	33 %	9240 %	5

Ensayo dependiente de FT						
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$K_{cat}/K_M$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	DT	%CV	$K_{cat}/K_M$ (% WT)	n
S222A/T239V	S82A/T99V	3,0			27 %	1
Intercambio de Glu FIX/S222A/T239V/Q286R	Intercambio de Glu FIX/S82A/T99V/Q143R	17,4	2,2	13 %	157 %	3
Intercambio de Glu FIX/S222A/T239V/Q286R †	Intercambio de Glu FIX/S82A/T99V/Q143R †	87,9	61,7	70 %	1274 %	4
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	29,3	6,2	21 %	264 %	4
Intercambio de Glu FIX/ T239V/Q286R/M298Q	Intercambio de Glu FIX/T99V/Q143R/M156Q	277,7	64,2	23 %	2506 %	3
Intercambio de Glu FIX/ T239V/Q286R/M298Q †	Intercambio de Glu FIX/ T99V/Q143R/M156Q †	902,4	323,5	36 %	13076 %	6
T128N/P129A/ T239V/Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q †	229,7	134,1	58 %	3329 %	5
S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/ M156Q	143,0	93,1	65 %	1290 %	10
T128N/P129A/ S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/ S82A/T99V/H117A/Q143R/ M156Q	179,0	80,5	45 %	2593 %	5
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	12,2			110 %	1
T239V/Q286R/M298Q/H373F	T99V/Q143R/M156Q/H224F	40,7	5,2	13 %	367 %	2
T128N/P129A/T99V/Q143R/M156Q/H224F	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q/H224F	290,0	72,9	25 %	4203 %	4
V158D/T239I/E296V/M298 Q	V21D/T99I/E154V/M156Q	216,3	32,5	15 %	1951 %	2
T239I/Q286R	T99I/Q143R	4,6	1,3	28 %	41 %	4
S222A/T239I	S82A/T99I	1,7			15 %	1
Intercambio de Glu FIX/S222A/T239I/Q286R	Intercambio de Glu FIX/S82A/T99I/Q143R	20,3			184 %	1
T239I/Q286R/M298Q	T99I/Q143R/M156Q	11,3	4,0	35 %	102 %	4
Intercambio de Glu FIX / T239I/Q286R/M298Q	Intercambio de Glu FIX/T99I/Q143R/M156Q	244,0	9,6	4 %	2202 %	2
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143 R/M156Q	77,8	40,3	52 %	1128 %	5
S222A/T239I/H257A/Q286 R/M298Q	S82A/T99I/H117A/Q143R/M156Q	51,6	5,7	11 %	466 %	2
V158D/T239V/E296V/M29 8Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	1864,3	374,0	20 %	16823 %	2

Ensayo dependiente de FT						
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	DT	%CV	$k_{cat}/K_M$ (% WT)	n
V158D/T239V/E296V/M29 BQ †	V21D/T99V/E154V/M156Q †	4231,6	913,4	22 %	61315 %	4
T239V/Q286R	T99V/Q143R	11,8	4,1	35 %	106 %	4
T239I/Q286R/M298Q/H373F	T99I/Q143R/M156Q/H224F	13,1	3,8	29 %	118 %	3
T128N/P129A/T239I/Q286 R/M298Q/H373F †	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143 R/M156Q/H224F †	113,3	43,7	39 %	1642 %	5
H257S/Q286R/M298Q	H117S/Q143R/M156Q	27,4	4,1	15 %	247 %	4
Intercambio de Gla FIX/S8222A/H257S/Q143R	Intercambio de Gla FIX /S82A/H117S/Q143R	20,5	3,6	18 %	185 %	2
S222A/Q286R/M298Q/ H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	41,7	9,1	22 %	376 %	4
H257S/Q286R/M298Q/H373F	H117S/Q143R/M156Q/H224 F	30,4	9,1	30 %	274 %	3
S82A/Q143R/M156Q/H224 F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	430,2	126,8	29 %	3883 %	3
Intercambio de Gla FIX/S222A/ Q286R/M298Q/H373F	Intercambio de Gla FIX/ S82A/Q143R/M156Q/H224F	192,1	36,8	19 %	1733 %	2
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	252,9	7,4	3 %	2282 %	2
Intercambio de Gla FIX/ S222A/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/ S82A/Q143R/M156Q	414,7	81,3	20 %	3742 %	2
T128N/P129A/A175S/ Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/Q217V	3,4	1,0	29 %	30 %	2
A122N/G124S/A175S/ Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/Q217V	3,0	0,8	26 %	27 %	4
T128N/P129A/A175S/ S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A	1,9	0,5	26 %	17 %	2
T128N/P129A/A175S/ Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R	3,3	1,2	37 %	29 %	4
A122N/G124S/A175S/ Q286R	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R	3,0	0,7	23 %	27 %	2
Intercambio de Gla FIX/ S222A/Q286R/H373F	Intercambio de Gla FIX/ S82A/Q143R/H224F	81,2	66,7	82 %	732 %	2
V158D/E296V/M298Q/H373F	V21 D/E154V/M156Q/H224F	1297,2	486,1	37 %	11706 %	4
H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	61,5	43,8	71 %	555 %	2
Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/A175S/S222 A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/ T[128]N/P[129]A/A39S/S82 A/Q143R	30,5			276 %	1

Ensayo dependiente de FT							
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	DT	%CV	$k_{cat}/K_M$ (%) WT	n	
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T128N/P129A/A39S/S82 A/H117A/Q143R/M156Q	20,3	3,8	19 %	183 %	2	
V158D/Q286R/E296V/M29 8Q/H373F	V21D/Q143R/E154V/M156 Q/H224F	573,6	100,4	18 %	5176 %	6	
M298Q/Q366N/H373F †	M156Q/Q217N/H224F †	125,9	75,2	60 %	1825 %	4	
T239V/M298Q/H373F †	T99V/M156Q/H224F †	319,5	125,0	39 %	4629 %	6	
T239I/M298Q/H373F †	T99I/M156Q/H224F †	138,2	101,9	74 %	2003 %	7	
T128N/P129A/Q286R/M29 8Q/Q366N/H373F †	T128N/P129A/Q143R/M156Q/Q217N/H224F †	160,9	43,3	27 %	2331 %	4	
T239V/Q286R/M298Q/Q366N †	T99V/Q143R/M156Q/Q217N †	64,2	36,3	57 %	931 %	3	
T239I/Q286R/M298Q/Q366N †	T99I/Q143 R/M156Q/Q217N †	88,8	23,5	26 %	1287 %	5	

† producido en células CHCX  
 § producido en el clon de línea celular estable CHCX 52-5f7



**Ejemplo 5****Determinación de la inhibición de FVIIa FT o FVIIa por AT-III/heparina**

5 La potencia de la interacción entre el complejo de AT-III/heparina y FVIIa en presencia o ausencia de factor tisular soluble (FTs), es decir dependiente de FT o independiente de FT, se evaluó midiendo el nivel de inhibición de diversas concentraciones de AT-III en la actividad catalítica de FVIIa/FTs hacia un sustrato, Mesil-FPR-ACC. El valor de  $K_{0,5}$  se determinó para cada variante de FVIIa ensayada, que corresponde a la concentración molar de AT-III que se requirió para inhibición del 50 % ( $CI_{50}$ ) de la variante de FVIIa en un ensayo de 30 minutos a temperatura ambiente (~25 °C).

Se prepararon dos ensayos separados, uno con FTs y uno sin FTs. Se preparó una solución 2  $\mu$ M de AT-III/heparina (heparina 5  $\mu$ M final) mezclando 26,4  $\mu$ l de AT-III 151,7  $\mu$ M (AT-III humana purificada en plasma; Molecular Innovations) con 50  $\mu$ l de heparina BPM 0,2 mM (CalBiochem), 400  $\mu$ l de tampón de ensayo 5x (Hepes 100 mM, NaCl 750 mM,  $CaCl_2$  25 mM, BSA 0,05 %, PEG 8000 0,5 %, pH 7,4) y 1,523 ml de agua de uso en reactivos. Esta solución fue para su uso como la mayor concentración en el ensayo dependiente de FT. Se preparó una solución que contenía AT-III/heparina 4  $\mu$ M (heparina 5  $\mu$ M final) para su uso en el ensayo independiente de FT mezclando 52,8  $\mu$ l de AT-III 151,7  $\mu$ M (Molecular Innovations) con 50  $\mu$ l de heparina BPM 0,2 mM (CalBiochem), 400  $\mu$ l de tampón de ensayo 5x y 1,497 ml de agua de uso en reactivos. Las soluciones de AT-III/heparina se incubaron durante 5-10 minutos a temperatura ambiente y después se diluyeron dos veces en una placa de polipropileno de 96 pocillos profundos con un volumen final de 1 ml que contenía heparina 5  $\mu$ M, dando como resultado diluciones de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 y 0 nM, o 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, y 0 nM. Las variantes de FVIIa y FVIIa de tipo silvestre se diluyeron a 250 nM en tampón de ensayo 1x (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM,  $CaCl_2$  5 mM, BSA 0,01 %, PEG 8000 0,1 %, pH 7,4). Para el ensayo dependiente de FT, se formaron complejos de FVIIa 5 nM/FTs 50 nM mezclando 20  $\mu$ l de FVIIa con 10  $\mu$ l de FTs 5  $\mu$ M (Factor de Coagulación Humana de R&D Systems III: n° 2339-PA), 200  $\mu$ l de tampón de ensayo 5x y 770  $\mu$ l de agua de uso en reactivos e incubando las soluciones durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Para el ensayo independiente de FT, se mezclaron 100  $\mu$ l de FVIIa con 200  $\mu$ l de tampón de ensayo 5x y 700  $\mu$ l de agua de uso en reactivos para producir soluciones 25 nM de FVIIa. Para comenzar el ensayo, se mezclaron por separado 25  $\mu$ l de las soluciones de FVIIa/FT o FVIIa solamente con 25  $\mu$ l de cada dilución de AT-III/heparina en pocillos de una placa de ensayo de área media negra de 96 pocillos (Nunc). Las condiciones de ensayo finales para el ensayo dependiente de FT fueron FVIIa 2,5 nM/FTs 25 nM y las concentraciones de AT-III/heparina que variaban de 1000 nM a 0 nM. Para el ensayo independiente de FT, las concentraciones de FVIIa fueron FVIIa 12,5 nM y las concentraciones de AT-III/heparina variaron de 2000 nM a 0 nM. Las placas se incubaron durante 30 minutos con agitación a temperatura ambiente (~25 °C).

Se preparó una solución de reserva de sustrato de FVIIa (Mesil-FPR-ACC) disolviendo el sustrato en DMSO a 20 mM y preparando después una solución de trabajo de 0,5 mM en tampón de ensayo 1x. Después de incubación de la placa de ensayo anterior, se añadieron 50  $\mu$ l del sustrato de FVIIa a cada pocillo de la placa de ensayo. Las reacciones se mezclaron y la actividad residual de FVIIa se evaluó siguiendo las tasas iniciales de escisión de sustrato durante 15 minutos en un lector de fluorescencia ajustado a 30 °C.

Para determinar el grado de inhibición por AT-III/heparina para FVIIa o variantes de FVIIa, los datos sin procesar recogidos con la aplicación SoftMax Pro (Molecular Devices) se exportaron como archivos.XML. Se realizaron análisis de datos no lineales adicionales con XLfit4, un paquete de software para ajuste de curvas automático y análisis estadístico dentro del ambiente de hoja de cálculo de Microsoft Excel (IDBS Software). La plantilla de hoja de cálculo se usó para calcular la serie de diluciones de AT-III, relación de AT-III con respecto a FVIIa, y las relaciones de  $V_i/V_o$  para cada repetición de FVIIa en cada concentración de AT-III experimental. Los análisis de regresión no lineal de actividad de FVIIa residual (expresada como  $V_i/V_o$ ) frente a concentración de AT-III se procesaron usando ng XLfit4 y una ecuación de inhibición hiperbólica de la forma  $((C+(Amp*(1-(X/(K_{0,5}+X))))))$ ; donde C = la compensación (fijada en 0 para permitir la extrapolación de conjuntos de datos que no alcanzan el 100 % de inhibición en el transcurso del ensayo), Amp = la amplitud del ajuste y  $K_{0,5}$ , que corresponde a la concentración de AT-III requerida para inhibición semimáxima en las condiciones de ensayo. Para varias variantes de FVIIa, AT-III inhibió menos del 20-25 % de la actividad proteasa total a la mayor concentración ensayada de AT-III, lo que representa un límite superior de detección para el ensayo. Se asignó por lo tanto a variantes con menos de 20-25 % de inhibición máxima un valor de  $K_{0,5}$  de límite inferior (5  $\mu$ M para dependiente de FT y 10  $\mu$ M para independiente de FT) y en la mayoría de los casos se esperaba que tuvieran resistencias a AT-III mayores que el valor indicado.

Las Tablas 16 y 17 proporcionan los resultados de los ensayos que se realizaron usando variantes de FVIIa expresadas en células 293-F Freestyle TM y/o células BHK-21, en presencia y ausencia de FT, respectivamente. Los resultados se presentan tanto como el parámetro de  $K_{0,5}$  ajustado como una representación del alcance de la resistencia a AT-III para cada variante en comparación con el FVIIa de tipo silvestre expresado como una relación de sus valores de  $K_{0,5}$  ajustados ( $K_{0,5}$  variante/ $K_{0,5}$  tipo silvestre). Varias variantes de FVIIa mostraron resistencia aumentada a AT-III en comparación con FVIIa de tipo silvestre. Por ejemplo, Q286R-FVIIa (es decir FVIIa que contiene la mutación Q286R), Q286R/S222A-FVIIa, Q286R/S222A/Intercambio de Gla FIX-FVIIa, A175S/Q286R/Q366V-FVIIa, Q286M-FVIIa, Q286L-FVIIa y Q286Y-FVIIa están entre el grupo que mostró resistencia

a AT-III en ausencia de FT que era más de 4 veces mayor que la de FVIIa de tipo silvestre.

**Tabla 16. Inhibición de variantes de FVIIa por AT-III/heparina en presencia de FT**

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (Numeración de Quimotripsina)	Ensayo de Resistencia a ATIII Dependiente de FT			
		Células 293-F		Células BHK-21	
		K <sub>0,5</sub> (nM)	K <sub>0,5mut</sub> /K <sub>0,5wt</sub>	K <sub>0,5</sub> (nM)	K <sub>0,5mut</sub> /K <sub>0,5wt</sub>
WT	WT	72,3	1,0	56,0	1,0
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	75,1	1,0	79,0	1,4
Q286R	Q143R	60,6	0,8	59,1	1,1
S222A	S82A	47,6	0,7	43,9	0,8
H257S	H117S	50,6	0,7	52,9	0,9
H373D	H224D	423,6	5,9		
H373E	H224E	152,1	2,1		
H373S	H224S	64,2	0,9		
H373F	H224F	38,7	0,5		
H373A	H224A	76,9	1,1		
Q366D	Q217D	2239,2	31,0		
Q366E	Q217E	116,2	1,6		
Q366N	Q217N	75,3	1,0		
Q366T	Q217T	57,5	0,8		
Q366S	Q217S	107,2	1,5		
Q366V	Q217V	25,8	0,4	20,0	0,4
A175S	A39S	112,4	1,6		
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	48,2	0,7		
Q286R/S222A	Q143R/S82A			53,3	1,0
Q286R/S222A/ Intercambio de Gla FIX	Q143R/S82A/Intercambio de Gla FIX	83,7	1,2		
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q			74,2	1,3
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q			21,8	0,4
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE			101,1	1,8
P321K	P170iK			97,5	1,7
P321E	P170iE			66,0	1,2
P321Y	P170iY			49,5	0,9
P321S	P170iS			60,7	1,1
T239S	T99S	254,6	3,5		
T239Q	T99Q			117,2	2,1
T239V	T99V			42,5	0,8
T239L	T99L			81,1	1,4
T239H	T99H			52,0	0,9

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (Numeración de Quimotripsina)	Ensayo de Resistencia a ATIII Dependiente de FT			
		Células 293-F		Células BHK-21	
		K <sub>0,5</sub> (nM)	K <sub>0,5mut</sub> /K <sub>0,5wt</sub>	K <sub>0,5</sub> (nM)	K <sub>0,5mut</sub> /K <sub>0,5wt</sub>
T239I	T99I			125,3	2,2
H257A/M298Q	H117A/M156Q			89,1	1,6
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	66,6	0,9		
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V			62,0	1,1
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V			72,0	1,3
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V			38,5	0,7
Q286M	Q143M	53,1	0,7		
Q286L	Q143L	114,4	1,6		
Q286Y	Q143Y	131,3	1,8		
Q366I	Q217I	23,2	0,3		
Q366L	Q217L	23,0	0,3		
Q366M	Q217M	35,4	0,5		

Tabla 17. Inhibición de variantes de FVIIa por AT-III/heparina en ausencia de FT

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (Numeración de Quimotripsina)	Ensayo de Resistencia a AT-III Dependiente de FT			
		Células 293-F		Células 293-F	
		K <sub>0,5</sub> (nM)	K <sub>0,5mut</sub> /K <sub>0,5wt</sub>	K <sub>0,5</sub> (nM)	K <sub>0,5mut</sub> /K <sub>0,5wt</sub>
WT	WT	2265	1,0	2222	1,0
V158D/E296V/M298 Q	V21D/E154V/M156Q	389	0,2	415	0,2
Q286R	Q143R	10000	>4,4	10000	>4,5
S222A	S82A	2338	1,0	2088	0,9
H257S	H117S	5884	2,6	5584	2,5
H373D	H224D	10000	>4,4		
H373E	H224E	6949	3,1		
H373S	H224S	9513	4,2		
H373F	H224F	1306	0,6		
H373A	H224A	10000	>4,4		
Q366D	Q217D	10000	>4,4		
Q366E	Q217E	6901	3,0		
Q366N	Q217N	5186	2,3		
Q366T	Q217T	5885	2,6		
Q366S	Q217S	10000	>4,4		
Q366V	Q217V	487	0,2	531	0,2
A175S	A39S	5785	2,6		

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (Numeración de Quimotripsina)	Ensayo de Resistencia a AT-III Dependiente de FT			
		Células 293-F		Células 293-F	
		K <sub>0,5</sub> (nM)	K <sub>0,5mut</sub> /K <sub>0,5wt</sub>	K <sub>0,5</sub> (nM)	K <sub>0,5mut</sub> /K <sub>0,5wt</sub>
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	2926	1,3		
Q286R/S222A	Q143R/S82A			10000	>4,5
Q286R/S222A/Intercambio de Gla FIX	Q143R/S82A/Intercambio de Gla FIX	10000	>4,4		
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q			3663	1,6
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q			72	
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE			5182	2,3
P321K	P170iK			5274	2,4
P321E	P170iE			3666	1,6
P321Y	P170iY			705	0,3
P321S	P170iS			2689	1,2
T239S	T99S	10000	>4,4		
T239Q	T99Q			2222	1,0
T239V	T99V			2644	1,2
T239L	T99L			8532	3,8
T239H	T99H			10000	>4,5
T239I	T99I			10000	>4,5
H257A/M298Q	H117A/M156Q			1344	0,6
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/ M156Q	7742	3,4		
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V			2251	1,0
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V			10000	>4,5
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V			3398	1,5
Q286M	Q143M	10000	>4,4		
Q286L	Q143L	10000	>4,4		
Q286Y	Q143Y	10000	>4,4		
Q366I	Q217I	599	0,3		
Q366L	Q217L	1708	0,8		
Q366M	Q217M	914	0,4		

Se realizó un conjunto adicional de experimentos para evaluar la inhibición de variantes de FVIIa por AT-III/heparina en ausencia de FT usando el mismo ensayo que se ha descrito anteriormente con modificaciones menores. Se usó heparina no fraccionada, de longitud completa (Calbiochem) en lugar de heparina de bajo peso molecular (heparina BPM) para aumentar la velocidad de la reacción de inhibición (véase, por ejemplo, Olson *et al.* (2004) *Thromb Haemost* 92(5), 929-939). El tiempo de incubación del ensayo se aumentó a 60 minutos, y la concentración del sustrato de mesil-FPR-ACC usado para determinar la actividad residual se aumentó hasta una concentración final de 0,5 mM.

- 10 La Tabla 18 proporciona los resultados de los ensayos que se realizaron en ausencia de FT usando variantes de FVIIa expresadas en células BHK-21 y células CHO. Los resultados se presentan tanto como el parámetro K<sub>0,5</sub>

ajustado como como una representación del alcance de la resistencia AT-III para cada variante en comparación con el FVIIa de tipo silvestre expresado como una relación de sus valores de  $K_{0,5}$  ajustados ( $K_{0,5}$  mutante/ $K_{0,5}$  tipo silvestre). La desviación típica (DT) y el número de ensayo (n) también se muestran.

Tabla 18. Inhibición de variantes de FVIIa por AT-III/heparina en ausencia de FT

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	K <sub>0,5</sub> (nM)	DT	%CV	K <sub>0,5mut</sub> /K <sub>0,5wt</sub>	n
WT (NovoSeven®)	WT (NovoSeven®)	424,3	70,9	17 %	1,08	3
WT (NovoSeven-RT®)	WT (NovoSevenRT®)	424,2	60,5	14 %	1,08	5
WT	WT	393,8	67,8	17 %	1,00	4
WT †	WT †	503,0	120,0	24 %	1,00	4
T128N/P129A	T128N/P129A	465,3	28,1	6 %	1,18	2
Intercambio de Gla FIX	Intercambio de Gla FIX	298,9			0,76	1
K109N	K109N	330,1	72,3	22 %	0,84	2
A122N/G124S	A122N/G124S	372,5	28,6	8 %	0,95	2
S52A/S60A	S52A/S60A	360,6			0,92	1
M298Q	M156Q	120,1	14,1	12 %	0,31	5
M298Q †	M156Q	130,0	14,3	11 %	0,26	2
T128N/P129A/M298Q †	T128N/P129A/M156Q †	143,9	14,5	10 %	0,29	2
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	75,5	10,1	13 %	0,19	27
V158D/E296V/M298Q †	V21D/E154V/M156Q †	77,4	18,0	23 %	0,15	7
T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q	T128N/P129AA/21D/E154V/M156Q	81,6	3,8	5 %	0,21	2
S52A/S60A/V158D/E296V/M1298Q	S52A/S60A/V21 D/E154V/M156Q	78,8	2,9	4 %	0,20	2
Q286R	Q143R	1085,1	320,0	29 %	2,76	20
T128N/P129A/Q286R	T128N/P129A/Q143R	1645,2	440,2	27 %	4,18	9
T128N/P129A/Q286R †	T128N/P129A/Q143R †	1739,2	467,0	27 %	3,46	5
S52A/S60A/Q143R	S52A/S60A/Q143R	1318,0	376,8	29 %	3,35	2
S222A	S82A	383,5	84,4	22 %	0,97	3

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	K <sub>0,5</sub> (nM)	DT	%CV	K <sub>0,5mut</sub> /K <sub>0,5wt</sub>	n
T128N/P129A/S222A	T[128]N/P[129]A/S82A	401,0			1,02	1
H257S	H117S	722,8			1,84	1
Q366V	Q217V	101,1	24,7	24 %	0,26	3
Intercambio de GlaFIX/Q366V	Intercambio de GlaFIX/Q217V	108,2	5,8	5 %	0,27	2
A175S	A39S	1328,0	96,2	7 %	3,37	3
K109N/A175S	K[109]N/A39S	2031,8	401,2	20 %	5,16	2
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	1637,2	171,3	10 %	4,16	2
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	1392,7	295,3	21 %	3,54	2
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	1345,8	241,1	18 %	3,42	2
Q286R/H257A	Q143R/H117A	2398,7	551,2	23 %	6,09	9
Q286R/H257A †	Q143R/H117A †	2800,8	938,4	34 %	5,57	5
Q286R/S222A	Q143R/S82A	1203,0	191,2	16 %	3,05	2
Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/ S222A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/ T[128]N/P[129]A/ S82A/Q143R	1703,2	145,2	9 %	4,32	2
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	2592,0	806,5	31 %	6,58	4
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	299,3	62,9	21 %	0,76	7
Q286R/M298Q †	Q143R/M156Q †	287,3	26,6	9 %	0,57	20
Q286R/M298Q §	Q143R/M156Q§	395,1	56,4	14 %	0,79	3
Intercambio de Gla FIX/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/Q143R/M156Q	281,6	43,2	15 %	0,72	3
Intercambio de Gla FIX/ Q286R/M298Q †	Intercambio de Gla FIX/Q143R/M156Q †	238,2	21,6	9 %	0,47	3
T128N/P129A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	283,7	49,4	17 %	0,72	13
T128N/P129A/Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q †	283,7	77,6	27 %	0,56	3
Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/Q286R/ M298Q	Intercambio de Gla FIX/T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	508,2	197,0	39 %	1,29	3

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	K <sub>0,5</sub> (nM)	DT	%CV	K <sub>0,5mut</sub> /K <sub>0,5WT</sub>	n
Intercambio de Glia FIX/T128N/P129A/Q286R/M298Q †	Intercambio de Glia FIX/T128N/P129A/Q143R/M156Q †	325,2	82,2	25 %	0,65	2
{Intercambio de Glia FIX/E40L/Q286R/M298Q	{Intercambio de Glia FIX/E[40L]/Q143R/M156Q	286,7	2,4	1 %	0,73	2
{Intercambio de Glia FIX/K43I/Q286R/M298Q	{Intercambio de Glia FIX/K[43I]/Q143R/M156Q	244,3	29,8	12 %	0,62	5
{Intercambio de Glia FIX/K43I/Q286R/M298Q †	{Intercambio de Glia FIX/K[43I]/Q143R/M156Q †	219,3	13,7	6 %	0,44	2
{Intercambio de Glia FIX/Q44S/Q286R/M298Q	{Intercambio de Glia FIX/Q[44S]/Q143R/M156Q	271,4	12,4	5 %	0,69	2
{Intercambio de Glia FIX/M19K/Q286R/M298Q	{Intercambio de Glia FIX/M[19K]/Q143R/M156Q	309,6			0,79	1
Intercambio de Glia FIX/S52A/S60A/Q286R/M298Q †	Intercambio de Glia FIX/S[52A]/S[60A]/Q143R/M156Q †	253,6			0,50	1
{Intercambio de Glia FIX/M19K/Q44S/Q286R/M298Q	{Intercambio de Glia FIX/M[19K]/E[40L]/K[43I]/Q[44S]/Q143R/M156Q	339,3	100,8	30 %	0,86	2
{Intercambio de Glia FIX/K43I/T128N/P129A/Q286R/M298Q †	{Intercambio de Glia FIX/K[43I]/T128N/P129A/Q143R/M156Q †	222,5	10,7	5 %	0,44	2
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	313,9			0,80	1
T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T128N/P129A/S82A/H117A/Q143R/M156Q	653,0	127,9	20 %	1,66	4
T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/M298Q †	T128N/P129A/S82A/H117A/Q143R/M156Q †	327,7	23,2	7 %	0,65	2
S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	S[52A]/S[60A]/S82A/H117A/Q143R/M156Q	447,6	117,6	26 %	1,14	3
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	324,1	77,9	24 %	0,82	3
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N †	T128N/P129A/Q143R/M156Q/Q217N †	345,8	24,2	7 %	0,69	3
{Intercambio de Glia FIX/K43I/Q286R/M298Q/Q366N †	{Intercambio de Glia FIX/K[43I]/Q143R/M156Q/Q217N †	404,4	48,0	12 %	0,80	3
{Intercambio de Glia FIX/K43I/T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N †	{Intercambio de Glia FIX/K[43I]/T128N/P129A/Q143R/M156Q/Q217N †	319,1	71,8	22 %	0,63	2
Q286R/H373F	Q143R/H224F	620,8	133,4	3 %	1,58	2
T128N/P129A/Q286R/H373F	T128N/P129A/Q143R/H224F	590,4	104,2	18 %	1,50	4
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	152,1	7,2	5 %	0,39	3
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F	T128N/P129A/Q143R/M156Q/H224F	182,6	43,2	24 %	0,46	5



Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	K <sub>0,5</sub> (nM)	DT	%CV	K <sub>0,5</sub> μmol/K <sub>0,5</sub> wt	n
M298Q/H373F	M156Q/H224F	81,7	10,5	13 %	0,21	2
T128N/P129A/M156Q/H224F †	T128N/P129A/M156Q/H224F †	89,1	3,8	4 %	0,18	2
V21D/Q143R/E154V/M156Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	85,0	14,7	17 %	0,22	13
S222A/T239V	S82A/T99V	967,3	282,6	29 %	2,46	5
Intercambio de Glu FIX/S222A/T239V/Q286R	Intercambio de Glu FIX/S82A/T99V/Q143R	2438,4	269,4	11 %	6,19	2
Intercambio de Glu FIX /S222A/T239V/Q286R †	Intercambio de Glu FIX /S82A/T99V/Q143R †	1343,5	507,1	38 %	2,67	3
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	3628,9	1465,9	40 %	9,21	4
Intercambio de Glu FIX/ T239V/Q286R/M298Q	Intercambio de Glu FIX/T99V/Q143R/M156Q	483,7	65,6	14 %	1,23	2
Intercambio de Glu FIX/ T239V/Q286R/M298Q †	Intercambio de Glu FIX/T99V/Q143R/M156Q †	314,3			0,62	1
T128N/P129A/ T239V/Q286R/M298Q †	T128N/P129A/ T99V/Q143R/M156Q †	266,4	52,1	20 %	0,53	2
S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q	469,3	133,2	28 %	1,19	6
T128N/P129A/ S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q †	T128N/P129A/S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q †	326,5	55,3	17 %	0,65	2
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	630,6	194,0	31 %	1,60	3
T128N/P129A/T239V/Q286R/ M298Q/H373F †	T128N/P129A/T99V/Q 143R /M156Q/H224F †	121,2	25,8	21 %	0,24	4
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	179,5	50,5	28 %	0,46	5
T239V/Q286R	T99V/Q143R	5823,0	2185,5	38 %	14,79	9
S222A/T239I	S82A/T99I	1149,8	12,8	1 %	2,92	2
Intercambio de GluFIX/S222A/T239I/Q2 86R	Intercambio de Glu FIX/S82A/T99I/Q143R	3313,1	130,3	4 %	8,41	2
T239I/Q286R/M298Q	T99I/Q143R/M156Q	1611,4	185,9	12 %	4,09	2
Intercambio de Glu FIX/ T239I/Q286R/M298Q	Intercambio de Glu FIX/T99I/Q143R/M156Q	1171,3	104,5	9 %	2,97	2
T128N/P129A T239I/Q286R/M298Q †	T128N/P129A/T99I/Q143R/M156Q †	917,0	60,5	7 %	1,82	3
S222A/T239I/H257A/Q286R/ M298Q	S82A/T99I/H117A/Q143R/M156Q	1223,6	18,9	2 %	3,11	2

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	K <sub>0,5</sub> (nM)	DT	%CV	K <sub>0,5mut</sub> /K <sub>0,5wt</sub>	n
T239U/Q286R/H373F	T99I/Q143R/H224F	1007,6	29,8	3 %	2,56	2
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	67,7	16,6	24 %	0,17	4
V158D/T239V/E296V/M298Q †	V21D/P99V/E154V/M156Q †	67,1			0,13	1
T239V/Q286R	T99V/Q143R	1787,9	106,3	6 %	4,54	2
T239I/Q286R/M298Q/ H237F	T99I/Q143R/M156Q/H224F	370,4	3,0	1 %	0,94	2
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q H237F †	T128N/P129A/T99I/Q143R/ M156Q/H224F †	316,6	24,7	8 %	0,63	2
S222A/H257S/Q286R/M298Q	S82A/E117S/Q143R/M156Q	526,7			1,34	1
S222A/Q286R/M298Q/ H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	163,2	46,9	29 %	0,41	4
Intercambio de Gla FIX/S222A/ Q286R/M298Q/H373F	Intercambio de Gla FIX S82A/Q143R/M156Q/H224F	163,5	58,2	36 %	0,42	4
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	308,4	119,9	39 %	0,78	4
Intercambio de Gla FIX/ S222A/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX S82A/Q143R/M156Q	266,3	104,2	39 %	0,68	4
T128N/P129A/A175S/Q366V	T128N/P129I/A39S/Q217V	332,6	56,2	17 %	0,84	3
A122N/G124S/A175S/Q366V	A122N/G124S/A39S/Q217V	336,1	11,0	3 %	0,85	3
T128N/P129A/A175S/S222A	T128N/P129I/A39S/S82A	1913,4			4,86	1
A122N/G124S/A175S/S222A	A122N/G124S/A39S/S82A	1548,6	394,1	25 %	3,93	2
T128N/P129A/A175S/Q286R	T128N/P129I/A39S/Q143R	9545,5	2797,3	29 %	24,24	2
A122N/G124S/A175S/Q286R	A122N/G124S/A39S/Q143R	6923,3			17,58	1
Intercambio de Gla FIX/ S222A/Q286R/H373F	Intercambio de Gla FIX/ S82A/Q143R/H224F	587,3	5,1	1 %	1,49	2
H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	390,8			0,99	1
Intercambio de Gla FIX/ T128N/P129A/A175S/ S222A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/T128N/P129I/A39S/S82A/Q143R	6486,4	148,2	2 %	16,47	2
Intercambio de Gla FIX/A122N/G124S/A175S/S222A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/A122N/G124S/A39S/S82A/Q143R	5524,0	1434,1	26 %	14,03	2
T128N/P129A/A175S/ Q286R/M298Q	T128N/P129I/A39S/Q143 R/M156Q	2311,8	520,7	23 %	5,87	2

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	K <sub>0,5</sub> (nM)	DT	%CV	K <sub>0,5mut</sub> /K <sub>0,5wt</sub>	n
A122N/G124S/A175S/ Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/Q 143 R/M156Q	1954,2	450,7	23 %	4,96	2
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/ H117A/Q143R/M156Q	3212,9	1140,7	36 %	8,16	2
A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	2972,8	751,2	25 %	7,55	2
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/A39S/Q 143 R/M156Q/H224F	1132,4	441,3	39 %	2,88	2
A122N/G124S/A175S/ Q286R/M298Q/H373F	A[122]N/G[124]S/A39S/Q 143 R/M156Q/H224F	1000,1	184,3	18 %	2,54	2
V158D/Q286R/E296V/M298Q /H373F	V21D/Q143R/E154V/M156Q/ H224F	62,1	10,5	17 %	0,16	1
M298Q/Q366N/H373F †	M156Q/Q217N/H224F	90,8	4,8	5 %	0,18	2
T239V/M298Q/H373F †	T99V/M156Q/H224F	46,6	7,9	17 %	0,09	2
T239I/M298Q/H373F †	T99I/M156Q/H224F	178,7	29,7	17 %	0,36	2
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F †	T[128]N/P[129]A/Q 143R/M156Q/Q217N/H224F	148,3	12,9	9 %	0,29	2
T239V/Q286R/M298Q/Q366N †	Q143R/M156Q/Q217N/T99V	252,2	40,9	16 %	0,50	2
T239I/Q286R/M298Q/Q366N †	T99I/Q143R/M156Q/Q217N	813,2	105,1	13 %	1,62	2

† producido en células CHOx

§ producido en el clon de línea celular estable CHOx 52-5F7

**Ejemplo 6****Evaluación *in vivo* de la actividad procoagulante del polipéptido de FVIIa**

5 Se establecieron modelos de ratón de hemofilia A para evaluar la actividad procoagulante de polipéptidos de FVIIa. Se indujo hemofilia A en ratones CD-1 por administración intraperitoneal de anticuerpos anti FVII, seguido de retirada quirúrgica de las puntas de las colas para iniciar el sangrado. También se usaron ratones deficientes en FVII (ratones FVIII<sup>-/-</sup>), pero no se trataron con anticuerpos anti FVIII. Los ratones se trataron después con polipéptido de FVIIa y se midió la cantidad de sangre perdida en 20 minutos para determinar la actividad procoagulante de los polipéptidos de FVIIa.

**A. Evaluación *in vivo* de la actividad procoagulante de FVIIa de tipo silvestre**

15 Se estableció un modelo de ratón de hemofilia A para evaluar la actividad procoagulante de polipéptidos de FVIIa. Se indujo hemofilia A en ratones CD-1 mediante la administración de anticuerpos anti FVII, seguido de la retirada quirúrgica de las puntas de las colas para iniciar el sangrado. Los ratones se trataron después con polipéptido de FVIIa y se midió el tiempo que se tardaba en detener el sangrado, y la cantidad de sangre perdida durante este tiempo, para determinar la actividad procoagulante de los polipéptidos de FVIIa.

20 Los ratones CD-1 macho se anestesiaron por administración intraperitoneal tanto de tiobarbital sódico a 100 mg/kg como de ketamina a 100 mg/kg. Se administró lidocaína por inyección subcutánea en el cuello ventral para reducir la sensibilidad. La tráquea y la arteria carótida se canularon a través de una pequeña incisión cutánea en el cuello para facilitar la respiración sin restricciones y la administración de anticuerpo anti Factor VIII, Factor VIIa humano recombinante (rhFVIIa) y/o polipéptidos de FVII modificados.

25 Se administró a los ratones con cánulas 3,76 mg de anticuerpo de oveja anti FVIII humano (Affinity Biologicals, lote IG129R4, 612 UB de ratón/ml) en 40  $\mu$ l. Esta dosis se determinó realizando un experimento de respuesta a dosis inicial con el anticuerpo (usando 0,376, 0,94, 1,88 y 3,76 mg de anti FVIII humano), y evaluando la pérdida de sangre y el tiempo de sangrado. Después de 20 minutos, las colas de los ratones se colocaron en tubos de 15 ml que contenían solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 39 °C durante un periodo de 10 minutos. A los 30 minutos, las colas se retiraron brevemente de la solución de PBS y se cortaron los últimos 5 mm de las colas para iniciar el sangrado. Se anotó el tiempo en el que comenzó el sangrado. Las colas se devolvieron después al tubo que contenía PBS a 39 °C y se permitió que sangraran durante 5 minutos (presangrado) para asegurar que los ratones había respondido al anticuerpo anti FVIII. Después del presangrado, se administraron a los ratones polipéptidos de FVIIa o el vehículo en el que las proteínas de FVIIa se prepararon y suministraron. Los polipéptidos de FVIIa se diluyeron en PBS o un tampón compuesto de cloruro sódico 52 mM, cloruro cálcico deshidratado 10,2 mM, glicilglicina 9,84 mM, polisorbato 80 0,01 % y manitol 165 mM. Las preparaciones de FVIIa se administraron a 1, 3 o 10 mg/kg, en un volumen equivalente a 3 ml/kg, a través de las cánulas carótidas y las colas se colocaron en tubos nuevos que contenían PBS a 39 °C. El sangrado se controló durante un periodo de 20 minutos y se anotaron los tiempos en los que se detuvo el sangrado. El tiempo de sangrado total se calculó como la suma de la duración de sangrado durante el presangrado, y la duración del sangrado después de la administración de polipéptidos de FVIIa, o PBS o tampón.

45 Para determinar la cantidad de sangre perdida durante los episodios de sangrado, se ensayaron los contenidos de los tubos de 15 ml con respecto a contenido de hemoglobina. Se diluyó Triton X-100 1 en 4 en agua estéril y se añadieron 100  $\mu$ l a 1 ml de las muestras para provocar hemólisis. La absorbancia de las muestras se midió después a una longitud de onda de 546 nm. Para calcular la cantidad de sangre perdida, se leyó la absorbancia frente a una curva patrón generada midiendo la absorbancia a 546 nm de volúmenes conocidos de sangre murina, diluida en PBS y hemolisada como anteriormente con Triton X 100.

50 Se realizó un experimento que comparaba rhFVIIa generado como se ha descrito anteriormente con el FVIIa humano recombinante disponible en el mercado (NovoSeven®, Novo Nordisk) y se evaluó la pérdida de sangre después de la administración de una dosis de 3 mg/kg de cada proteína. La pérdida de sangre en el grupo de vehículo (tampón, n = 15) fue de  $671,9 \pm 57,89 \mu$ l durante el periodo de 20 minutos. Esto se redujo por el rhFVIIa producido por Catalyst Biosciences hasta  $264,1 \pm 56,59 \mu$ l y por NovoSeven® hasta  $273,7 \pm 53,93 \mu$ l (n = 14). Este experimento demostró la equivalencia entre las dos proteínas.

**B. Análisis de la actividad coagulante de variantes de FVIIa en ratones CD-1 con hemofilia A inducida**

60 Se llevaron a cabo experimentos iniciales para determinar la dosis requerida y el tiempo y duración del efecto de anticuerpos anti FVIII humano cuando se proporcionaron por la vía intraperitoneal para inducir hemofilia en ratones CD-1. Para el primer lote de anti FVIII (lote 1; Affinity Biologicals, lote IG129R4), esta se basó inicialmente en la dosis usada para los experimentos de canulación, descritos anteriormente. La dosis que se determinó que provocaba un estado hemofílico (sangrado descontrolado durante un periodo de ensayo de 20 minutos) fue de 7,54 mg/ratón (80  $\mu$ l de una solución de reserva de 94,25 mg/ml). Este lote tuvo una actividad neutralizante de 612 UB de

ratón/ml. Para el segundo lote de anti FVIII humano (lote 2; Affinity Biologicals, lote IG1577R2, actividad neutralizante de 474 UB de ratón/ml), la dosis usada fue de 11,98 mg/ratón (120 µl de una solución de reserva 99,8 mg/ml) y se administró a las 6 horas antes del corte de la cola.

- 5 Para inducir hemofilia, se dosificó a ratones CD-1 macho (25-35 g) por vía intraperitoneal el lote 1 o el lote 2 de anti FVIII antes del experimento. Se anestesiaron ratones macho CD-1 y FVIII<sup>-/-</sup> por administración intraperitoneal de un cóctel de ketamina/xilacina (45 mg/ml y 3,6 mg/ml, respectivamente, en solución salina) y se colocaron en una plataforma caliente (39 °C) para asegurar que no había descenso de la temperatura corporal. La habitación del procedimiento se mantuvo a una temperatura de 27,78 °C. Diez minutos antes del corte de la cola la cola se sumergió en 10 ml de PBS precalentado (tubo de centrifuga de 15 ml; 39 °C). Se inyectaron a de ocho a diez ratones polipéptidos de FVIIa humano recombinante (Novoseven®, Novo Nordisk) o FVII modificado diluidos en un tampón compuesto de cloruro sódico 52 mM, cloruro cálcico deshidratado 10,2 mM, glicilglicina 9,84 mM, polisorbato 80 0,01 % y manitol 165 mM a través de la vena de la cola en una única inyección. También se inyectó solamente vehículo en un grupo de ratones como control. Si no se realizó la inyección, el animal se excluyó del estudio. Se realizó una inyección con polipéptido de FVIIa o vehículo 5 minutos antes del corte de la cola. Se realizó un corte de la cola usando una cuchilla a 5 mm del final de la cola y se recogió sangre en PBS durante un periodo de 20 minutos. Al final del periodo de recogida, se evaluó la pérdida de sangre total. Los tubos de recogida se mezclaron y se tomó una alícuota de 1 ml de cada muestra y se ensayó con respecto al contenido de hemoglobina. Se diluyó Triton X-100 1 en 4 enagua estéril y se añadieron 100 µl a las muestras de 1 ml para provocar hemólisis. La absorbancia de las muestras se midió después a una longitud de onda de 546 nm. Para calcular la cantidad de sangre perdida, se leyó la absorbancia frente a una curva patrón generada midiendo la absorbancia a 546 nm de volúmenes conocidos de sangre murina, diluida en PBS y hemolisada como anteriormente con Triton X 100.

### 1. Estudio de respuesta a dosis que evalúa la actividad coagulante de FVIIa de tipo silvestre

- 25 También se realizó un estudio de respuesta a dosis en el que se evaluó FVIIa de tipo silvestre 0,3, 1 o 3 mg/kg. Los ratones que recibieron el vehículo perdieron  $1002,3 \pm 60,71$  µl en el ensayo de 20 minutos. Esto se redujo significativamente en ratones a los que se administraron 3 mg/kg de FVIIa de tipo silvestre, a  $415,5 \pm 90,85$  µl ( $p < 0,05$  usando Kruskal-Wallis seguido de postensayo de Dunn). La reducción de la dosis a 1 mg/kg dio como resultado pérdida de sangre de  $679,57 \pm 83,95$  µl y una dosis menor de 0,3 mg/kg dio como resultado pérdida de sangre de  $852,42 \pm 94,46$  µl.

### 2. Análisis inicial de la actividad coagulante de variante de FVIIa

- 35 Se usó la inyección de solamente vehículo como control. Los ratones que recibieron el vehículo solamente perdieron  $915,2 \pm 105,6$  µl en el ensayo de 20 minutos, que se redujo a  $352 \pm 99,86$  µl (media  $\pm$  E.T.M) si se administró a los ratones FVIIa humano recombinante. La cantidad de sangre perdida se redujo aún más a  $165,8 \pm 48,41$  µl si se administró al ratón Q286R-FVIIa (es decir FVIIa que contiene la mutación Q286R), a  $141,3 \pm 43,77$  µl con Q286R/M298Q-FVIIa o a  $129,5 \pm 36,64$  µl con V158D/E296V/M298Q-FVIIa. Los ratones a los que se administró S222A-FVIIa también mostraron pérdida de sangre reducida (a  $225,7 \pm 62,75$  µl) en comparación con ratones a los que se administró FVIIa de tipo silvestre. La administración de intercambio de Gla FIX-FVIIa, Q366V-FVIIa o A122N/G124S-FVIIa dio como resultado aproximadamente la misma cantidad de pérdida de sangre que la observada en ratones a los que se proporcionó FVIIa humano ( $334,6 \pm 54,95$  µl,  $321,7 \pm 102,6$  µl y  $329,8 \pm 83,91$  µl respectivamente), mientras que los ratones a los que se administró H257A-FVIIa, S222A/Q286R-FVIIa o H257A-FVIIa parecían tener una pérdida de sangre ligeramente mayor ( $390 \pm 107$  µl,  $447,3 \pm 127,7$  µl y  $443,7 \pm 139,5$  µl respectivamente).

### 3. Respuesta a dosis que evalúa la actividad coagulante de variante de FVIIa

- 50 Un estudio de respuesta a dosis en el que se administró a los ratones 0,1, 0,3, 1 o 3 mg/kg de Q286R-FVIIa, S222A-FVIIa, Q286R/M298Q-FVIIa o V158D/E296V/M298Q-FVIIa. Los ratones que recibieron el vehículo solamente perdieron  $915,2 \pm 105,6$  µl de sangre en el ensayo de 20 minutos. Esto se redujo significativamente en ratones a los que se administraron 3 mg/kg de cualquiera de Q286R-FVIIa ( $141,3 \pm 43,77$  µl), S222A-FVIIa ( $225,7 \pm 62,75$  µl) o Q286R/M298Q-FVIIa ( $129,5 \pm 36,64$  µl) ( $p < 0,05$  usando Kruskal-Wallis seguido de postensayo de Dunn). La reducción de la dosis a 1 mg/kg dio como resultado pérdida de sangre de  $641 \pm 96,48$  µl en ratones que recibieron Q286R-FVIIa y  $487,92 \pm 92,07$  µl en ratones que recibieron S222A-FVIIa. Dosis menores de esta variante de FVIIa dieron como resultado aproximadamente la misma pérdida de sangre ( $817,71 \pm 107,94$  µl y  $900,34 \pm 115,77$  µl para Q286R-FVIIa y S222A-FVIIa respectivamente) como se observó en ratones que recibieron el control de vehículo. Por el contrario, los ratones que recibieron Q286R/M298Q-FVIIa 1 mg/kg tuvieron una pérdida de sangre significativamente reducida ( $69,36 \pm 15,55$  µl) en comparación con los ratones de control solo de vehículo. A dosis menores de 0,3 mg/kg y 0,1 mg/kg, la pérdida de sangre fue de  $538,3 \pm 94,04$  µl y  $664 \pm 121,6$  µl, respectivamente. Los ratones que recibieron 0,3, 1 y 3 mg/kg de V158D/E296V/M298Q-FVIIa tuvieron una pérdida de sangre de  $754,49 \pm 121,6$  µl,  $481,95 \pm 114,22$  µl y  $133,25 \pm 50,09$  µl respectivamente.

Se llevaron a cabo estudios de respuesta a dosis adicionales para Q286R-FVIIa, Q286R/M298Q-FVIIa y V158D/E296V/M298Q-FVIIa y los datos se combinaron con los anteriores. En los experimentos que evalúan el efecto de Q286R-FVIIa, el grupo que recibió el vehículo perdió  $833,61 \pm 73,95 \mu\text{l}$  de sangre. Esto se redujo significativamente a  $196,71 \pm 49,18 \mu\text{l}$  en ratones que se trataron con 3 mg/kg de Q286R-FVIIa. La reducción de la dosis a 1 mg/kg dio como resultado pérdida de sangre de  $577,78 \pm 66,29 \mu\text{l}$ . Cuando se dosificó a los ratones 0,1 y 0,3 mg/kg de Q286R-FVIIa la pérdida de sangre producida fue similar al valor de control de vehículo ( $739,58 \pm 104,28 \mu\text{l}$  y  $806,63 \pm 65,17 \mu\text{l}$ , respectivamente). En los experimentos que evalúan el efecto de Q286R/M298Q-FVIIa, el grupo de vehículo produjo pérdida de sangre de  $902,42 \pm 88,04 \mu\text{l}$ , lo que se redujo significativamente por el tratamiento tanto con 1 como 3 mg/kg de Q286R/M298Q-FVIIa a  $145,17 \pm 38,89 \mu\text{l}$  y  $140,76 \pm 33,36 \mu\text{l}$  de pérdida de sangre. La reducción de la dosis a 0,1 y 0,3 mg/kg dio como resultado valores de pérdida de sangre de  $664,03 \pm 121,62 \mu\text{l}$  y  $551,94 \pm 67,60 \mu\text{l}$  respectivamente. En los experimentos que evalúan V158D/E296V/M298Q-FVIIa el grupo de control de vehículo demostró pérdida de sangre de  $966,64 \pm 57,97 \mu\text{l}$ , que se redujo significativamente por el tratamiento con V158D/E296V/M298Q-FVIIa a 3 mg/kg a  $128,19 \pm 27,73 \mu\text{l}$ . La reducción de la dosis a 1 mg/kg condujo a pérdida de sangre de  $565,50 \pm 65,78 \mu\text{l}$  y la reducción de la dosis adicionalmente a 0,3 y 0,1 mg/kg produjo pérdida de sangre que fue similar al grupo de control ( $811,16 \pm 71,87 \mu\text{l}$  y  $893,62 \pm 106,73 \mu\text{l}$ ). Se realizó análisis estadístico por Kruskal Wallis seguido de postensayo de Dunn y se aceptó la significación cuando  $p < 0,05$ .

#### 4. Actividad coagulante de H216A-FVIIa, H373F-FVIIa, Q366D-FVIIa y Q366N-FVIIa a una dosis de 3 mg/kg.

Un conjunto de experimentos ensayó H216A-FVIIa, H373F-FVIIa, Q366D-FVIIa y Q366N-FVIIa a una dosis de 3 mg/kg. La inyección solamente de vehículo se usó como un control. Los ratones que recibieron el vehículo perdieron  $915,2 \pm 105,6 \mu\text{l}$  en el ensayo de 20 minutos. Esto se redujo adicionalmente hasta  $211,1 \pm 67,70 \mu\text{l}$  si los ratones se trataron con H373F-FVIIa. La pérdida de sangre se vio menos afectada tras el tratamiento con H216A-FVIIa, Q366D-FVIIa y Q366N-FVIIa, con valores de  $558,6 \pm 66,22$ ,  $577,1 \pm 151,4$  y  $477,1 \pm 112,6 \mu\text{l}$  respectivamente.

#### 4. Actividad coagulante de Q286R/M298Q/intercambio de Gla FIX-FVIIa, S222A/H257A/Q286R/M158Q-FVIIa, Q286R/M298Q/K341D-FVIIa y Q286R/M298Q/H373F-FVIIa a una dosis de 3 mg/kg.

La actividad coagulante de Q286R/M298Q/intercambio de Gla FIX-FVIIa, S222A/H257A/Q286R/M158Q-FVIIa, Q286R/M298Q/K341 D-FVIIa y Q286R/M298Q/H373F-FVIIa a una dosis de 3 mg/kg se evaluó en el modelo de ratón de hemofilia CD-1. Se usó la inyección solo de vehículo como un control. Los ratones que recibieron el vehículo perdieron  $803 \pm 92,18 \mu\text{l}$  en el ensayo de 20 minutos. Esto se redujo por tratamiento con S222A/H257A/Q286R/M158Q-FVIIa hasta  $118,6 \pm 63,27 \mu\text{l}$ . El tratamiento con Q286R/M298Q/intercambio de Gla FIX-FVIIa a 3 mg/kg redujo la pérdida de sangre en comparación con el grupo de vehículo de  $888,89 \pm 104,76 \mu\text{l}$  a  $171,83 \pm 62,06 \mu\text{l}$ . En los experimentos que evalúan Q286R/M298Q/K341D-FVIIa y Q286R/M298Q/H373F-FVIIa la pérdida de sangre del grupo de vehículo fue  $813,1 \pm 82,66 \mu\text{l}$ . Esto se redujo a  $39,42 \pm 5,53 \mu\text{l}$  de pérdida de sangre después del tratamiento con Q286R/M298Q/H373F-FVIIa. Q286R/M298Q/K341D-FVIIa parecía ser menos eficaz en el ensayo, dando como resultado pérdida de sangre de  $636,7 \pm 121,6 \mu\text{l}$ .

#### 5. Estudio de respuesta a dosis para evaluar la actividad coagulante de S222A/H257A/Q286R/M158Q-FVIIa y Q286R/M298Q/H373F-FVIIa

Se evaluó la respuesta a dosis a S222A/H257A/Q286R/M158Q-FVIIa a 0,3, 0,5, 1 y 3 mg/kg. Los ratones que recibieron el vehículo perdieron  $832,48 \pm 71,70 \mu\text{l}$  en el ensayo de 20 minutos. Esto se redujo significativamente en ratones a los que se administraron 3 mg/kg de S222A/H257A/Q286R/M158Q-FVIIa, hasta  $118,63 \pm 63,27 \mu\text{l}$  ( $p < 0,05$  usando Kruskal-Wallis seguido de postensayo de Dunn). La reducción de la dosis a 1 y 0,5 mg/kg dio como resultado una reducción significativa en la pérdida de sangre ( $202,69 \pm 77,60 \mu\text{l}$  y  $366,52 \pm 106,21 \mu\text{l}$ ) y una dosis menor de 0,3 mg/kg dio como resultado pérdida de sangre en comparación con más con niveles de vehículo ( $742,04 \pm 112 \mu\text{l}$ ). También se evaluó una respuesta a dosis de Q286R/M298Q/H373F-FVIIa a 0,1, 0,3, 1 y 3 mg/kg y en este experimento los ratones que recibieron el vehículo tuvieron una pérdida de sangre de  $813,15 \pm 82,66 \mu\text{l}$ . Esto se redujo significativamente en ratones que se trataron con 3 mg/kg de Q286R/M298Q/H373F-FVIIa, hasta  $39,42 \pm 5,52 \mu\text{l}$  ( $p < 0,05$  usando Kruskal-Wallis seguido de postensayo de Dunn). La reducción de la dosis a 1 y 0,3 mg/kg condujo a valores de pérdida de sangre de  $208,10 \pm 105,12$  y  $508,9 \pm 155,8 \mu\text{l}$  respectivamente. La dosis menor ensayada de 0,1 mg/kg produjo pérdida de sangre que se acercaba a los niveles de control de vehículo ( $733,5 \pm 152,88 \mu\text{l}$ ).

#### C. Análisis de actividad coagulante de FVIIa en ratones FVIII<sup>-/-</sup>

También se usó un modelo de ratón de hemofilia A usando ratones deficientes en FVIII (ratones FVIII<sup>-/-</sup>) para evaluar la actividad coagulante de polipéptidos de FVIIa, usando los mismos protocolos que se han descrito anteriormente excepto que los ratones no se trataron con anticuerpos anti FVIII.

### 1. Estudio de respuesta a dosis que evalúa la actividad coagulante de FVIIa de tipo silvestre

Se realizaron estudios de respuesta a dosis para evaluar la actividad coagulante de NovoSeven® y rhFVIIa de tipo silvestre en ratones FVIII<sup>-/-</sup> a 0,3, 1, 3 y 6 mg/kg. En el experimento de NovoSeven®, la pérdida de sangre en el grupo de vehículo fue de  $912,79 \pm 38,32 \mu\text{l}$ , lo que se redujo significativamente por tratamiento con NovoSeven® a 6 y 3 mg/kg (hasta  $361,74 \pm 55,28 \mu\text{l}$  y  $586,98 \pm 60,56 \mu\text{l}$ ;  $p < 0,05$  usando Kruskal-Wallis seguido de postensayo de Dunn). La reducción de la dosis a 1 mg/kg dio como resultado pérdida de sangre de  $674,84 \pm 46,88 \mu\text{l}$  y a la dosis menor ensayada el valor fue de  $801,08 \pm 41,39 \mu\text{l}$ . En el experimento de rhFVIIa de tipo silvestre, el grupo de control de vehículo produjo pérdida de sangre de  $904,08 \pm 15,38 \mu\text{l}$ . Esto se redujo significativamente ( $p < 0,05$  usando Kruskal-Wallis seguido de postensayo de Dunn) por rhFVIIa de tipo silvestre a 6 mg/kg hasta  $451,04 \pm 74,17 \mu\text{l}$ . La reducción de la dosis a 3 mg/kg produjo un valor de pérdida de sangre de  $695,75 \pm 60,50 \mu\text{l}$  reduciendo al mismo tiempo la dosis adicionalmente hasta 1 y 0,3 mg/kg dio como resultado valores de pérdida de sangre cercanos a y a los niveles de control de vehículo ( $846,08 \pm 34,17 \mu\text{l}$  y  $936,43 \pm 31,39 \mu\text{l}$ , respectivamente).

### 2. La respuesta a dosis que evalúa la actividad coagulante de Q143R-FVIIa, S222A-FVIIa, Q286R/M298Q-FVIIa y V158D/E296V/M298Q-FVIIa

El primer conjunto de experimentos ensayaron FVIIa humano recombinante (NovoSeven®, Novo Nordisk), V158D/E296V/M298Q-FVIIa, Q286R-FVIIa y S222A-FVIIa a 3 mg/kg. La inyección solamente de vehículo se usó como un control. Los ratones que recibieron el vehículo tuvieron solamente pérdida de sangre de  $942,9 \pm 27,37 \mu\text{l}$  en el ensayo de 20 minutos. El tratamiento con NovoSeven® FVII, V158D/E296V/M298Q-FVIIa, Q143R-FVIIa y S222A-FVIIa redujo la pérdida de sangre hasta  $468 \pm 55,9 \mu\text{l}$ ,  $302,38 \pm 73,12 \mu\text{l}$ ,  $697,26 \pm 92,22 \mu\text{l}$  y  $675,07 \pm 35,29 \mu\text{l}$  respectivamente. Q143R-FVIIa, cuando se ensayó de nuevo en ratones FVIII<sup>-/-</sup> a 3 mg/kg, demostró una pérdida de sangre reducida de  $754,84 \pm 60,96 \mu\text{l}$  en comparación con el grupo de control de vehículo ( $935,54 \pm 51,96 \mu\text{l}$ ). Cuando se evaluó a 5 mg/kg, Q143R-FVIIa produjo una reducción adicional en la pérdida de sangre hasta  $445,87 \pm 79,62 \mu\text{l}$  en comparación con el grupo de control de vehículo ( $960,42 \pm 24,5 \mu\text{l}$ ).

Los segundos conjuntos de experimentos fueron estudios de respuesta a dosis en los que se evaluaron V158D/E296V/M298Q-FVIIa y Q286R/M298Q-FVIIa a 0,3, 1 y 3 mg/kg. El tratamiento con V158D/E296V/M298Q-FVIIa a 3 mg/kg dio como resultado una reducción significativa de pérdida de sangre ( $375,62 \pm 74,22 \mu\text{l}$ ) en comparación con el control de vehículo ( $960,42 \pm 24,5 \mu\text{l}$ ;  $p < 0,05$  usando Kruskal-Wallis seguido de postensayo de Dunn). La reducción de la dosis a 1 y 0,3 mg/kg condujo a valores de pérdida de sangre más cercanos a los niveles de control, de  $834,76 \pm 54,38 \mu\text{l}$  y  $841,62 \pm 68,99 \mu\text{l}$  respectivamente. Un segundo experimento que evaluó un lote diferente de V158D/E296V/M298Q-FVIIa produjo un valor de pérdida de sangre de control de vehículo de  $912,79 \pm 38,32 \mu\text{l}$ , que se inhibió significativamente a 3 y 1 mg/kg ( $247,24 \pm 35,17 \mu\text{l}$  y  $628,30 \pm 37,36 \mu\text{l}$ ;  $p < 0,05$  usando Kruskal-Wallis seguido de postensayo de Dunn). El tratamiento con una dosis menor de V158D/E296V/M298Q-FVIIa produjo pérdida de sangre que se acercaba a los valores de control ( $841,85 \pm 19,32 \mu\text{l}$ ). En el experimento que evaluó el efecto de Q286R/M298Q-FVIIa en ratones FVIII<sup>-/-</sup>, el grupo de vehículo produjo pérdida de sangre de  $941,39 \pm 35,18 \mu\text{l}$ . Esto se inhibió significativamente a una dosis de 3 mg/kg, dando como resultado pérdida de sangre de  $258,92 \pm 59,82 \mu\text{l}$ . A dosis menores de 1 y 0,3 mg/kg los niveles de pérdida de sangre producidos fueron de  $616,82 \pm 78,43 \mu\text{l}$  y  $924,9 \pm 38,01 \mu\text{l}$ , respectivamente.

### D. Análisis de la actividad coagulante de variantes de FVIIa adicionales en el uso del modelo de hemofilia inducida

La actividad coagulante de varias variantes de FVIIa se evaluó usando el Modelo de Hemofilia Inducida (MHI) con ratones CD-1 descrito en el Ejemplo 6.B, anterior. El protocolo fue igual que el descrito anteriormente, excepto por la evaluación de la variante de FVIIa T128N/P129A y la variante de FVIIa M156Q/H224F, en la que se usaron lotes diferentes (tercero y cuarto, respectivamente) de anti FVIII humano. Para el tercer lote de anti FVIII humano (lote 3; Affinity Biologicals, lote IG1603R1, actividad neutralizante de 418 UB de ratón/ml) la dosis usada fue de 12,17 mg/ratón ( $120 \mu\text{l}$  de una solución de reserva de 101,4 mg/ml), que se administró a las 18 horas antes del corte de la cola. Para el cuarto lote de anti FVIII humano (lote 4; Affinity Biologicals, lote IG1639R1, actividad neutralizante de 875 UB de ratón/ml) la dosis usada fue de 8,04 mg/ratón ( $80 \mu\text{l}$  de una solución de reserva 100,45 mg/ml). La pérdida de sangre se midió como se ha descrito anteriormente, y se presenta posteriormente en la Tabla 19 como el porcentaje de inhibición (calculado usando los valores promedio para la variante de interés y dividiendo por el grupo de vehículo), y el valor de DE50 determinado usando análisis de regresión no lineal (usando software GraphPad Prism®, GraphPad Software, Inc.), que restringe la parte superior e inferior de la curva de respuesta a la pérdida de sangre observada con animales de control tratados con vehículo y normales, respectivamente.

Tabla 19.

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Pérdida de Sangre de MHI; % de Inhibición (1,5 mg/kg)	n	Pérdida de Sangre por MHI; DE50 (mg/kg)	n
WT (NovoSeven®)	WT (NovoSeven®)	61	1	0,7	1
WT	WT	59	1	0,75	1
T128N/P129A	T[128]N1P[129]A	78	1	0,5	1
Intercambio de Gla FIX	Intercambio de Gla FIX	63	1		
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	64	1		
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	86	3	0,5	3
Q286R	Q143R	76	2	0,55	2
S222A	S82A	75	1	0,45	1
H257S	H117S	50	1		
H373F	H224F	78	1		
Q366V	Q217V	64	1		
A175S	A39S	58	1		
K109N/A175S	K[109]N/A39S	60	1		
Q286R/H257A	Q143R/H117A	58	1		
Q286R/S222A	Q143R/S82A	50	1		
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	68	1		
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	85	2	0,15	2
Q286R/M298Q †	Q143R/M156Q †	89	1	0,16	2
Intercambio de Gla FIX/ Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/ Q143R/M156Q	83	2	0,13	1
S222A/H257A/Q286R/ M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	85	1	0,2	1
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	46	1		
S222A/H257A/Q286R/ Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	49	1		
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	88	1		
Q286R/H373F	Q143R/H224F	75	1		
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	95	1	0,15	1
M298Q/H373F	M156Q/H224F	95	1	0,21	1
Intercambio de Gla FIX/S222A/Q286R	Intercambio de Gla F1X/S82A/Q143R	85	1	0,4	1
V158D/Q286R/E296V/ M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	95	1		
T128N/P129A/Q286R/ H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H2 24F/	70	1		

† polipéptido de FVIIa producido a partir de células CHOx

#### E. Análisis de la actividad coagulante de variantes de FVIIa adicionales en el uso del modelo de hemofilia inducida

5

La actividad coagulante de varias variantes de FVIIa se evaluó usando el Modelo de Hemofilia Inducida (MHI) con ratones CD-1 descrito en el Ejemplo 6.B, anterior. El protocolo fue igual que el descrito anteriormente, excepto que para estos experimentos se usaron los lotes 4 a 6 de anti FVIII. Los detalles de estos lotes fueron los siguientes: lote 4 (detallado anteriormente), para el quinto lote (lote 5; Affinity Biologicals, lote IGI593R2, actividad neutralizante de



255 UB de ratón/ml) la dosis usada fue de 12,25 mg/ratón (120 µl de una solución de reserva 102,1 mg/ml), que se administró a las 6 horas antes del corte de la cola. Para el sexto lote (lote 6; Affinity Biologicals, lote IG1703R2, actividad neutralizante de 685 UB de ratón/ml) la dosis usada fue de 8,02 mg/ratón (80 µl de una solución de reserva 100,2 mg/ml), que se administró a las 4 de la tarde el día antes del experimento. La pérdida de sangre se midió como se ha descrito anteriormente, y se presenta a continuación en la Tabla 20 como el porcentaje de inhibición (calculado usando los valores promedio para la variante de interés y dividiendo por el grupo de vehículo), en cada caso todas las dosis se muestran con los valores de inhibición correspondientes debajo, y el valor de DE50 determinado usando análisis de regresión no lineal (usando software GraphPad Prism®, GraphPad Software, Inc.), restringiendo la parte superior e inferior de la curva de respuesta con la pérdida de sangre observada con animales de control tratados con vehículo y normales, respectivamente. El “n/grupo” se refiere a la cantidad de ratones por grupo mientras que la “n” en referencia al cálculo de DE50 se refiere a la cantidad de experimentos realizada con la variante.

Tabla 20

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Pérdida de sangre por IHM; % de inhibición a cada dosis (mg/kg)			n/ grupo	Pérdida de sangre por IHM; DE50 (mg/kg)	n
		Dosis (mg/kg)					
		0,1	0,3	1			
H257A/Q286R	H117A/Q143R			53	7-10		
M298Q	M156Q	37	81	87	7-10	0,11	1
M298Q/T128N/P129A	M156Q/T128N/P129A	39	79	93	7-9	0,1	1
Q286R/T128N/P129A	Q143R/T128N/P129A	32	42	58	6-8	0,27	1
Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/S222A/Q286R	Intercambio de GlaFIX/T128N/P129A/S82A/Q143R	27	45	62	6-8	0,27	
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	33	57	89	9-10	0,15	1
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	35	57	94	8-10	0,13	1
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	32	62	95	8-9	0,14	1
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	44	65	95	9	0,09	1
Intercambio de Gla FIX/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/Q143R/M156Q	35,	57	80	7-10	0,14	1
T128N/P129A/Q286R/M298Q	T128N/P129A/Q143R/M156Q	47,	83	91	9-14	0,1	1
Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/Q143R/M156Q	15	71	96	7-9	0,17	1
Intercambio de GlaFIX/K43I/Q286R/M298Q	{Intercambio de GlaFIX/K[43I]/Q143R/M156Q	49	65	80	7-9	0,08	1
Intercambio de GlaFIX/S52A/S60A/Q286R/M298Q/	Intercambio de GlaFIX/S[52]/A/S[60]/A/Q143R/M156Q/	38	71	88 †	9-10	0,11	1
Intercambio de GlaFIX/K43I/T128N/P129A/Q286R/M298Q	{Intercambio de GlaFIX/K[43I]/T128N/P129A/Q143R/M156Q	23	58	84	9	0,17	1

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Pérdida de sangre por IHM: % de inhibición a cada dosis (mg/kg)		n/ grupo	Pérdida de sangre por IHM; DE50 (mg/kg)	n
		0,1	0,3			
S222A/H257A/Q286R/M298Q /T128N/P129A	S82A/H117A/Q143R/M156Q/ T128N/P129A	24	71	96	0,15	1
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	41	79	96	0,1	1
T128N/P129A/ Q286R/M298Q/Q366N	T128N/P129A/Q143R/M156Q/Q217N	40	53	84	0,09	1
{Intercambio de GlaFIX/K43I}/T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N	{Intercambio de GlaFIX/K43I}/T128N/P129A/Q143R/M156Q/Q217N	39	81	94	0,1	1
T128N/P129A/Q286R/H373F	T128N/P129A/Q143R/H224F	26				
T128N/P129A/Q286R/M298Q / H373F	T128N/P129A/Q143R/M156Q/H224F	43	42	87	0,12	1
M298Q/H373F	M156Q/H224F	27	46	82	0,21	1
T128N/P129A/M298Q/N373F	T128N/P129A/M156Q/ H224F	48	77	85	0,09	1
V158D/E296V/M298Q/Q286R	V21D/E154V/M156Q/Q143R	27	61	95	0,16	1
Intercambio de GlaFIX/S222A/Q286R/ T239V	Intercambio de GlaFIX/S82A/Q143R/T99V	30	32	60	0,36	1
Q286R/M298Q/T239V	Q143R/M156Q/T99V	21	67	92	0,16	1
Intercambio de GlaFIX/Q286R/M298Q/ T239V	Intercambio de GlaFIX/Q143R/M156Q/T99V	16	69	90	0,17	1
T128N/P129A/T239V/ Q286R/M298Q	T128N/P129A/T99V/Q143R/M156Q/	29	63	91	0,15	1
S222A/T239V/H257A /Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q/	38	63	94	0,12	1
T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/Q286R/ M298Q	T128N/P129A/S82A/T99V/H117A/Q143 R/M156Q	44	75	79	0,09	1
T128N/P129A/T39V/Q286R/M298Q/H373F	T128N/P129A/T99V/Q143R/M156Q/H22 4F	51	75	88	0,08	1
V158D/T239/E296V/M298Q	V21D/T99/E154V/M156Q	45	48	85	0,11	1

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Pérdida de sangre por IHM; % de inhibición a cada dosis (mg/kg)		n/ grupo	Pérdida de sangre por IHM; DE50 (mg/kg)	n
		0,1	0,3			
T128N/P129A/ T239I/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/T99I/ Q143R/M156Q	20	61	8-10	0,18	1
V158D/C139V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	23	52	8-9	0,19	1
T128N/P129A/T239I/ Q286R/M298Q/H373F/	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M156Q/H224	36	67	8-10	0,11	1
M298Q/Q366N/H373F	M156Q/Q217N/H224F	33	80	8-10	0,11	1
T239V/M298Q/H373F	T99V/M156Q/H224F	50	68	7-9	0,07	1
T239I/M298Q/H373F	T99I/M156Q/H224F	56	74	9-10	0,07	1
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N/H2	51	87	7-9	0,1	1
T239V/Q286R/M298Q/Q366N	T99V/Q143R/M156Q/Q217N	45	62	7-9	0,08	1
T239I/Q286R/M298Q/Q366N	T99I/Q143R/M156Q/Q217N	8	34	8-9	0,34	1
T la dosis fue de 0,6 mg/kg						

**Ejemplo 7****Determinación de la constante cinética de Michaelis Menten de la actividad amidolítica de FVIIa en un sustrato de moléculas pequeñas**

5 La actividad amidolítica de las variantes de FVII puede evaluarse midiendo la constante cinética de Michaelis Menten del polipéptido de FVIIa en el sustrato de peptidilo Spectrozyme FVIIa ( $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-D-CHA-But-Arg-pNA.AcOH}$ ). Dicho ensayo puede realizarse de la siguiente manera.

10 Se incluye factor tisular purificado humano lipidado (Innovin, Dade Behring, VWR Cat nº 68100-390) en el ensayo para proporcionar actividad óptima de FVIIa. El complejo de FT-FVIIa escinde Spectrozyme FVIIa como un sustrato cromogénico altamente específico que libera un cromóforo de paranitroanilina (pNA), que puede controlarse midiendo la absorción a 405 nm. La actividad enzimática se determina controlando la absorbancia a 405 nm del pNA libre generado en función del tiempo.

15 Las reacciones se realizan a tres concentraciones de enzima diferentes. Para la reacción, las variantes de FVIIa se diluyen en primer lugar a 40 nM en tampón de ensayo directo 1x (Tris 100 mM pH 8,4, NaCl 100 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, BSA 0,01 %) en un tubo de 1,7 ml (tubos de microcentrifuga de adhesión baja de ISC Bioexpress). Se diluyó adicionalmente FVIIa en presencia de FT (Innovin, Dade Behring) diluyendo a 2 nM en un depósito de polipropileno de 12 pocillos (Axygen) de la siguiente manera: 720  $\mu\text{l}$  de tampón directo 5x (Tris 500 mM pH 8,4, NaCl 500 mM,  $\text{CaCl}_2$  25 mM, BSA 0,05 %), 180  $\mu\text{l}$  de FVIIa 40 nM y 2700  $\mu\text{l}$  de FT 2x (solución de reserva 6 nM reconstituida en 10 ml de agua). La proteasa diluida se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reserva de FVIIa 2 nM se diluye adicionalmente en diluciones en serie dobles para proporcionar una reserva de proteasa 1 nM y 0,5 nM, respectivamente, también en presencia de FT. Las reacciones de dilución en serie son las siguientes: en primer lugar, 1800  $\mu\text{l}$  de reserva 2 nM de FVIIa/FT a partir de la anterior diluida en 360  $\mu\text{l}$  de tampón directo 5x, 900  $\mu\text{l}$  de FT 2x y 540  $\mu\text{l}$  de agua. Esta reserva diluida de diluye de nuevo 1:1 en 1800  $\mu\text{l}$  de FT 1x en tampón directo.

30 Se realiza una placa de dilución del sustrato Spectrozyme FVIIa (American Diagnostica). La solución de reserva de Spectrozyme FVIIa se realiza por reconstitución del vial de 50  $\mu\text{moles}$  en agua destilada hasta 10 mM y se almacena a 4 °C. Se añaden 80  $\mu\text{l}$  (Spectrozyme FVIIa 10 mM) y 60  $\mu\text{l}$  + 20  $\mu\text{l}$  de agua (Spectrozyme FVIIa 7,5 mM) del Spectrozyme FVIIa 10 mM a pocillos en dos columnas adyacentes de una placa de ensayo de polipropileno de 96 pocillos (Costar). Los dos pocillos se diluyen en serie 2 veces por cada uno de los 8 pocillos de la columna respectiva para componer una serie de concentraciones de sustrato 10x que varían del sustrato 10 mM a 78  $\mu\text{M}$  bajando por los pocillos de la primera columna y de sustrato 7,5 mM a 58,6  $\mu\text{M}$  bajando por los pocillos de la segunda columna.

40 Se añaden cinco  $\mu\text{l}$  de cada dilución de sustrato de Spectrozyme FVIIa a una placa de ensayo de media área transparente de 96 pocillos (Costar). Se añaden cuarenta y cinco  $\mu\text{l}$  de cada una de las tres diluciones de FVIIa/FT a tres grupos de columnas de las diluciones en serie de sustrato. Durante esta etapa, se tiene cuidado de evitar introducir burbujas en los pocillos del ensayo. Si se introducen burbujas, estas pueden retirarse perforando con una aguja limpia antes del comienzo de cada ensayo. Las placas se mezclan después por agitación. Antes del inicio del ensayo, se mide la longitud del trayecto de los pocillos de ensayo usando un espectrofotómetro de lector de placas Spectramax Gemini M5 (Molecular Devices) tomando una lectura de puntos finales y usando la característica Pathcheck del software SoftMax Pro (Molecular Devices). El aumento de la absorbancia a 405 nm se mide cada 30 segundos durante una hora a 37 °C.

50 El software SoftMax Pro se usa para convertir la velocidad de absorbancia (miliunidades/s) a la concentración de pNA liberado ( $\mu\text{M/s}$ ) usando la longitud de trayecto y el coeficiente de extinción del grupo saliente pNA a 405 nM,  $9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La ecuación de conversión es la siguiente: velocidad x (1/60 x 1000) x (1/9600 x Longitud del trayecto) x 100000. Los resultados para cada concentración de proteasa se representan gráficamente usando software Graph Pad Prism con la concentración de sustrato en el eje X y las velocidades  $\mu\text{M/s}$  determinadas en el eje Y. Usando el software Graph Pad Prism 4 se determina  $K_m$  e  $Y_{\text{máx}}$  ajustando los datos a una ecuación de Michaelis Menten de la siguiente manera:

$$55 \quad Y = ((k_{\text{cat}}K_m/1000000) \times X \times [E]) / (1 + (X + K_m))$$

donde: X es la concentración de sustrato ( $\mu\text{M}$ )

Y es la actividad enzimática ( $\mu\text{M/s}$ )

$k_{\text{cat}}K_m$  es la constante de especificidad ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )

60  $K_m$  es la constante de Michaelis ( $\mu\text{M}$ )

E es la concentración de enzima ( $\mu\text{M}$ )

Se establecieron los valores iniciales de  $E=1$ ,  $K_m = X$  a 0,5 x  $Y_{\text{máx}}$  y  $k_{\text{cat}}K_m = 1000$ .

**Ejemplo 8****Evaluación de la potencia de la interacción entre variantes de FVIIa e IRFT**

5 La potencia de interacción entre polipéptidos de FVIIa, tales como los proporcionados en el presente documento, e IRFT, puede evaluarse usando uno o más ensayos. En un ejemplo, la potencia de la interacción entre IRFT y un complejo de FVIIa/FT se evalúa midiendo el nivel de inhibición de diversas concentraciones de IRFT en la actividad catalítica de un FVIIa/FT para un sustrato, Spectrazyme VIIa. En otro ejemplo, puede usarse un ensayo de resonancia de plasmína superficial de alto rendimiento (RPS).

10

**A. Determinación de la  $CI_{50}$  para inhibición por IRFT de FVIIa/FT**

15 La potencia de la interacción entre IRFT y el complejo de FVIIa/FT se evaluó midiendo el nivel de inhibición de diversas concentraciones de IRFT en la actividad catalítica de un FVIIa/FT para un sustrato, Spectrazyme VIIa. La concentración de IRFT que se requería para el 50 % de inhibición ( $CI_{50}$ ) se calculó para cada variante de FVII, y un patrón de FVIIa.

20 Se pretrató una placa de ensayo de media área transparente de 96 pocillos (Nunc) añadiendo 150  $\mu$ l/pocillo de tampón de placa 1 x (Tris 100 mM pH 8,4, NaCl 100 mM, BSA 0,01 %, Tween-20 0,01 %) a cada pocillo e incubando la placa a 37 °C durante un mínimo de 1 hora. El tampón se retiró completamente agitando y transfiriendo la placa y centrifugando la placa boca abajo para retirar el tampón restante. La placa se secó al aire durante 1 hora, y se almacenó a temperatura ambiente (TA).

25 En un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml (tubo de microcentrífuga de adhesión baja de ISC Bioexpress), se preparó una mezcla de FVIIa/FT en un volumen total de 450  $\mu$ l mezclando 9  $\mu$ l de FVIIa 250 nM (American Diagnostica, FVIIa de tipo silvestre o una variante respectiva para ensayar) con 337,5  $\mu$ l de FT 2x (Innovin; Dade Behring; producto liofilizado resuspendido en 10 ml de agua destilada para generar FT 2x, que equivale aproximadamente a 7 nM de FT lipidado), 90  $\mu$ l de tampón de ensayo 5x (Tris 500 mM pH 8,4, NaCl 500 mM,  $CaCl_2$  25 mM, BSA 0,05 %) y 13,5  $\mu$ l de agua, dando como resultado una solución que contiene FVIIa 5 nM y FT 5,2 nM. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir que los componentes formaran complejo. A cada pocillo de 2 columnas en la placa de ensayo de media área transparente de 96 pocillos pretratada, se añadieron 25  $\mu$ l de la mezcla de FVIIa/FTs respectiva y la placa se cubrió para evitar la evaporación.

35 Se disolvió inicialmente IRFT Recombinante Humano (R&D Systems) en 33  $\mu$ l de glicerol al 50 % (v/v) para componer una reserva 10  $\mu$ M para almacenamiento a -20 °C. La reserva de IRFT se diluyó adicionalmente a 1,5  $\mu$ M en un tampón final 1 x (Tris 100 mM pH 8,4, NaCl 100 mM,  $CaCl_2$  5 mM, BSA 0,01 %) en una placa de almacenamiento de polipropileno de la siguiente manera: para cada proteasa ensayada, se prepararon 87,5  $\mu$ l de una solución de IRFT 1,5  $\mu$ M mezclando 13,1  $\mu$ l de IRFT 10  $\mu$ M con 17,5  $\mu$ l de tampón de ensayo 5x y 56,9  $\mu$ l de agua destilada. Se realizaron diluciones triples en serie de la solución de IRFT en tampón de ensayo 1x mezclando 40 27,5  $\mu$ l de IRFT en 55  $\mu$ l de tampón de ensayo 1x, de modo que se generaron soluciones que contenían IRFT 750 nM, 250 nM, 83,3 nM, 27,8 nM, 9,26 nM, 3.1 nM y 1.03 nM. El pocillo final de la serie contenía solamente tampón 1 x como control.

45 Se añadieron veinticinco  $\mu$ l de cada dilución a IRFT a 2 pocillos (es decir en duplicado) de 2 columnas de la placa de ensayo de media área transparente de 96 pocillos que contenía la mezcla de FVIIa/FT, de modo que la mezcla de proteasas se ensayó por duplicado con cada dilución de IRFT. Se añadió también una solución de tampón de ensayo 1x sin IRFT a 2 pocillos que contenían la mezcla de FVIIa/FT como control negativo. La placa se agitó brevemente y después se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos antes de la incubación a 37 °C durante 1,5 horas.

50 Se preparó una solución de reserva de Spectrazyme VIIa (American Diagnostica) reconstituyendo 50  $\mu$ moles en 5 ml de agua destilada a 10 mM y almacenando a 4 °C hasta su uso. Inmediatamente antes de su uso, la solución se diluyó a 600  $\mu$ M en agua destilada. Después de la incubación de la placa de ensayo anterior, se añadieron 10  $\mu$ l del Spectrazyme VIIa diluido a cada pocillo de la placa de ensayo. Las reacciones se mezclaron y la placa se incubó a 37 °C. El aumento de absorbancia a 405 nm se midió cada 30 segundos durante una hora a 37 °C, y se calculó la 55 velocidad de absorbancia usando software SoftMax Pro (Molecular Devices).

60 Para determinar el grado de inhibición por IRFT, las tasas de absorción de reacciones de proteasa que contenían IRFT se dividieron en primer lugar por la velocidad de absorbancia de reacciones que no contenían IRFT (la muestra de control) para obtener la actividad fraccional, y se determinó el  $\log_{10}$  de cada concentración de IRFT. Usando Software GraphPad Prism, se representó gráficamente el  $\log_{10}$  [IRFT] frente a la actividad fraccional para cada proteasa, y se generó una curva de respuesta a dosis con un ajuste de curva que suponía que la parte superior e inferior de los datos de actividad se fijaban a 1 y 0, respectivamente. El software se usó para determinar la inhibición de IRFT tanto como el valor de  $\log$  de  $CI_{50}$  ( $pCI_{50}$ ) como la  $CI_{50}$  absoluta (inhibición de IRFT en nM) para cada proteasa, y se determinó su promedio y desviación típica.

65

El nivel de inhibición de IRFT de cada una de las variantes de FVIIa en complejo con FT lipidado (Innovin; Dade Behring) se determinó y se expresó como el factor de aumento de resistencia a IRFT en comparación con FVIIa de tipo silvestre (Tabla 21).

5

**Tabla 21. Inhibición de las variantes de FVIIa por IRFT**

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Factor de resistencia de IRFT
wt	wt	1,0
A292N/A294S	A150N/A152S	2,4
A175S	A39S	1,5
K109N	K[109]N	0,7
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	1,1
A122N/G124S/E394N/P395A/R396S	A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/ R247S	1,0

**B. Exploración de resonancia de plasmón superficial (RPS) de variantes de FVIIa con respecto a resistencia a IRFT**

10 La resistencia relativa de diversas variantes de FVIIa a la inhibición por IRFT soluble recombinante humano se evaluó usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial (RPS) de alto rendimiento con el instrumento Biacore T100. La resistencia relativa de variantes de FVIIa a la inhibición por IRFT se evaluó por la medición de la cantidad relativa de variante de FVIIa unida con IRFT soluble inmovilizada en una microplaca sensora CM5 de Biacore en comparación con la cantidad de FVIIa de tipo silvestre unido después de un tiempo de inyección y una  
15 concentración de proteasa normalizados.

Para cada experimento, se inmovilizó IRFT soluble (R&D Systems) en una nueva microplaca sensora CM5 Serie S de Biacore de 4 celdas de flujo (GE Healthcare) usando el protocolo de acoplamiento de amina disponible dentro del Software de control Biacore T-100 (GE Healthcare) y los reactivos proporcionados con el Kit de Acoplamiento de Amina (GE Healthcare). Las cuatro células de flujo disponibles se utilizaron para inmovilización de dos densidades diferentes de IRFT y albúmina de suero bovino (BSA), que actuó como un agente de bloqueo en las células de referencia. BSA se diluyó a 5 µg/ml en acetato sódico (pH 4,0) y se inmovilizó en las celdas de flujo 1 y 3 a 1000 y 2000 unidades de respuesta (UR), respectivamente. Para inmovilización de IRFT, se resuspendió IRFT soluble liofilizado (10 µg) en 100 µl de tampón de acoplamiento 1x (Hepes 30 mM, NaCl 135 mM, EDTA 1 mM, Tween-20  
20 0,01 %, pH 7,4) hasta una concentración de 0,1 mg/ml. Un total de 20 µl de IRFT 0,1 mg/ml se diluyó hasta 10 µg/ml en acetato sódico pH 4,0 para inmovilización en celdas de flujo 2 y 4 a 1000 y 2000 UR, respectivamente. Se usó tampón de acoplamiento como el tampón de ejecución durante las etapas de inmovilización.

Cada muestra de FVIIa se preparó a una concentración final de 320 nM en Tampón de Ejecución 1X (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, PEG 8000 0,1 %, BSA 0,1 %, Tween-20 0,01 %, pH 7,4) que contenía FTs 620 nM (Factor de Coagulación Humana III; R&D Systems). Generalmente, cada variante de FVIIa se diluyó 10 veces en Tampón de Ejecución 1x antes de la dilución final de 320 nM. Se prepararon complejos de FVIIa/FTs a un volumen final de 120 µl por duplicado permitiendo que se cargaran hasta 48 variantes de FVIIa únicas en una placa de almacenamiento de 96 pocillos y se evaluó con inyecciones por duplicado en una única ejecución. El complejo de FVIIa/FTs se incubó a TA durante 10-15 minutos antes del inicio de la primera inyección de muestra.  
35

Se creó un método de análisis de unión normalizado dentro del Software Biacore Control (GE Healthcare) en el que cada repetición de FVIIa se inyecta durante 180 segundos de tiempo de asociación seguido de solamente 60 segundos de disociación a un caudal de 10 µl/minuto. La regeneración de la microplaca sensora siguió a la fase de disociación durante 30 segundos con glicina 10 mM, NaCl 500 mM, pH 3,0 y después un periodo de estabilización de 60 segundos con Tampón de Ejecución 1x al mismo caudal de 10 µl/minuto. Se registraron dos puntos de referencia de ensayo para cada ejecución y análisis de datos posterior, unos 5 segundos antes de la conclusión de la fase de asociación (unión) y un segundo presentado 5 segundos antes de la conclusión de la fase de disociación (disociación). Antes de iniciar un ensayo completo, la microplaca sensora se ensayó con una única inyección de FVIIa de tipo silvestre/FTs 320 nM durante 180 segundos, que debería dar una respuesta de aproximadamente 400-450 UR y 750-850 UR para unión con celdas de flujo 2 (1000 UR) y 4 (200 UR), respectivamente.  
45

Se realizó análisis de datos en primer lugar con el Software de Evaluación Biacore T100 (GE Healthcare) para inspeccionar los parámetros de validación de ensayo, que incluyen verificar que la unión con la célula de referencia es mínima, la deriva de línea basal y la unión de inyecciones de blanco de control (tampón de ejecución). Se generaron tablas de datos dentro de esta aplicación que indicaban la cantidad de variante de FVIIa unida (en UR) tanto en el punto de indicación de unión como en el punto de indicación de disociación. Las tablas de datos se exportaron posteriormente para análisis adicional dentro del ambiente de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Los  
50

puntos de datos sin procesar (UR unido) se corrigieron con respecto a unión de control con la microplaca sensora y después se tomó una relación de la cantidad de FVIIa de tipo silvestre unido (en UR) en relación con la cantidad de variante de FVIIa unida (en UR) para cada parámetro y se presentó como unión (wt/variante) y disociación (wt/variante). La Tabla 22 presenta los resultados del estudio. La resistencia a la inhibición por IRFT se refleja como un aumento en la relación para uno o ambos de los parámetros evaluados. Por ejemplo, un valor de unión (wt/variante) o disociación (wt/variante) de 20 para una variante de FVIIa en particular indica que esa variante es 20 veces más resistente a la inhibición por IRFT que FVIIa de tipo silvestre. Varias variantes mostraron resistencia aumentada a inhibición por IRFT. Por ejemplo, variantes que contienen la mutación K341-D (numeración de FVII maduro) tales como Q286R/M298Q/K341D-FVIIa, Q286R/K341D-FVIIa y M298Q/K341D-FVIIa, tienen relaciones que indican resistencia significativa a IRFT (mayor de 40-150 veces). En algunos casos, la velocidad de disociación se vio afectada más que la velocidad de asociación.



Tabla 22. Resistencia de variantes de FVIIa a la inhibición por IRFT de Ensayo de Resistencia a IRFT Dependiente de FT

Mutación (Numeración de FVII maduro)	Mutación (Numeración Quimotripsina)	Células 293-F		Células BHK-21	
		Unión variante (wt/ variante)	Disociación variante (wt/ variante)	Unión variante (wt/ variante)	Disociación (wt/ variante)
WT	WT	1,0	1,0	1,0	1,0
Q286R	Q143R	2,2	1,9	3,7	3,4
A292N/A294S	A150N/A152S	2,6	2,2		
A175S	A39S	1,6	1,4		
K109N	K[109]N	0,8	0,7		
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	1,2	1,1		
A122N/G124S/ E394N/P395A/R396S	A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/R247S	1,1	1,0		
S119N/L121S	S[119]N/L[121]S			1,2	1,3
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A			1,1	1,2
Q286R/S222A/ Intercambio de Gla FIX	Q143R/S82A/Intercambio de Gla FIX	1,9	1,7		
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q			2,0	1,8
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q	3,1	3,5	3,0	3,5
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE	4,6	4,1	2,4	2,1
T239V	T99V	1,4	1,4	1,1	1,1
H257A/M298Q	H117A/M156Q			2,4	2,7
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q			1,6	1,4
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	4,2	3,5	3,5	2,9
K109N/A175S	K[109]N/A39S			3,4	3,2

Mutación (Numeración de FVII maduro)	Mutación (Numeración Quimotripsina)	de Ensayo de Resistencia a IRFT Dependiente de FT					
		Células 293-F			Células BHK-21		
		Unión variante	(wt/ variante)	Disociación variante	Unión variante	(wt/ variante)	Disociación (wt/ variante)
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V				1,2	1,2	
Q366I	Q217I	0,6		0,5			
K197E/M298Q	K60aE/M156Q	2,6		2,3			
Q286R/M298Q/K341D	Q143R/M156Q/K192D	33,6		182,3			
Q286R/K341D	Q143R/K192D	29,8		281,8			
M298Q/K341D	M156Q/K192D	146,8		196,5			
S119N/L121S/A175S	S[119]N/[L121]S/A39S	2,8		2,7			
T128N/P129A/A175S	T[128]N/[P129]A/A39S	2,7		2,6			
A122N/G124S/A175S	A[122]N/[G124]S/A39S	3,0		2,9			

**Ejemplo 9****Análisis farmacocinético de polipéptidos de FVIIa**

- 5 Se evaluaron propiedades farmacocinéticas de polipéptidos de FVIIa midiendo la cantidad de Factor VIIa humano en plasma de ratón. Pueden usarse dos ensayos para cuantificar FVIIa en plasma. Puede usarse un ELISA para cuantificar la proteína de FVIIa total en plasma de ratón y un ensayo de coagulación dependiente de FVIIa (FVIIa:C) usado para cuantificar la actividad coagulante de los polipéptidos de FVIIa en plasma.

**10 A. Administración de polipéptidos de FVIIa a ratones**

- Se evaluaron polipéptidos de FVIIa modificados y la proteína de FVIIa humana recombinante no modificada (rhFVIIa) (NovoSeven®, Novo Nordisk) en estudios farmacocinéticos. Para cada estudio, se inyectó a 18 ratones CD-1 macho una dosis de embolada intravenosa (0,1-3,0 mg/kg, dependiendo del estudio) de rFVIIa. A los 5, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos después de la inyección, se sacrificaron tres ratones de cada protocolo de inyección usando asfixia por CO<sub>2</sub> y se extrajeron aproximadamente 1,0 ml de sangre en una jeringa de 1,0 ml a través de una punción cardiaca percutánea. Cada jeringa se precargó con citrato sódico suficiente para conseguir una concentración final de 3,2 % en 1 ml de sangre. Las muestras de sangre se centrifugaron después a 9000 rpm durante 8 minutos a 4 °C. El plasma se retiró a tubos de 1,5 ml individuales marcados (Eppendorf), se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Adicionalmente, se inyectó a un ratón por cada experimento solamente vehículo (simulación) y se usó plasma de este ratón para determinación de la actividad de FVIIa de fondo.

**B. Ensayo de ELISA**

- 25 Se usó un kit disponible en el mercado, ELISA de Factor VII IMUBIND® (American Diagnostica) para detectar proteína de FVII en suero por ELISA. Este kit emplea una placa prerrecubierta con un anticuerpo anti FVII/FVIIa para capturar la proteína, y un anticuerpo anti FVII biotinilado para la detección mediante una peroxidasa de rábano rusticano marcada con estreptavidina. El kit se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante con las siguientes excepciones: en primer lugar, la curva patrón se ha estrechado para asegurar un intervalo lineal sobre el intervalo completo de concentraciones y abarca las concentraciones de 0,88 ng/ml hasta 10 ng/ml; en segundo lugar, la variante de FVIIa purificada en sí misma se usó para la curva patrón en lugar del patrón de FVII proporcionado con el kit debido a diferencias en la afinidad del anticuerpo. Los experimentos indicaron que el complejo de FVIIa con antitrombina III (ATIII), un inhibidor de plasma potencial de FVIIa, se detecta al 75 % del nivel de la proteasa libre, lo que asegura que el ensayo pueda detectar el FVIIa total en la muestra de plasma en las formas tanto activa como inactiva.

- Brevemente, las muestras de plasma se descongelaron a temperatura ambiente y se diluyeron 10 veces en tampón de muestras (PBS + Triton X-100 0,1 % + BSA 1,0 %) y después se diluyeron en serie 5,5 veces para cuatro diluciones. Las cuatro muestras diluidas se diluyeron 2 veces en la placa de ELISA para diluciones de muestra finales de 20, 110, 605 y 3327,5 veces. Estas cuatro diluciones de plasma de ratón abarcaron un intervalo de concentraciones de proteasa de 33.000 ng/ml a 20 ng/ml. Cada muestra se midió en dos placas de ensayo separadas, y esas mediciones dentro del intervalo de la curva patrón se usaron para calcular la concentración de variante de FVIIa en la muestra de plasma.

**45 C. Ensayo de coagulación**

- Se usó un kit disponible en el mercado (STACLOT FVIIa-rTF, Diagnostica Stago, Parsippany, NJ) como el ensayo de coagulación. Para determinar la actividad coagulante de los polipéptidos de FVIIa activos, se ensayaron muestras de plasma usando un ensayo de coagulación dependiente de FVIIa (FVIIa:C). El ensayo se realizó usando reactivos e instrucciones proporcionados en un kit comercial y el tiempo de coagulación se midió usando un instrumento de detección de coágulo electromecánico (STArt4, Diagnostica Stago, Parsippany, NJ). El kit se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante con las siguientes excepciones: en primer lugar, se usó la variante de FVIIa purificada en sí misma para la curva patrón en lugar del patrón de rhFVIIa proporcionado con el kit; en segundo lugar, se usaron los siguientes reactivos comerciales a granel para estudios de exploración farmacocinética rutinarios y proporcionaron resultados comparables a los reactivos del kit: factor tisular soluble (CalBioChem, La Jolla, Ca) y mezcla de fosfolípidos sintéticos (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), tampón de TBSA (Tris-NaCl, pH 7,5 con BSA 1 %; DiaPharma, West Chester, Ohio), y solución de cloruro cálcico 25 µM (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ).

- El ensayo de coagulación se realizó de la siguiente manera. Se descongelaron muestras de plasma congeladas a temperatura ambiente durante aproximadamente 45 minutos y después se diluyeron 1:5000 en tampón. Se combinaron cincuenta µl de plasma diluido con 50 µl de plasma humano deficiente en Factor VII y 50 µl de factor tisular relipidado y se preincubaron durante 180 segundos. Después de la preincubación, se añadieron 50 µl de solución de cloruro cálcico (25 µM) para iniciar la coagulación. El tiempo de coagulación se determinó usando detección de coágulo electromecánico. Cada muestra de plasma se ensayó por duplicado. El sistema se calibró construyendo una curva patrón usando el tiempo de coagulación de diluciones en serie de tampón que contenían una cantidad conocida de la variante de FVIIa específica que se ensayaba. Las concentraciones de FVIIa en

muestras de plasma de ratón se calcularon a partir de la parte lineal del log de FVIIa frente a la curva patrón de log de tiempo de coagulación. La capacidad de las muestras de plasma para inducir coagulación en plasma deficiente en Factor VII se presentó como ng de FVIIa/ml de plasma de ratón después de restar el fondo de FVIIa de tipo silvestre endógeno en plasma de ratones tratados con simulación.

5 La semivida de cada proteína de FVII se determinó de forma rutinaria realizando un ajuste convencional del logaritmo natural de la actividad a una línea recta, y midiendo el tiempo que tarda la actividad de las proteínas de FVIIa en reducirse a la mitad. Para proteínas de FVII con degradación multiexponencial, la semivida se determinó a partir de la parte terminal del perfil de logaritmo de plasma frente a tiempo. Se calcularon parámetros farmacocinéticos adicionales de la siguiente manera: AUC de plasma<sub>0-inf</sub>/Dosis (calculado como  $[AUC_{(0-t)} + Ct/(\ln 2/T_{1/2})]$ , donde t es el último punto temporal con concentración en plasma medible del polipéptido de FVIIa dividido por la dosis IV (mg/kg)); semivida (la semivida del polipéptido de FVIIa durante la fase terminal de perfil de concentración de FVIIa en plasma frente al tiempo;  $T_{1/2}$  se calcula como  $-\ln 2$  dividido por la pendiente negativa durante la fase terminal de la representación logarítmica-lineal de la curva de concentración de FVIIa en plasma frente al tiempo); MRT<sub>0-último</sub> (tiempo medio que el polipéptido de FVIIa reside en el cuerpo; calculado como  $AUMC_{0-último}/AUC_{0-último}$ , donde  $AUMC_{0-último}$  es el área total bajo la curva de primer momento frente a tiempo (curva de concentración de FVIIa · tiempo frente a tiempo), y se calcula por la regla trapezoide lineal); Cl (eliminación sistémica; calcula como  $dosis/AUC_{0-inf}$ ); y  $V_d$  (volumen de distribución basado en la constante e de eliminación terminal ( $\beta$ ); calculado como  $[Cl/(\ln 2/T_{1/2})]$ ).

#### D. Propiedades farmacocinéticas de variantes de FVIIa

Usando el protocolo de FVIIa:C descrito anteriormente, se evaluaron las propiedades farmacocinéticas de FVIIa de tipo silvestre y variantes de FVIIa basándose en la actividad de coagulación en plasma. Los resultados se exponen en la Tabla 23. Varias variantes de FVIIa mostraron parámetros farmacocinéticos mejorados en comparación con FVIIa de tipo silvestre.

Tabla 23. Parámetros farmacocinéticos de ratón de variantes de FVIIa

Mutación (numeración de FVII maduro)	Dosis IV (mg/kg)	AUC0-inf en plasma (µg.min/ml) /Dosis	semivida (minutos)	MRT0-último (minutos)	IC (ml/min /kg)	Vd (ml /kg)	N
NovoSeven® RT FVIIa	0,1	1165	37	50	0,9	46	1
NovoSeven® FVIIa	0,1	741	30	31	1,4	58	1
NovoSeven® FVIIa	1,0	1156	36	41	1,7	89	1
WT	0,1	686	37	37	1,8	92	6
WT	1,0	798	50	57	1,5	118	2
P257insGGGSCSFGRGDIRNVC	0,1	391	32	32	2,3	108	1
T128N/P129A	0,1	1392	57	43	0,8	64	2
S52A	0,1	594	51	58	1,6	118	1
K109N	0,1	951	50	40	1,1	75	1
A51N	0,1	270	33	32	3,7	174	1
S52A/S60A	0,05	460	25	29	2,2	78	1
S52A/S60A	0,1	408	17	34	2,5	61	1
M298Q	0,1	258	76	33	4,9	443	2
T128N/P129A/M298Q	0,1	495	26	28	2,0	75	1
V158D/E296V/M298Q	0,05	72	13	10	13,9	258	1
V158D/E296V/M298Q	0,1	44	16(á), 45(â)	20	22,8	146 5	1
V158D/E296V/M298Q	1,0	39	7	13	26,6	979	2
V158D/E296V/M298Q	3,0	22	7,7á	7,9	45,6	506	1
V158D/E296V/M298Q	6,0	48	43	45	20,8	130 5	1
T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q	0,1	125	11	14	8,0	122	1
S52A/S60A/V158D/E296V/M298Q	0,1	47	15	11	21,4	450	1
Q286R	0,1	181	55	59	5,5	439	1
Q286R	0,3	460	41,7	76	1,8	110	1
Q286R	1,0	1256	67	68	0,8	80	2
T128N/P129A/Q286R	0,1	2443	96	82	0,4	56	1
S52A/S60A/Q286R	0,1	1565	43	60	0,6	55	1
Intercambio de Gla FIX	0,1	207	20	22	4,9	140	2
K341D	0,1	2817	106	114	0,1	22	1
S222A	0,1	189	32	33	5,3	248	1

Mutación (numeración de FVII maduro)	Dosis IV (mg/kg)	AUC0-inf en plasma (µg.min/ml) /Dosis	semivida (minutos)	MRT0-último (minutos)	IC (ml/min/kg)	Vd (ml/kg)	N
S222A	1,0	139	30	33	3,8	293	1
T128N/P129A/S222A	0,1	422	28,4(â), 71(â)	58	2,4	244	1
S52A/S60A/S222A	0,1	270	45	38	3,7	243	1
H257A	0,1	595	31	30	1,7	76	1
H257S	0,1	1015	59	62	1,0	84	1
H257S	0,75	816	50	62	1,2	85	1
Q366V	0,1	19	14	11	51,6	106 0	1
Intercambio de GlaFIX/Q366V	0,1	157	11	7,0	6,4	107	1
A122N/G124S/E394N/P395A/R396S	0,1	1089	63	45	0,9	84	1
G318N	1,0	568	95	56	1,8	242	1
A175S	0,1	2081	111	85	0,5	76	2
K109N/A175S	0,1	1280	183	51	0,8	207	1
S119N/L121S/A175S	0,1	2460	102	50	0,4	60	1
T128N/P129A/A175S	0,1	2770	83	48	0,4	43	1
A122N/G124S/A175S	0,1	3240	91	50	0,3	40	1
A122N/G124S	0,1	679	52,9	42	1,1	87	1
H257A/Q286R	0,1	1848	56,8	73	0,5	44	1
S222A/Q286R	0,1	861	30	38	1,5	97	2
Intercambio de GlaFIX/S222A/Q286R	1,0	415	39	42	2,4	136	1
Intercambio de GlaFIX/T128N/P129A/S222A/Q286R	0,1	929	55	59	1,1	86	1
S222A/H257A/Q286R	0,1	976	56	42	1,0	83	1
Q286R/M298Q	0,055	1198	40	44	0,8	49	1
Q286R/M298Q	0,1	605	35	42	1,9	94	6
Q286R/M298Q	1,0	363	29	36	2,8	116	1
Intercambio de GlaFIX/Q286R/M298Q	0,1	231	26	20	4,9	194	3
T128N/P129A/Q286R/M298Q	0,1	1571	41	60	0,6	38	1
T[128]N/P[129]A/Q286R/M298Q	0,1	1326	42,3	50	0,8	47	1
Intercambio de GlaFIX/T128N/P129A/Q286R/M298Q	0,1	427	30	32	2,3	101	1
{Intercambio de Gla FIX/E[40]L}/Q286R/M298Q	0,1	386	53	43	2,6	198	1
{Intercambio de Gla FIX/K[43]I}/Q286R/M298Q	0,1	439	85	47	2,3	280	1
{Intercambio de Gla FIX/Q[44]S}/Q286R/M298Q	0,1	291	14	24	3,4	150	1
{Intercambio de Gla FIX/M[19]K}/Q286R/M298Q	0,1	648	14 (â), 75 (â)	43	1,5	32	1
S52A/S60A/Q286R/M298Q	0,1	374	32	34	2,7	122	1
Intercambio de GlaFIX/S52A/S60A/Q286R/M298Q	0,1	256	19	18	3,9	107	1
{Intercambio de Gla FIX/K[43]I}/T128N/P129A/Q286R/M298Q	0,1	154	18	17	6,5	166	1
S222A/M298Q	0,1	72	17	12	13,9	332	1
S222A/H257A/Q286R/M298Q	0,1	93	33	30	10,8	517	1
T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	0,1	770	38	45	1,3	72	1
S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	0,1	469	26	28	2,1	78	1
A175S/Q286R/Q366V	0,1	353	28,9	23	2,8	118	1
Q286R/M298Q/K341D	0,1	219	23	20	4,6	151	1
M298Q/K341D	0,1	2430	78	76	0,4	46	1

ES 2 577 055 T3

Mutación (numeración de FVII maduro)	Dosis IV (mg/kg)	AUC0-inf en plasma (µg.min/ml) /Dosis	semivida (minutos)	MRT0-último (minutos)	IC (ml/min/kg)	Vd (ml/kg)	N
Q286R/M298Q/Q366N	0,1	569	29	32	1,8	74	1
T128N/P129A/Q286R/M298Q /Q366N	0,1	1897	50	58	0,5	38	1
{Intercambio de Gla FIX K[43]} /Q286R/M298Q/Q366N	0,1	257	10(á), 28(â)	20	3,9	163	1
{Intercambio de Gla FIX K[43]} /T128N/P129A/Q286R/M298Q /Q366N	0,1	393	24	27	2,5	89	1
T128N/P129A/Q286R/H373F	0,1	1467	59	62	0,9	74	1
Q286R/M298Q/H373F	0,1	466	28	23	2,2	87	1
T128N/P129A/Q286R/M298Q /H373F	0,1	597	27(á), 67(â)	51	1,6	153	1
T128N/P129A/M298Q/H1373F	0,1	307	7(á), 27(â)	23	3,3	126	1
V158D/Q286R/E296V/M298 Q	0,1	172	14	36	5,8	535	1
S222A/T239V	0,1	127	47	39	7,9	535	1
Intercambio de Gla FIX/S222A/T239V/Q286R	0,1	460	34	33	2,2	108	1
T239V/Q286R/M298Q	0,1	398	28(á),71(â)	60	2,5	258	1
Intercambio de Gla FIX/T239V/Q286R/M298Q	0,1	365	13(á),56(â)	29	2,7	220	1
T128N/P129A/T239V/Q286R/ M298Q	0,1	914	38	36	1,1	60	1
S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	0,1	181	28	31	5,5	225	1
T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q	0,1	564	27	30	1,8	70	1
T239V/Q286R/H373F	0,1	385	72	54	2,6	269	1
T239V/Q286R/M298Q/H373F	0,1	149	36	23	6,7	353	1
T128N/P129A/T239V/Q286R/ M298Q/H373F	0,1	345	27	27	2,9	113	1
V158D/T239V/E296V/M298Q	0,1	370	14(á),70(â)	50	2,7	273	1
T239V/Q286R	0,1	1820	85	76	0,6	68	1
S222A/T239V	0,1	1300	6(á), 81(â)	69	0,8	90	1
Intercambio de Gla FIX/S222A/T239V/Q286R	0,1	1073	70	66	0,9	94	1
T239V/Q286R/M298Q	0,1	1029	27(á),60(â)	62	1,0	84	1
Intercambio de Gla FIX/T239V/Q286R/M298Q	0,1	1269	54	62	0,8	61	1
T128N/P129A/T239V/Q286R/ M298Q	0,1	2105	82	74	0,5	56	1
S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	0,1	1212	31(á), 79(â)	60	0,8	101	1
T239V/Q286R/H373F	0,1	1841	30(á), 85(â)	69	0,5	62	1
V158D/T239V/E296V/M296Q	0,1	184	24(á), 134(â)	78	5,4	105	3
T239V/Q286R	0,1	1522	29(á), 72(â)	68	0,7	68	1
T239V/Q286R/M298Q/H373F	0,1	950	36	61	1,1	55	1
T239V/Q286R/M298Q/H373F	0,1	806	32	56	1,3	57	2
T239V/Q286R/M298Q/H373F	0,1	663	27	52	1,5	59	1
T239V/Q286R/M298Q/H373E	0,1	1350	53	62	0,7	57	1
S222A/H257S/Q286R/M298Q	0,1	814	33	31	1,2	59	1
H257S/Q286R/M298Q/H373F	0,1	297	34	34	3,4	163	1
S222A/Q286R/M298Q/H373F	0,1	106	35	23	9,4	478	1
Intercambio de Gla FIX/S222A/	0,1	104	9,1(á),17	13	9,7	242	1

Mutación (numeración de FVII maduro)	Dosis IV (mg/kg)	AUC0-inf en plasma (µg.min/ml) /Dosis	semivida (minutos)	MRT0-último (minutos)	IC (ml/min /kg)	Vd (ml /kg)	N
Q286R/M298Q/H373F			(a)				
S222A/Q286R/M298Q	0,1	347	24	26	2,9	102	1
Intercambio de Gla FIX / S222A/Q286R/M298Q	0,1	263	11	13	3,8	62	1
T128N/P129A/A175S/Q366V	0,1	2196	52(á), 85(á)	78	0,5	56	1
A122N/G124S/A175S/Q366V	0,1	2148	92	81	0,5	62	1
T128N/P129A/A175S/S222A	0,1	4248	122	88	0,2	41	1
A122N/G124S/A175S/S222A	0,1	3316	102	83	0,3	44	1
T128N/P129A/A175S/Q286R	0,1	6160	151	94	0,2	35	1
A122N/G124S/A175S/Q286R	0,1	4097	139	93	0,2	49	1
Intercambio de Gla FIX /S222A/Q286R/H373F	0,1	480	26	30	2,1	79	1
V258D/E296V/M298Q/H373F	0,1	90	8,7(á), 20(á)	14	11,1	321	1
H257A/Q286R/M298Q	0,1	1029	42	48	1,0	59	1
Intercambio de Gla FIX /T128N/P129A/A175S/S222A/Q286R	0,1	2787	38(á), 134(á)	88	0,4	69	1
Intercambio de Gla FIX /A122N/G124S/A175S/S222A/Q286R	0,1	3492	148	95	0,3	61	1
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q	0,1	5120	171	96	0,2	48	1
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q	0,1	3681	154	92	0,3	61	1
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	0,1	3140	113	87	0,3	52	1
A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	0,1	2659	37,(á),13 0(á)	85	0,4	70	1
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q/H373F	0,1	3580	118	88	0,3	48	1
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F	0,1	3148	105	84	0,3	48	1
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F	0,1	124	20	17	8,1	237	1
M298Q/H373F/Q366N	0,1	169	8	8,2	5,9	69	1
T239V/M298Q/H373F	0,1	110	18	16	9,1	235	1
T239I/M298Q/H373F	0,1	562	26	28	1,8	66	1
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F	0,1	607	29	30	1,6	69	1
T239V/Q286R/M298Q/ Q366N	0,1	729	29	30	1,4	57	1
T239I/Q286R/M298Q/Q366N	0,1	1548	72	73	0,6	67	1
α = semivida alfa, que mide la semivida de distribución							
β = semivida beta, que mide la semivida de eliminación							

La Tabla 24 expone los resultados del estudio usando los siguientes parámetros farmacocinéticos: % de Recuperación (*in vivo*) (la concentración en plasma de FVIIa medida a los 5 minutos después de la dosis (primer punto temporal) dividido por el máximo teórico de concentración en plasma de FVIIa (basándose en la masa de FVIIa administrada y el volumen sanguíneo total teórico) por 100 %); % de Recuperación (*in vitro*) (la concentración de FVIIa medida en plasma con adición de una cantidad conocida de FVIIa dividida por la concentración en plasma de FVIIa teórica (basándose en la cantidad de FVIIa añadida a un volumen en plasma conocido) por 100 %); AUC\*Actividad/Dosis (Dependiente de FT) (la AUC en plasma/Dosis multiplicada por la Actividad Indirecta Dependiente de FT (véase Tabla 15, anterior); Mejora en la Exposición de Actividad sobre FVIIa NovoSeven® (Dependiente de FT) (calculado por  $AUC*Actividad/Dosis (Dependiente de FT)_{NoVoSeven® FVIIa} / AUC*Actividad/Dosis (Dependiente de FT)_{FVIIa Mutante}$ ); AUC\*Actividad/Dosis (Independiente de FT) (la AUC en plasma/Dosis multiplicada por la Actividad Indirecta Independiente de FT (véase Tabla 15, anterior); Mejora en la Exposición de Actividad sobre FVIIa NovoSeven® (Independiente de FT) (calculada por  $AUC*Actividad/Dosis (Independiente de FT)_{FVIIa NovoSeven®} / AUC*Actividad/Dosis (Independiente de FT)_{FVIIa Mutante}$ ).

Tabla 24

Mutación (numeración de FVII maduro)	% de Recuperación (in vivo)	AUC*Actividad/Dosis (Dependiente de FT)	Mejora en la Exposición a Activo sobre Novo7(Dependiente de FT)	AUC*Actividad/Dosis (Independiente de FT)	Mejora en la Exposición a Activo sobre Novo7(Independiente de FT)
NovoSeven® FVIIa	60 %	2,95E+10	1,0	7,26E+03	1,0
WT	46 %	4,71E+10	1,4	1,22E+04	1,5
T239I/Q286R/M298Q/Q366N	52 %	1,15E+11	3,9	1,38E+05	18,9
T239V/Q286R/M298Q/Q366N	66 %	1,35E+11	4,6	4,69E+04	6,5
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F	66 %	8,10E+10	2,8	9,77E+04	13,5
T239I/M298Q/H373F	60 %	1,95E+10	0,7	7,77E+04	10,7
T239V/M298Q/H373F	17 %	4,89E+09	0,2	3,53E+04	4,9
M298Q/H373F/Q366N	32 %	1,19E+10	0,4	2,13E+04	2,9
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F	21 %	2,97E+10	1,0	7,12E+04	9,8
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F	79 %	2,64E+11	9,0	ND	ND
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q/H373F	85 %	2,05E+11	7,0	ND	ND
A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	76 %	2,23E+11	7,6	ND	ND
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	69 %	2,16E+11	7,4	6,36E+04	8,8
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q	84 %	2,73E+11	9,3	ND	ND
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q	76 %	3,69E+11	12,6	ND	ND
Intercambio de Gla FIX/A122N/G124S/A175S/S222A/Q286R	42 %	1,44E+11	4,9	ND	ND
Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/A175S/S222A/Q286R	69 %	1,08E+11	3,7	8,51 E+04	11,7
H257A/Q286R/M298Q	42 %	1,16E+11	4,0	6,33E+04	8,7
V258D/E296V/M298Q/H373F	17 %	1,36E+10	0,5	1,17E+05	16,1
Intercambio de Gla FIX/S222A/Q286R/H373F	42 %	5,88E+10	2,0	3,90E+04	5,4
A122N/G124S/A175S/Q286R	78 %	1,68E+11	5,8	1,22E+04	1,7
T128N/P129A/A175S/Q286R	34 %	2,05E+11	7,0	2,01E+04	2,8
A122N/G124S/A175S/S222A	60 %	6,90E+10	2,4	ND	ND
T128N/P129A/A175S/S222A	88 %	7,31E+10	2,5	8,00E+03	1,1



Mutación (numeración de FVII maduro)	% de Recuperación (in vivo)	AUC* Actividad/Dosis (Dependiente de FT)	Mejora en la Exposición a Actividad sobre Novo7 (Dependiente de FT)	AUC* Actividad/Dosis (Independiente de FT)	Mejora en la Exposición a Actividad sobre Novo7 (Independiente de FT)
A122N/G124S/A175S/ Q366V	60 %	6,48E+10	2,2	6,42E+03	0,9
T128N/P129A/A175S/ Q366V	74 %	7,43E+10	2,5	7,39E+03	1,0
Intercambio de Glia FIX / S222A/Q286R/M298Q	40 %	5,52E+10	1,9	1,09E+05	15,0
S222A/Q286R/M298Q	22 %	4,46E+10	1,5	8,78E+04	12,1
Intercambio de Glia FIX/ S222A/Q286R/M298Q / H373F	16 %	2,94E+10	1,0	1,99E+04	2,7
S222A/Q286R/M298Q /H373F	5 %	1,57E+10	0,5	4,57E+04	6,3
H257S/Q286R/M298Q /H373F	20 %	4,52E+10	1,5	9,01E+03	1,2
S222A/H257S/Q286R/ M298Q	72 %	1,28E+11	4,4	3,39E+04	4,7
T239I/Q286R/M298Q/ H373F	56 %	8,73E+10	3,0	1,05E+04	1,5
T239V/Q286R	66 %	1,35E+11	4,6	1,79E+04	2,5
V158D/T239V/E296V / M296Q	8 %	4,08E+10	1,4	3,43E+05	47,3
T239I/Q286R/H373F	77 %	1,14E+11	3,9	ND	ND
S222A/T239I/H257A/ Q286R/M298Q	61 %	1,38E+11	4,7	6,26E+04	8,6
T128N/P129A/T239I/ Q286R/M298Q	81 %	1,72E+11	5,9	1,64E+05	22,6
Intercambio de Glia FIX / T239I/Q286R/M298Q	56 %	1,59E+11	5,4	3,10E+05	42,6
T239I/Q286R/M298Q	54 %	1,16E+11	4,0	1,16E+04	1,6
Intercambio de Glia FIX/S222A/T239I/Q286R	42 %	7,27E+10	2,5	2,18E+04	3,0
S222A/T239I	71 %	3,97E+10	1,4	2,19E+03	0,3
T239I/Q286R	56 %	1,05E+11	3,6	8,34E+03	1,1
V158D/T239I/E296V/ M298Q	34 %	5,38E+10	1,8	8,01 E+04	11,0
T239V/Q286R/M298 Q/H373F	10 %	2,54E+10	0,9	6,07E+03	0,8
T239V/Q286R/H373F	16 %	4,09E+10	1,4	4,69E+03	0,6
T128N/P129A/S222A/ T239V/H257A/Q286R /M298Q	49 %	6,84E+10	2,3	1,01E+05	13,9
S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	15 %	3,87E+10	1,3	2,59E+04	3,6
T128N/P129A/T239V/ Q286R/M298Q	60 %	9,47E+10	3,2	2,10E+05	28,9
(Intercambio de Glia FIX/T239V/Q286R/M298Q	34 %	9,24E+10	3,2	1,01E+05	14,0
T239V/Q286R/ M298Q	21 %	6,85E+10	2,3	1,17E+04	1,6
Intercambio de Glia	33 %	9,32E+10	3,2	7,99E+03	1,1

Mutación (numeración de FVII maduro)	% de Recuperación ( <i>in vivo</i> )	AUC* Actividad/Dosis (Dependiente de FT)	Mejora en la Exposición a Actividad sobre Novo7 (Dependiente de FT)	AUC* Actividad/Dosis (Independiente de FT)	Mejora en la Exposición a Actividad sobre Novo7 (Independiente de FT)
FIX/S222A/T239V/Q286R	10 %	9,52E+09	0,3	3,83E+02	0,1
S222A/T239V	15 %	2,56E+10	0,9	1,76E+05	24,3
V158D/Q286R/E296V /M298Q	36 %	7,92E+10	2,7	1,83E+04	2,5
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F	66 %	1,39E+11	3,9	1,42E+05	12,1
Q286R/M298Q/H373F	49 %	2,03E+11	6,9	1,93E+04	2,7
T128N/P129A/Q286R/ H373F					
{Intercambio de Glia FIX K[43]/T128N/P129A Q286R/M298Q /Q366N	45 %	9,88E+10	3,4	8,58E+04	11,8
{Intercambio de Glia FIX K[43]/Q286R/M298Q/Q366N	36 %	4,35E+10	1,5	2,18E+04	3,0
Q286R/M298Q/ Q366N	41 %	1,33E+11	4,5	7,50E+04	10,3
M298Q/K341D	84 %	4,26E+10	1,0	1,02E+04	0,6
Q286R/M298Q/K341D	33 %	4,98E+09	0,1	5,24E+03	0,3
A175S/Q286R/Q366V	22 %	3,72E+10	0,9	7,31E+03	0,4
S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M2986Q	45 %	1,17E+11	4,0	5,42E+04	7,5
T128N/P129A/S222A/ H257A/Q286R/M2986Q	53 %	1,80E+11	6,1	5,23E+04	7,2
S222A/H257A/Q286R /M298Q	9 %	3,04E+10	0,9	4,17E+04	4,9
S222A/M298Q	7 %	8,63E+09	0,2	9,51 E+04	5,1
{Intercambio de Glia FIX/K[43]}/T128N/P129A/Q286R/M298Q	23 %	2,46E+08	0,0	6,00E+04	8,3
Intercambio de Glia FIX/S52A/S60A/Q286R/M298Q	32 %	4,63E+10	1,6	2,54E+05	34,9
S52A/S60A/ Q286R/M298Q	31 %	4,67E+10	1,6	8,11E+04	11,2
{Intercambio de Glia FIX/M[19]K/Q286R/M298Q	69 %	9,11E+10	3,1	3,32E+05	45,7
{Intercambio de Glia FIX/Q[44]S/Q286R/M298Q	35 %	5,77E+10	2,0	2,12E+05	29,2
{Intercambio de Glia FIX/K[43]}/Q286R/M298Q	28 %	1,20E+11	4,1	3,96E+05	54,5
{Intercambio de Glia FIX/E[40]L}/Q286R/M298Q	36 %	8,04E+10	2,7	3,14E+03	43,3
Intercambio de Glia	84 %	9,00E+10	3,1	3,58E+04	4,9

Mutación (numeración de FVII maduro)	% de Recuperación (in vivo)	AUC* Actividad/Dosis (Dependiente de FT)	Mejora en la Exposición a Actividad sobre Novo7(Dependiente de FT)	AUC* Actividad/Dosis (Independiente de FT)	Mejora en la Exposición a Actividad sobre Novo7(Independiente de FT)
FIX/T128N/P129A/Q286R/M298Q	66 %	1,55E+11	5,3	2,20E+05	30,3
T128N/P129A/Q286R/M298Q	62 %	4,21E+11	14,4	1,84E+05	25,4
T128N/P129A/Q286R/M298Q	21 %	8,53E+10	2,7	2,30E+05	29,9
Q143R/M156Q/Intercambio de Gla FIX	51 %	1,08E+11	3,2	1,03E+05	11,2
Q286R/M298Q	40 %	1,55E+11	4,4	2,72E+04	3,2
S222A/H257A/Q286R	44 %	1,37E+11	4,7	1,44E+04	2,0
Intercambio de Gla					
FIX/T128N/P129A/S222A/Q286R	32 %	5,95E+10	1,4	2,15E+04	1,2
Intercambio de Gla/FIX/S222A/ Q286R	51 %	1,85E+11	5,4	4,61 E+04	2,5
S222A/Q286R	63 %	3,66E+11	12,5	1,59E+04	2,2
H257A/Q286R	82 %	8,70E+10	2,4	2,18E+04	1,2
A122N/G124S/A175S	80 %	6,16E+10	1,7	ND	ND
T128N/P129A/A175S	60 %	8,68E+10	2,5	ND	ND
S119N/L121S/A175S	22 %	4,73E+10	1,3	ND	ND
K109N/A175S	52 %	8,10E+10	2,4	1,40E+04	0,8
A175S	37 %	5,22E+10	1,2	0,00E+00	0,0
G318N	46 %	1,07E+11	2,5	ND	ND
A122N/G124S/E394N /P395A/R396S	26 %	1,43E+10	0,5	1,41 E+04	1,9
Intercambio de Gla/FIX/Q366V	3 %	4,09E+09	0,1	1,44E+03	0,1
Q366V	39 %	1,67E+11	5,1	1,30E+04	0,9
H257S	36 %	4,96E+10	1,2	1,18E+04	0,6
H257A	11 %	1,05E+10	0,4	5,28E+03	0,7
S52A/S60A/S222A	21 %	5,28E+10	1,8	4,06E+03	0,6
T128N/P129A/S222A	10 %	1,55E+10	0,4	8,56E+03	0,5
S222A	98 %	4,77E+10	1,1	ND	ND
K341D	67 %	6,42E+10	2,2	1,59E+04	2,2
S52A/S60A/Q286R	67 %	4,13E+11	14,1	4,24E+04	5,8
T128N/P129A/Q286R	35 %	1,31E+11	3,7	3,52E+04	2,6
Q286R	7 %	9,34E+09	0,3	8,24E+04	11,3
S52A/S60A/V158D/E 296V/M298Q	21 %	5,03E+10	1,7	3,44E+05	47,4
T128N/P129A/V158D /E296V/M298Q	58 %	3,11E+10	1,1	4,49E+04	6,2
T128N/P129A/M298Q	18 %	1,33E+10	0,4	4,93E+04	3,8
M286Q	51 %	5,36E+10	1,4	7,76E+03	0,6
S52A/S60A					

Mutación (numeración de FVII maduro)	% de Recuperación ( <i>in vivo</i> )	AUC* Actividad/Dosis (Dependiente de FT)	Mejora en la Exposición a Actividad sobre Novo7 (Dependiente de FT)	AUC* Actividad/Dosis (Independiente de FT)	Mejora en la Exposición a Actividad sobre Novo7 (Independiente de FT)
A51N	15 %	4.65E+10	1,1	9,39E+03	0,5
A122N/G124S	45 %	5.26E+10	1,8	4,61E+03	0,6
A122N/G124S	45 %	9,20E+10	2,2	0,00E+00	0,0
K109N	52 %	1,05E+11	3,6	ND	ND
K109N	52 %	8,43E+10	2,0	ND	ND
S52A	37 %	3,50E+10	0,8	0,00E+00	0,0
Intercambio de Glu FIX	31 %	2,63E+10	0,7	1,28E+04	1,4
T128N/P129A	88 %	8,25E+10	2,4	25147,5	2,6
P257insGGGSCSFG R GDIRNVC	38 %	6,29E+10	1,5	ND	ND

**Ejemplo 10****Determinación de la unión del Factor VIIa con factor tisular soluble**

- 5 La capacidad de las variantes de FVIIa expresadas a partir de células HEK 293 o BHK para unirse con el factor tisular soluble (FTs) se evaluó usando resonancia de plasmón superficial de Biacore. Las variantes de FVIIa se evaluaron mediante la medición del perfil de unión a tres concentraciones de proteasa en dos experimentos por duplicado, usando dos niveles diferentes de FTs unido con una microplaca CM5 de Biacore.
- 10 Se acopló una nueva microplaca sensora CM5 Serie S (GE Healthcare Cat n° BR1006-68) con albúmina de suero bovino y factor tisular soluble usando un instrumento T100 Biacore. Se llevó a cabo acoplamiento usando un tampón de acoplamiento Biacore (Na Hepes 30 mM pH 7,4, NaCl 135 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 0,01 %) con un kit de acoplamiento de Amina (GE Healthcare Cat n° BR-1000-50) y el asistente de protocolo en el software T100 de Biacore. Para la inmovilización, se usaron las cuatro células de la microplaca. Las células 1 y 3 se acoplaron con 500 unidades de respuesta (UR) de proteína de referencia de albúmina de suero bovino diluida en tampón de acetato, pH 4,0 y las células 2 y 4 se acoplaron con 500 y 250 UR de FTs (R&D Systems) diluido en tampón de Acetato, pH 4,5.
- 20 Cada variante de FVIIa, y la proteasa FVIIa de tipo silvestre, se ensayaron a tres concentraciones y por duplicado. Las proteasas se diluyeron a 60 nM, 30 nM y 15 nM en 100  $\mu$ l e tampón de Ensayo Biacore (Na Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, PEG 8000 0,1 %, BSA 0,1 %, Tween-20 0,01 %) en una placa de ensayo de 96 pocillos. Cada muestra se ensayó en el instrumento T100 Biacore usando 120 segundos de tiempo de contacto seguido de 180 segundos de tiempo de disociación a un caudal de 10  $\mu$ l/minuto. También se ensayó un blanco de tampón. La microplaca se regeneró con EDTA 50 mM, pH 7,0 durante 60 segundos y después 30 segundos.
- 25 El ensayo para medir la unión de FVIIa de tipo silvestre con FTs debería producir tres conjuntos de curvas que proporcionan una  $K_d$  de aproximadamente 8 nM.
- 30 Se usó software de evaluación Biacore T100 para analizar los datos. Específicamente, se utilizó el análisis de unión de Cinética/Afinidad 1:1, que ajusta los datos a la isoterma de Langmuir, y los datos se ajustaron individualmente para dos repeticiones de cada variante en dos acoplamientos de unidades de respuesta. Los cuatro valores de  $K_d$  ajustados se promediaron y se presentan en la Tabla 25. Las variantes de FVIIa que contienen la mutación M298Q tendían a mostrar resultados de  $K_d$  menores y por lo tanto se unen más estrechamente con FTs.

**Tabla 25. Unión de variantes de FVIIa con FT soluble**

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_d$ de afinidad (nM)	
		Células 293-F	Células BHK
wt	wt	7,9	9,0
Q286N	Q143N	8,9	
Q286E	Q143E	3,8	
Q286D	Q143D	9,8	
Q286S	Q143S	8,2	
Q286T	Q143T	10,6	
Q286R	Q143R	7,6	
Q286K	Q143K	8,2	
Q286A	Q143A	6,3	
Q286V	Q143V	11,9	
S222A	S82A	4,2	
H257S	H117S	4,2	
Q366D	Q217D	3,2	
Q366E	Q217E	5,6	
Q366N	Q217N	3,8	
Q366T	Q217T	7,1	

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K <sub>d</sub> de afinidad (nM)	
		Células 293-F	Células BHK
Q366S	Q217S	9,0	
Q366V	Q217V	7,9	
A175S	A39S	6,5	
V158T/L287T/M298K	V21T/L144T/M156K	8,4	
V158D/L287T/M298K	V21D/L144T/M156K	8,5	
Q286R/S222A	Q143R/S82A		7,3
Q286R/S222A/Intercambio de Gla FIX	Q143R/S82A/intercambio de Gla FIX	8,4	
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q		4,7
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q		11,4
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE		4,9
S222A/M298Q	S82A/M156Q		5,1
H257A/M298Q	H117A/M156Q		3,1
S222A/H257A /Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	2,5	
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V	29,3	
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V		18,3
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V		8,6
Q286M	Q143M	7,1	
Q286L	Q143L	7,1	
Q286Y	Q143Y	7,5	
Q366I	Q217I	6,7	
Q366L	Q217L	5,2	
Q366M	Q217M	4,7	
H216A/H257A	H76A/H117A	6,0	
Q286R/K341D	Q143R/K192D	3,5	
M298Q/K341D	Q143R/Q217D	7,9	
Q286R/Q366N	Q143R/Q217N	8,0	
Q286R/M298Q/Q366D	Q143R/M56Q/Q217D	4,6	
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	3,8	

5 Se realizó un conjunto adicional de experimentos para evaluar la unión de variantes de FVIIa con FT soluble usando el mismo ensayo que se ha descrito anteriormente, pero con una modificación del intervalo de dosis de FVIIa a 30 nM, 15 nM y 7,5 nM y el análisis de datos de modo que se usó un modelo de dos estados para ajustarse a los datos de RPS. Este análisis de modelo de dos estados se proporcionó en el conjunto de Software de Evaluación Biacore T100 y se reproduce a continuación. Los resultados se proporcionan en la Tabla 26, posteriormente.

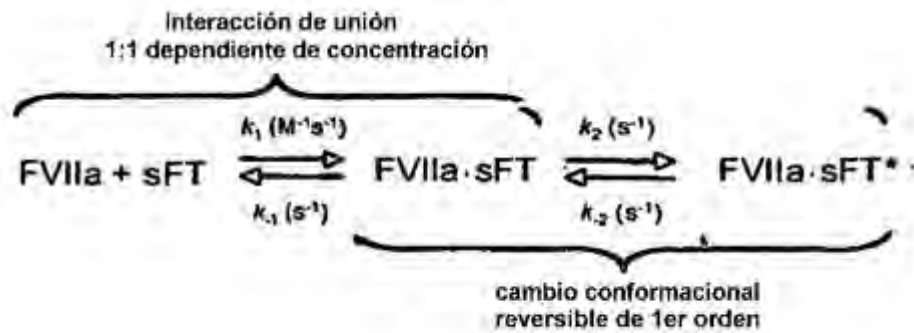


Tabla 26. Unión de variantes de FVIIa con FT soluble

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_d$ de afinidad (nM)	DT	%CV	$K_d$ -WT/ $K_d$ -mut de afinidad	n
WT (NovoSeven®)	WT (NovoSeven®)	6,5	1,2	19 %	1,2	19
WT (NovoSeven-RT®)	WT (NovoSeven-RT®)	6,3	85 %	13 %	1,2	4
WT	WT	7,6	1,9	24 %	1,0	6
WT †	WT †	3,9	0,6	15 %	1,0	6
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	6,8	1,2	18 %	1,1	7
Intercambio de Gla FIX	Intercambio de Gla FIX	36,0	2,6	7 %	0,2	3
K109N	K[109]N	10,8	0,2	2 %	0,7	2
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A	23,2	4,0	17 %	0,3	2
M298Q	M156Q	5,9	0,7	11 %	1,3	4
M298Q †	M156Q †	1,9	0,1	7 %	2,0	2
T128N/P129A/M298Q †	T[128]N/P[129]A/M156Q †	2,4	0,4	16 %	1,6	2
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	2,0	0,5	26 %	3,9	10
V158D/E296V/M298Q †	V21D/E154V/M156Q †	1,8	0,5	30 %	2,2	4
T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q	T[128]N/P[129]A/V21D/E154V/M156Q	2,0	0,1	4 %	3,9	2
S52A/S60A/V158D/E296V/M1298Q	S[52]A/S[60]A/V21D/E154V/M156Q	14,6	1,3	9 %	0,5	2
Q286R	Q143R	6,7	0,4	5 %	1,1	2
T128N/P129A/Q286R	T[128]N/P[129]A/Q143R	11,1	4,3	39 %	0,7	6
T128N/P129A/Q286R †	T[128]N/P[129]A/Q143R †	10,0	1,6	16 %	0,4	4
S52A/S60A/Q286R	S[52]A/S[60]A/Q143R †	51,6	18,4	36 %	0,1	5
S222A	S82A	2,6	0,1	4 %	3,0	2
T128N/P129A/S222A	T[128]N/P[129]A/S82A	3,6	0,2	7 %	2,1	2
S52A/S60A/S222A	S[52]A/S[60]A/S82A	17,2	2,4	14 %	0,4	2
H257S	H117S	6,6	1,5	23 %	1,2	2
Intercambio de GlaFIX/Q366V	Intercambio de Gla FIX/Q217V	56,0	15,1	27 %	0,1	3
A175S	A39S	12,3	0,1	1 %	0,6	2
K109N/A175S	K[109]N/A39S	9,0	0,0	0 %	0,8	2
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	6,6	0,1	1 %	1,1	2
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	10,0	0,1	1 %	0,8	2
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	12,1	2,2	18 %	0,6	2
Q286R/H257A	Q143R/H117A	7,2	1,0	13 %	1,1	2
Q286R/H257A †	Q143R/H117A †	5,5	0,1	2 %	0,7	2
Q286R/S222A	Q143R/S82A	3,4	0,2	6 %	2,3	2
Intercambio de Gla FIX/ T128N/P129A/ S222A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/ T[128]N/P[129]A/ S82A/Q143R	21,3	5,6	26 %	0,4	6
Intercambio de Gla FIX/ T128N/P129A/S222A/Q286R †	Intercambio de Gla FIX/ T[128]N/P[129]A/S82A/Q143R †	24,6	6,4	26 %	0,2	6
Intercambio de Gla FIX/ S52A/S60A/S222A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/ S[52]A/S[60]A/S82A/Q143R	56,9	8,5	15 %	0,1	2
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	6,0	0,5	8 %	1,3	2

ES 2 577 055 T3

Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	4,1	0,5	11 %	1,9	9
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q †	3,6	1,1	29 %	1,1	13
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q§	3,2	0,2	7 %	1,2	4
Intercambio de Gla FIX/ Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/ Q143R/M156Q	30,4	5,4	18 %	0,3	3
Intercambio de Gla FIX/ Q286R/M298Q †	Intercambio de Gla FIX/ Q143R/M156Q †	22,1	1,5	7 %	0,2	8
T128N/P129A/Q286R/ M298Q	T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q	4,7	1,2	26 %	1,6	5
T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q †	3,9	0,4	11 %	1,0	8
Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/Q286R/ M298Q	Intercambio de Gla FIX/T[128]N/P[129]A/Q143R/M 156Q	20,8	1,4	7 %	0,4	5
Intercambio de Gla FIX /T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	Intercambio de Gla FIX /T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q †	37,5	12,3	33 %	0,1	8
{Intercambio de Gla FIX/E40L}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/E[40L]}/Q143R/M156Q	38,5	7,4	19 %	0,2	2
{Intercambio de Gla FIX/K43I}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/K[43I]}/Q143R/M156Q	35,3	3,4	10 %	0,2	2
{Intercambio de Gla FIX/K43I}/Q286R/M298Q †	{Intercambio de Gla FIX/K[43I]}/Q143R/M156Q †	23,7	3,6	15 %	0,2	2
{Intercambio de Gla FIX/Q44S}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/Q[44S]}/Q143R/M156Q	40,8	6,4	16 %	0,2	3
{Intercambio de Gla FIX/M19K}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/M[19K]}/Q143R/M156Q	16,7	2,4	14 %	0,5	2
S52A/S60A/ Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q	25,1	1,7	7 %	0,3	3
Intercambio de Gla FIX /S52A/S60A/Q286R/M298Q †	Intercambio de Gla FIX/ S[52]A/S[60]A/Q143R/M156 Q †	6,0	0,1	1 %	0,6	2
{Intercambio de Gla FIX/ M19K/E40L/K43I/Q44S}/Q286R/M29 8Q	{Intercambio de Gla FIX/ M[19]K/E[40]L/K[43I]}/Q[44]S/ Q143R/M156Q	4,9	0,1	1 %	1,6	2
{Intercambio de Gla FIX/K43I}/T128N/P129A/Q286R/M29 8Q †	{Intercambio de Gla FIX/K[43I]}/T[128]N/P[129]A/Q 143R/M 156Q †	10,5	1,3	13 %	0,4	2
T239V	T99V	5,2			1,5	1
T139I	T99I	6,2			1,2	1
T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/ M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/H117A/ Q143R/M156Q	2,6	0,3	11 %	3,0	2
T128N/P129A/S222A/ H257A/Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/S82A/H117A/ Q143R/M156Q †	4,0	0,2	4 %	1,0	2
S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M 298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H117A/Q1 43R/M156Q	11,1	2,7	24 %	0,7	2
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366 N †	T[129]N/P[129]A/Q143R/M156 Q/Q217N †	3,2	0,6	18 %	1,2	2
{Intercambio de Gla FIX/K43I}/Q286R/M298Q/Q366N †	{Intercambio de Gla FIX/K[43I]}/Q143R/M156Q/Q21 7N †	13,0	0,7	5 %	0,3	2
{Intercambio de Gla FIX/K43I}/T[128]N/P[129]A /Q286R/M298Q/Q366N †	{Intercambio de Gla FIX/K[43I]}/T[128]N/P[129]A/Q 143R/M 156Q/Q217N †	13,1	0,3	2 %	0,3	2
T128N/P129A/Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H224 F	6,8	0,0	0 %	1,1	2
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156 Q/H224F	3,1	0,1	4 %	2,4	2
S52A/S60A/Q286R/M298Q/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q/ H224F	23,4	7,5	32 %	0,3	3
T128N/P129A/M298Q/H373F †	T[128]N/P[129]A/M156Q/H224 F †	1,3	0,5	41 %	3,1	2
V21D/Q143R/E154V/M156Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	2,2	0,2	8 %	3,5	2
Intercambio de Gla FIX/S222A/T239V/Q286R	Intercambio de Gla FIX /S82A/T99V/Q143R	19,1	7,7	40 %	0,4	7



ES 2 577 055 T3

Intercambio de Gla FIX /S222A/T239V/Q286R †	Intercambio de Gla FIX /S82A/T99V/Q143R †	14,9	0,4	3 %	0,3	2
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	2,5	0,1	4 %	3,1	2
Intercambio de Gla FIX/ T239V/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/T99V/Q143R/M156Q	22,7	6,8	30 %	0,3	6
Intercambio de Gla FIX/ T239V/Q286R/M298Q †	Intercambio de Gla FIX/T99V/Q143R/M156Q †	25,7	9,2	36 %	0,2	6
T128N/P129A/T239V/Q286R /M298Q †	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/ M156Q †	7,8	0,6	8 %	0,5	2
S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/ M156Q	2,2	0,0	2 %	3,4	2
T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q †	[T128]N/P[129]A/S82A/T99V/H 117A/Q143R/M156Q †	3,6	0,7	18 %	1,1	2
T128N/P129A/T239V/Q286R /M298Q/H373F †	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/ M156Q/H224F †	3,9	0,1	3 %	1,0	2
T239I/Q286R	T99I/Q143R	8,0	0,2	3 %	1,0	2
Intercambio de Gla FIX/S222A/T239I/Q286R	Intercambio de Gla FIX /S82A/T99I/Q143R	39,6	1,2	3 %	0,2	2
Intercambio de Gla FIX / T239I/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/T99I/Q143R/M156Q	13,1	2,1	16 %	0,6	2
T128N/P129A/T239I/Q286R/ M298Q †	[T128]N/P[129]A/T99I/Q143R/ M156Q †	5,1	0,9	18 %	0,8	2
T239I/Q286R/H373F	T99I/Q143R/H224F	7,8	0,1	1 %	1,0	2
V158D/T239V/E296V/M298 Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	1,7	0,6	32 %	4,4	4
V158D/T239V/E296V/M298 Q †	V21D/T99V/E154V/M156Q †	1,9	0,7	36 %	2,1	4
T239V/Q286R	T99V/Q143R	2,3	0,0	1 %	1,7	2
T128N/P129A/T239I/ Q286R/M298Q/H237F †	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/ M156Q/H224F †	3,4	0,0	0 %	1,2	2
Intercambio de Gla FIX/ Q286R/S222A/H257S	Intercambio de Gla FIX/Q143R/S82A/H117S	34,3	9,1	27 %	0,2	3
S222A/Q286R/M298Q/ H373F	S82A/Q143R/M 156Q/H224F	2,1	0,1	6 %	3,7	2
Intercambio de Gla FIX/S222A/ Q286R/M298Q/H373F	Intercambio de Gla FIX S82A/Q143R/M156Q/H224F	9,5	0,9	9 %	0,8	2
T128N/P129A/A175S/ Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/Q217V	6,5	12,0	184 %	1,2	2
A122N/G124S/A175S/ Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/Q217V	13,0	0,6	5 %	0,6	2
T128N/P129A/A175S/ S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A	4,5	0,3	7 %	1,7	2
A122N/G124S/A175S/ S222A	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A	7,0	0,6	9 %	1,1	2
T128N/P129A/A175S/ Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R	8,6	0,1	1 %	0,9	2
A122N/G124S/A175S/ Q286R	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R	8,6	0,0	0 %	0,9	2
Intercambio de Gla FIX/ S222A/Q286R/H373F	Intercambio de Gla FIX/ S82A/Q143R/H224F	40,9	7,5	18 %	0,2	3
Intercambio de Gla FIX/A122N/G124S/A175S/S222A/Q2 86R	Intercambio de Gla FIX/A[122]N/G[124]S/A39S/S8 2A/Q143R	43,7	14,0	32 %	0,2	2
T128N/P129A/A175S/ Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/ M156Q	5,5	0,0	0 %	1,4	2
A122N/G124S/A175S/ Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R /M156Q	5,3	0,1	2 %	1,4	2
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/ Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/H 117A/Q143R/M156Q	6,7	0,8	11 %	1,1	2
A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/ Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/ H117A/Q143R/M156Q	7,7	0,6	8 %	1,0	2
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q /H373F	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/ M156Q/H224F	7,4	3,2	43 %	1,0	2
A122N/G124S/A175S/ Q286R/M298Q/H373F	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R /M156Q/H224F	5,0	0,1	3 %	1,5	2
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F	V21 D/Q143R/E154V/M156Q/H224 F	1,7	0,5	27 %	4,5	3
M298Q/Q366N/H373F †	M156Q/Q217N/H224F †	1,6	0,9	60 %	2,5	4
T239V/M298Q/H373F †	T99V/M156Q/H224F †	3,5	0,4	11 %	1,1	2
T239I/M298Q/H373F †	T99I/M156Q/H224F	2,3	0,6	24 %	1,7	4
T128N/P129A/Q286R/	T[128]N/P[129]A/Q143R/	2,6	0,6	23 %	1,5	2

M298Q/Q366N/H373F †	M156Q/Q217N/H224F †					
T239V/Q286R/M298Q /Q366N †	T99V/Q143R/M156Q /Q217N †	4,1	0,3	8 %	0,9	2
T239I/Q286R/M298Q/Q366N †	T99I/Q143R/M156Q/Q217N †	2,4	0,6	27 %	1,6	2
† producido en células CHOX						
§ producido en el clon de línea celular estable CHOX 52-5F7						

### Ejemplo 11

#### Inhibición de variantes de FVIIa por Zn<sup>2+</sup>

5 Se ensayaron variantes de FVIIa, expresadas a partir de células HEK 293 o BHK, con respecto a resistencia a la inhibición por Zn<sup>2+</sup> tanto en presencia como en ausencia de factor tisular soluble. Brevemente, se diluyó ZnCl<sub>2</sub> (Aldrich) a 20 mM en dH<sub>2</sub>O y después a 4 mM en tampón de ensayo 1x (Na Hepes 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Tween-20 0,01 % y PEG-8000 0,01 %). Se realizaron diluciones dobles en serie para generar once concentraciones de cinc, hasta 3,9 μM, a través de una placa de 96 pocillos. El último pocillo en la fila contenía tampón sin cinc para medir la actividad proteolítica de FVIIa no inhibido. Las variantes de FVIIa, y la proteasa de tipo silvestre, se diluyeron hasta 500 nM y después de nuevo 10 veces hasta 50 nM. Esta solución de reserva 50 nM se usó para ensayos realizados sin factor tisular soluble (FTs, R&D Systems). Para ensayos con factor tisular soluble, la proteasa se diluyó de nuevo en tampón de ensayo 1X con FTs hasta concentraciones finales de 12,5 nM y 125 nM, respectivamente. Las soluciones se preincubaron durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente.

Para comenzar la reacción de inhibición, se mezclaron 20 μl de la solución de FVIIa/FTs o FVIIa con 60 μl de la serie de cinc en cada fila para diez concentraciones. Para reacciones de inhibición solamente con FVIIa, las mezclas se iniciaron usando ZnCl<sub>2</sub> 2 mM, y para FVIIa/FTs, se iniciaron usando ZnCl<sub>2</sub> 4 mM. La placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para ensayar la inhibición por Zn<sup>2+</sup>, se añadieron 20 μl de sustrato de FVIIa (Mesil-dFPR-ACC, disuelto hasta 20 mM en DMSO y diluido en tampón de ensayo) a los pocillos hasta una concentración final de 90 μM. Las concentraciones de FTs y cinc se mantuvieron en el ensayo añadiéndolas según fuera apropiado a la solución de sustrato. El aumento de fluorescencia (Ex: 380 nm, Em: 460 nm) se midió durante 60 minutos a 30 °C en un lector de placas Spectramax Gemini M5 (Molecular Devices). La actividad proteolítica residual se calculó a cada concentración de cinc dividiendo la tasa inhibida por la tasa de proteasa no inhibida. Se calculó la concentración de Zn<sup>2+</sup> necesaria para inhibir la mitad de la actividad proteolítica (K<sub>0,5</sub>) representando la concentración de cinc frente a actividad residual, y ajustando con una ecuación hiperbólica usando software XLFit4 (IDBS). Cada proteasa se ensayó dos veces en dos ocasiones separadas para obtener un valor promedio para la K<sub>0,5</sub>.

Los resultados se proporcionan en la Tabla 27. Las mutaciones de H257 y H216 aumentaron la resistencia aproximadamente 3 veces. Las mutaciones M268Q también aumentaron la resistencia a cinc 3 veces. En todos los casos, el efecto se conservó en grados diferentes cuando se combinó con mutaciones adicionales. Las variantes más resistentes fueron combinaciones de las mutaciones anteriores: H216A/H257A-FVIIa y H257A/M298Q-FVIIa.

**Tabla 27. Inhibición de variantes de FVIIa por Zn<sup>2+</sup>**

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K <sub>0,5</sub> (mM)	
		HEK 293	BHK
WT	WT	87,0	42,0
M298Q	M156Q	187,3	
Q286R	Q143R	30,1	22,5
H216S	H76S	231,0	
H216A	H76A	244,5	
H216K	H76K	248,8	
H216R	H76R	316,5	
S222A	S82A	87,5	63,8
S222K	S82K	73,0	
H257A	H117A	217,5	113,0
H257S	H117S	149,7	128,0
K161S	K24S	51,5	

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K <sub>0,5</sub> (mM)	
		HEK 293	BHK
K161A	K24A	73,5	
K161V	K24V	79,5	
Q286R/S222A	S82A/Q143R		24,5
Q286R/S222A/ Intercambio de Gla FIX	S82A/Q143R/intercambio de Gla FIX	34,0	
S222A/M298Q	S82A/M156Q	138,0	
H257A/M298Q	H117A/M156Q	481,0	
S222A/H257A/Q286R/M298 Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	180,6	
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V	40,5	
S222V	S82V	86,8	
S222D	S82D	89,5	
S222N	S82N	94,6	
S222E	S82E	110,5	
H216A/H257A	H76A/H117A	407,5	
H216A/S222A	H76A/S82A	226,0	
H257S/Q286R	H117S/Q143R	316,5	
S222A/H373A	S82A/H224A	94,0	

### Ejemplo 12

#### Determinación de la concentración de proteasa catalíticamente activa usando el titulante de sitio activo 4-metilumbeliferil *p*'-guanidinobenzoato (MUGB)

En algunos casos, la concentración de FVIIa catalíticamente activo en una solución de reserva se determinó valorando un complejo de FVIIa y factor tisular soluble (FTs) con 4-metilumbeliferil *p*'-guanidinobenzoato (MUGB), un sustrato de éster fluorogénico desarrollado como un sitio activo para serina proteasa de tipo tripsina. El ensayo se llevó a cabo esencialmente como se describe en Payne *et al.* (Biochemistry (1996) 35: 7100-7106) con algunas modificaciones menores. MUGB reacciona fácilmente con FVIIa, pero no FVII o proteasa inactiva, para formar un intermedio de acil-enzima eficazmente estable en condiciones en las que la concentración de MUGB es saturante y la desacilación es especialmente lenta y limitante de la velocidad para catálisis. En estas condiciones, la proteasa FVIIa experimenta una única renovación catalítica para liberar el fluoróforo 4-metilumbeliferona (4-MU). Cuando se calibre el estallido inicial de fluorescencia a una curva patrón de concentración externa de fluorescencia de 4-MU, puede calcularse la concentración de sitios activos.

Se realizaron ensayos con un volumen de reacción de 1 ml o 2 ml en una cubeta de cuarzo de 0,4 cm x 1 cm o 1 cm x 1 cm, respectivamente, con agitación continua. Cada reacción contenía FTs 0,5  $\mu$ M (R&D Systems Human) en un tampón de ensayo que contenía Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM y PEG 8000 0,1 %, pH 7,6. La solución patrón de 4-MU se preparó nueva a una concentración de reserva de 0,5 M en DMSO y la concentración se confirmó mediante espectroscopia de absorbancia a 360 nm usando un coeficiente de extinción de 19.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> en tampón Tris 50 mM, pH 9,0. Se preparó MUGB a una concentración de reserva de 0,04 M en DMSO basándose en el peso seco. Se iniciaron ensayos añadiendo 4  $\mu$ l de MUGB 4 mM (para la reacción de 2,0 ml) o MUGB 2 mM (para la reacción de 1,0 ml) (en cada caso una concentración final de 8  $\mu$ M) a una solución de FTs 0,5  $\mu$ M (20,2  $\mu$ l o 10,1  $\mu$ l de FTs 49,4  $\mu$ M) en tampón de ensayo 1x y midiendo en primer lugar la hidrólisis de fondo de MUGB durante ~150-200 segundos antes de la adición de FVIIa o una variante de FVIIa a una concentración final de ~100-200 nM basándose en el ELISA inicial (Ejemplo 1C.1) o la valoración del sitio activo con FFR-CMK (Ejemplo 3). La liberación de fluorescencia de 4-MU en la fase de estallido de la reacción se siguió durante 1000-1200 segundos adicionales. Se preparó una curva patrón de 4-MU libre por valoración de la 4-MU calibrada por absorbancia en tampón de ensayo 1x que contenía FTs 0,5  $\mu$ M en etapas de 20 nM hasta una concentración final de 260-300 nM.

Para análisis de datos, se importaron trazas de reacción al paquete de software Graphpad Prism y se restó la contribución de hidrólisis de fondo de la curva por extrapolación de la tasa medida inicial de hidrólisis de MUGB

espontánea, que era típicamente menor de 5 % del estallido de fluorescencia total. La curva corregida se ajustó a una única ecuación exponencial con un componente lineal (para explicar la lenta velocidad de desacilación) de la forma  $\Delta\text{fluorescencia} = \text{Amp}(1 - e^{-kt}) + Bt$ , donde Amp = la amplitud de la fase de estallido en las condiciones de ensayo de saturación representadas anteriormente, k es la constante de velocidad de primer orden observada para formación de acil-enzima y B es una constante de velocidad aparente asociada con la renovación completa de MUGB. La concentración de proteasa FVIIa activa se calcula por comparación del parámetro de ajuste con respecto a amplitud para la curva patrón de 4-MU. Se midieron los valores de múltiples ensayos, se promediaron y se determinó la desviación típica.

## 10 Ejemplo 13

### Actividad específica de polipéptidos variantes de FVIIa para mesil-dFPR-ACC

15 Para evaluar la actividad de variantes de FVIIa, se determinó la actividad (actividad/mol) de polipéptidos de FVIIa para escisión de un sustrato de ACC tripeptídico (Mesil-dFPR-ACC) en un conjunto de condiciones de ensayo normalizadas. El ensayo implicaba una preincubación de polipéptidos de FVIIa con una cantidad de saturación de FTs antes de dilución en el sustrato de mesil-dFPR-ACC. Las tasas iniciales de escisión de sustrato se siguieron después por la evaluación del aumento de fluorescencia de ACC. Las fases iniciales de liberación de fluorescencia se normalizaron a una curva patrón de ACC interna y se presentaron los datos como  $\mu\text{moles/s}/\mu\text{moles}$  de FVIIa.

20 Para preparar las reacciones, cada muestra de FVIIa para ensayar se diluyó en una placa de almacenamiento de polipropileno hasta 200 nM en tampón de ensayo 1x (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, BSA 0,1 %, PEG-8000 0,1 %, pH 7,5). Cuando fue necesario, se preparó una dilución 1:10 del FVIIa de reserva de modo que el volumen pipeteado mínimo fue de 5  $\mu\text{l}$ . Se preparó una dilución de factor tisular soluble (FTs) de reserva (R&D Systems) hasta una concentración final de 1,0  $\mu\text{M}$  con un volumen apropiado de tampón de ensayo 1X necesario para dar cuenta de la exploración de 8 a 32 proteasas/placa. Por ejemplo, cuando se ensayaron 8 proteasas, se requirieron 1,0 ml de FTs 1,0  $\mu\text{M}$ /placa, mientras que para ensayar 32 proteasas, se requirieron 2,5 ml de FTs/placa. Las muestras de FVIIa formaron complejo con FTs a una concentración final de FVIIa 100 nM/FTs 500 nM en un volumen de ensayo de 50  $\mu\text{l}$  mezclando 25  $\mu\text{l}$  de variante de FVIIa 200 nM con 25  $\mu\text{l}$  de FTs 1,0  $\mu\text{M}$  en la placa de almacenamiento de polipropileno. Después se incubaron reacciones de complejo de FVIIa/FTs a temperatura ambiente durante 15 minutos para alcanzar el equilibrio. Después del periodo de equilibrado, se distribuyeron 10  $\mu\text{l}$  de cada reacción de complejo de FVIIa/FTs a la fila correspondiente de una placa de ensayo negra de media área de 96 pocillos (Costar). Las variantes de FVIIa y controles se ensayaron por triplicado. El sustrato de mesil-dFPR-ACC se preparó hasta 1,1X la concentración final de 0,09 mM para dar cuenta de la dilución 1:10 del polipéptido de FVIIa en sustrato. Para una placa de media área de 96 pocillos completa, se prepararon 20 ml de sustrato de mesil-dFPR-ACC 0,1 mM en tampón de ensayo 1X por dilución del sustrato de reserva almacenado en DMSO seco.

40 El ensayo se procesó en una estación de trabajo automática BioMek® FX (Beckman Coulter) equipada con una cabeza de 96 puntas (puntas de 130  $\mu\text{l}$  MBP BioRobotix ART®). La placa de ensayo (predistribuida con 10  $\mu\text{l}$  de las reacciones de FVIIa/FTs) se colocó en la cubierta de la estación de trabajo con un depósito de un único canal cargado de la solución de mesil-dFPR-ACC 1,1 X. La temperatura del lector de placas se ajustó a 37 °C. La estación de trabajo BioMek® FX inició el ensayo transfiriendo 90  $\mu\text{l}$  desde el depósito de un único canal cargado con el sustrato de mesil-dFPR-ACC 1,1X a cada pocillo de la placa de ensayo negra que contenía 10  $\mu\text{l}$  de FVIIa/FTs. Las concentraciones finales de las variantes de FVIIa, FTs y la concentración de Mesil-dFPR-ACC en el ensayo fueron de 10 nM, 50 nM y 0,09 mM, respectivamente. La estación de trabajo mezcló después 70  $\mu\text{l}$  de la muestra de 100  $\mu\text{l}$  dos veces. La placa de ensayo negra se transfirió a un lector de placas SpectraMax Gemini (Molecular Devices) y las velocidades de reacción iniciales se siguieron durante 10 minutos a 37 °C.

50 Después de completar el ensayo, se leyó una placa que contenía una curva patrón de ACC libre (100  $\mu\text{l}$ /pocillo) en el mismo lector de placas SpectraMax Gemini y se usó para proporcionar una conversión precisa de UFR/s a  $\mu\text{M/s}$ . La placa convencional se preparó de la siguiente manera. En todos los pocillos "de número par" (es decir cada segundo pocillo) de la fila superior de una placa de ensayo de media área negra de 96 pocillos, la muestra de ACC 1 mM se diluyó a 25 nM en Tampón de Ensayo 1X hasta un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  (5  $\mu\text{l}$  de ACC 1 mM en 195  $\mu\text{l}$  de Tampón de Ensayo 1x). Se pipetearon cien  $\mu\text{l}$  de Tampón de Ensayo 1x en todos los pocillos restantes de las columnas "de número par". El sustrato de ACC se diluyó en serie 1:1 por las columnas pares para generar 6 concentraciones de ACC más. La última fila se dejó solamente con 100  $\mu\text{l}$  de Tampón de Ensayo 1x (es decir sin ACC). La fluorescencia se midió usando una versión de lectura de puntos finales de las condiciones de ensayo y se representó una gráfica de fluorescencia frente a concentración de ACC. La pendiente de la línea a través de estos puntos proporcionó el factor de conversión de UFR a  $\mu\text{M}$ .

60 Se usó software SoftMax Pro (Molecular Devices) para analizar los datos para la lectura de placas así como la curva patrón. El archivo que contenía los datos se guardó y se exportó como un archivo de texto ASCII, que se importó al programa Microsoft Excel, se procesó y se analizó usando una plantilla creada en Microsoft Excel. Tras importar los datos a la plantilla de Microsoft Excel, se calculó el promedio de conversión de UFR/ $\mu\text{M}$  a partir de la pendiente de la curva patrón de ACC y se usó para proporcionar un factor de conversión que cambió los datos de placas de UFR/s a

la medición de actividad en  $\mu\text{M/s}$ . Todos los valores por triplicado se evaluaron con respecto a valores extremos, que se excluyeron si fue necesario. La actividad específica de cada variante de FVIIa y controles de tipo silvestre se expresó en las unidades de  $\mu\text{mol/s}/\mu\text{mol}$ , y se calculó por las siguientes expresiones:

5 **Datos promedio (UFR/s) \* factor de conversión (UFR/ $\mu\text{M}$ ) = Actividad (en  $\mu\text{M/s}$ )**  
**Actividad específica (en  $\mu\text{mol/s}/\mu\text{mol}$ ) =  $[(\mu\text{M/s}) * (100 \mu\text{l}) * (1/1000000)] / [(10 \text{ nM}) * (100 \mu\text{l}) * (1/1000000) * (1/1000)]$**

10 La Tabla 28 expone la actividad específica de las variantes de FVIIa que se ensayaron, incluyendo la actividad relativa al FVIIa de tipo silvestre. También se incluyen la desviación típica (DT) y el coeficiente de variación (como porcentaje; %CV). Varias variantes de FVIIa mostraron actividad específica aumentada para escisión de Mesil-dFPR-ACC en comparación con el polipéptido de FVIIa de tipo silvestre. Por ejemplo, Q366V-FVIIa mostró actividad específica para escisión de Mesil-dFPR-ACC que era 4 veces mayor que la observada con la variante de FVIIa de tipo silvestre. Las variantes de FVIIa que contenían la mutación H373F también tendían a mostrar actividad específica aumentada para escisión de Mesil-dFPR-ACC en comparación con el polipéptido de FVIIa de tipo silvestre.

**Tabla 28. Actividad específica de polipéptidos de FVIIa para Mesil-dFPR-ACC**

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Actividad ( $\mu\text{mol} / \text{s}/\mu\text{mol}$ )	DT	%CV	Actividad (% WT)	n
WT (NovoSeven®)	WT (NovoSeven®)	2,31	0,34	0,15	100 %	3
WT	WT	2,40	0,15	0,06	104 %	4
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	2,50			108 %	1
Intercambio de Gla FIX	Intercambio de Gla FIX	1,63			71 %	1
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	2,24			97 %	1
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A	1,95			85 %	1
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	3,28			142 %	1
T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q	T[128]N/P[129]A/V21D/E154V/M156Q	3,26			142 %	1
S52A/S60A/V158D/E296V/M1298Q	S[52]A/S[60]A/V21D/E154V/M156Q	2,56			111 %	1
Q286R	Q143R	1,24			54 %	1
T128N/P129A/Q286R	T[128]N/P[129]A/Q143R	1,21			52 %	1
S52A/S60A/Q286R	S[52]A/S[60]A/Q143R	0,44	0,11	0,25	19 %	2
S222A	S82A	2,35			102 %	1
T128N/P129A/S222A	T[128]N/P[129]A/S82A	2,70			117 %	1
S52A/S60A/S222A	S[52]A/S[60]A/S82A	1,22			53 %	1
H257S	H117S	2,64			115 %	1
H373F	H224F	1,17			51 %	1
Q366V	Q217V	9,29			403 %	1
Intercambio de Gla FIX/Q366V	Intercambio de Gla FIX/Q217V	2,82			122 %	1
K109N/A175S	K[109]N/A39S	3,38			147 %	1
Q286R/H257A	Q143R/H117A	1,96			85 %	1
Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/S222A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/T[128]N/P[129]A/S82A/Q143R	0,53			23 %	1
Intercambio de Gla FIX/S52A/S60A/S222A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/S[52]A/S[60]A/S82A/Q143R	0,44	0,42	0,96	19 %	2
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	1,91	0,11	0,06	83 %	5
Intercambio de Gla FIX/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/Q143R/M156Q	1,53			66 %	1
T128N/P129A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	1,80			78 %	1

ES 2 577 055 T3

Intercambio de Gla FIX/T128N/P129A/Q286R/ M298Q	Intercambio de Gla FIX/T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	0,78			34 %	1
{Intercambio de Gla FIX/E40L}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/E[40]L}/Q143R/M156Q	1,16			50 %	1
{Intercambio de Gla FIX/K43I}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/K[43]I}/Q143R/M156Q	1,20			52 %	1
{Intercambio de Gla FIX/Q44S}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/Q[44]S}/Q143R/M156Q	1,11			48 %	1
{Intercambio de Gla FIX/M19K}/Q286R/M298Q	{Intercambio de Gla FIX/M[19]K}/Q143R/M156Q	1,26			55 %	1
S52A/S60A/ Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q143R/ M156Q	1,08	0,1 7	0,1 5	47 %	2
T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/ M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/H117A/Q143 R/M156Q	1,66			72 %	1
S52A/S60A/S222A/ H257A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H117A/Q143R/ M156Q	0,98			42 %	1
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	2,00	0,1 7	0,0 8	87 %	2
S222A/H257A/Q286R/ Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	2,43			105 %	1
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	2,35			102 %	1
Q286R/H373F	Q143R/H224F	0,78			34 %	1
T128N/P129A/ Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/ H224F	2,31			100 %	1
S52A/S60A/ Q286R/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/ H224F	3,14			136 %	1
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	4,59			199 %	1
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/H22 4F	2,83			123 %	1
S52A/S60A/Q286R/M298Q/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/ M156Q/H224F	5,02			218 %	1
M298Q/H373F	M156Q/H224F	4,00			174 %	1
V21D/Q143R/E154V/M156Q	V21D/Q143R/E154V/ M156Q	1,83			79 %	1
S222A/T239V	S82A/T99V	1,91			83 %	1
Intercambio de Gla FIX/S222A/T239V/Q286R	Intercambio de Gla FIX /S82A/T99V/Q143R	0,66			28 %	1
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	1,74			75 %	1
Intercambio de Gla FIX/ T239V/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/T99V/Q143R/M156Q	1,13			49 %	1
S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q	1,66			72 %	1
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	1,53			66 %	1
T239V/Q286R/M298Q/H373F	T99V/Q143R/M156Q/ H224F	3,07			133 %	1
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	2,24			97 %	1
T239I/Q286R	T99I/Q143R	0,88			38 %	1
S222A/T239I	S82A/T99I	1,36			59 %	1
Intercambio de Gla FIX/S222A/T239I/Q286R	Intercambio de Gla FIX /S82A/T99I/Q143R	0,25			11 %	1
T239I/Q286R/M298Q	T99I/Q143R/M156Q	1,37			60 %	1
Intercambio de Gla FIX / T239I/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX/T99I/Q143R/M156Q	0,67			29 %	1
S222A/T239I/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99I/H117A/Q143R/M156Q	1,41			61 %	1
T239I/Q286R/H373F	T99I/Q143R/H224F	1,24			54 %	1
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/ M156Q	2,19	0,1 5	0,0 7	95 %	3
T239V/Q286R	T99V/Q143R	1,26	0,1 4	0,1 1	55 %	2
T239I/Q286R/M298Q/H237F	T99I/Q143R/M156Q/H224F	1,59	0,2 1	0,1 3	69 %	3
H257S/Q286R/M298Q	H117S/Q143R/M156Q	1,85	0,2 3	0,1 3	80 %	2

Intercambio de Gla FIX/Q286R/S222A/H257S	Intercambio de Gla FIX /Q143R/S82A/H117S	0,49	0,0 4	0,0 9	21 %	2
S222A/H257S/Q286R/ M298Q	S82A/H117S/Q143R/M156Q	1,77	0,2 3	0,1 3	77 %	2
H257S/Q286R/M298Q/ H373F	H117S/Q143R/M156Q/H224F	2,32	0,4 1	0,1 8	101 %	3
S222A/Q286R/M298Q/ H373F	S82A/Q143R/M156Q/ H224F	2,79	0,3 9	0,1 4	121 %	2
Intercambio de Gla FIX/S222A/Q286R/M298Q/H373F	Intercambio de Gla FIX/S82A/Q143R/M156Q/H224F	1,92			83 %	1
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	1,90			82 %	1
Intercambio de Gla FIX/ S222A/Q286R/M298Q	Intercambio de Gla FIX S82A/Q143R/M156Q	1,12			49 %	1
T128N/P129A/A175S/ Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/ Q217V	3,40			148 %	1
A122N/G124S/A175S/ Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/ Q217V	2,34	0,2 2	0,0 9	101 %	2
T128N/P129A/A175S/ S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/ S82A	3,19			138 %	1
A122N/G124S/A175S/ S222A	A[122]N/G[124]S/A39S/ S82A	2,68	0,3 0	0,1 1	116 %	2
T128N/P129A/A175S/ Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/ Q143R	1,88			81 %	1
A122N/G124S/A175S/ Q286R	A[122]N/G[124]S/A39S/ Q143R	2,16	0,4 2	0,2 0	94 %	2
Intercambio de Gla FIX/ S222A/Q286R/H373F	Intercambio de Gla FIX/ S82A/Q143R/H224F	1,37	0,2 6	0,1 9	60 %	2
V158D/E296V/M298Q/ H373F	V21D/E154V/M156Q/ H224F	5,60			243 %	1
H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	2,18			95 %	1
Intercambio de Gla FIX/ T128N/P129A/A175S/S222A/Q286R	Intercambio de Gla FIX/T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/Q1 43R	0,75			32 %	1
Intercambio de Gla FIX/A122N/G124S/A175S/S222A/Q2 86R	Intercambio de Gla FIX/A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/Q1 43R	0,89			38 %	1
T128N/P129A/A175S/ Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156 Q	2,02			88 %	1
A122N/G124S/A175S/ Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156 Q	3,03			131 %	1
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/ Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/H117A/ Q143R/M156Q	2,18			95 %	1
A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/ Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/H117A/ Q143R/M156Q	1,99			86 %	1
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q /H373F	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156 Q/H224F	2,78			121 %	1
A122N/G124S/A175S/ Q286R/M298Q/H373F	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156 Q/H224F	2,71			118 %	1
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F	V21D/Q143R/E154V/M156Q/H224F	1,89			82 %	1

### Ejemplo 15

#### 5 Activación de FX y determinación de la concentración de proteasa catalíticamente activa usando el titulante de sitio activo fluoresceína-mono-*p'*-guanidinobenzoato (FMGB)

La concentración del Factor X (FX), que es capaz de hacerse catalíticamente activo, en una solución de reserva del cimógeno se determinó por activación de muestras de FX con Veneno de Víbora de Russell (RVV-asa) seguido de valoración del Factor X activo (FXa) con fluoresceína-mono-*p'*-guanidinobenzoato (FMGB), un sustrato de éster fluorogénico desarrollado como un titulante de sitio activo para serina proteasas de tipo tripsina. Después de la activación, se llevó a cabo el ensayo de valoración de sitio activo esencialmente como se describe en Bock *et al.* (Archives of Biochemistry and Biophysics (1989) 273: 375-388) con algunas modificaciones menores. FMGB reacciona fácilmente con FXa, pero no FX o proteasa inactiva, para formar un intermedio de acil enzima eficazmente estable en condiciones en las que la concentración de FMGB es de saturación y la desacilación es especialmente lenta y limitante de la velocidad para catálisis. En estas condiciones, la proteasa FXa experimenta una única renovación catalítica para liberar el fluoróforo fluoresceína. Cuando el estallido inicial de fluorescencia se calibra a una curva patrón de concentración externa de fluorescencia de fluoresceína, puede calcularse la concentración de

sitios activos.

Se prepararon reacciones de activación de FXa a una concentración final de FX 10  $\mu\text{M}$  (basado en la absorbancia  $A_{280}$  y un coeficiente de extinción de 1,16) en un volumen final de 50 - 100  $\mu\text{l}$  en un tampón de reacción que contiene  
 5 Tris 100 mM, NaCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, PEG 8000 0,1 %, pH 8,1. La activación se inició mediante la adición de RVV-asa hasta una concentración final de 5  $\mu\text{g/ml}$  (5  $\mu\text{l}$  de una dilución de 98  $\mu\text{l/ml}$  por cada 100  $\mu\text{l}$  de reacción o 2,5  $\mu\text{l}$  por cada 50  $\mu\text{l}$  de reacción) a 37  $^\circ\text{C}$  durante 45-60 minutos de tiempo de activación (previamente determinado para representar la activación completa recogiendo muestras cada 15 minutos y ensayando el aumento en escisión  
 10 de sustrato fluorogénico Spectrafluor FXa). Las reacciones se detuvieron con un volumen 1/10 de tampón de inactivación que contenía Tris 100 mM, NaCl 50 mM, 5 mM, EDTA 100 mM, PEG 8000 0,1 %, pH 8,1.

Se realizaron ensayos con un volumen de reacción de 1 ml en una cubeta de cuarzo de 0,4 cm x 1 cm con agitación continua. Las reacciones contenían 100-400 nM del FXa recién activado y FMGB 5  $\mu\text{M}$  en un tampón de ensayo que contenía Hepes 30 mM, NaCl 135 mM, EDTA 1 mM y PEG 8000 0,1 %, pH 7,4. La solución convencional de fluoresceína se preparó nueva a una concentración de reserva de 70 mM en DMF y la concentración se confirmó por  
 15 espectroscopia de absorbancia en condiciones convencionales a 496 nm usando un coeficiente de extinción de 89.125  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  en NaOH 0,1 N. Se preparó FMGB a una concentración de reserva de 0,01 M en DMF basándose en el peso seco y la concentración se confirmó por espectroscopia de absorbancia a 452 nm usando un coeficiente de extinción de 19.498 en Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS), pH 7,2. Los ensayos se iniciaron  
 20 añadiendo 5  $\mu\text{l}$  de FMGB 1 mM (concentración final 5  $\mu\text{M}$ ) a tampón de ensayo 1x y midiendo en primer lugar la hidrólisis de fondo de FMGB durante ~150-200 segundos antes de la adición de FXa a una concentración final de ~100-400 nM basándose en la concentración inicial determinada por absorbancia antes de la activación por RVV-asa (véase anteriormente). La liberación de fluorescencia de fluoresceína en la fase de estallido de la reacción se siguió durante 3600 segundos adicionales. Se preparó una curva patrón de fluoresceína libre por valoración del  
 25 patrón de fluoresceína calibrado para absorbancia en tampón de ensayo 1x en etapas de 20 nM hasta una concentración final de 260-300 nM.

Para análisis de datos, se importaron trazas de reacción en el paquete de software Graphpad Prism y se restó la contribución de hidrólisis de fondo de la curva por extrapolación de la velocidad medida inicial de hidrólisis de FMGB espontánea, que era típicamente menor del 5 % del estallido de fluorescencia total. La curva corregida se ajustó a una única ecuación exponencial con un componente lineal (para dar cuenta de la lenta velocidad de desactivación) de la forma  $\Delta\text{fluorescencia} = \text{Amp}(1 - e^{-kt}) + Bt$ , donde Amp = la amplitud de la fase de estallido en las condiciones de ensayo de saturación perfiladas anteriormente,  $k$  es la constante de velocidad de primer orden observada para la  
 30 formación de acil-enzima y B es una constante de velocidad aparente asociada con renovación completa de FMGB. La concentración de proteasa de FXa activa se calculó por comparación del parámetro de ajuste para amplitud con la curva de patrón de fluoresceína. Se midieron los valores de múltiples ensayos, se promediaron y se determinó la desviación típica. La cantidad de FXa activo en la preparación representa por lo tanto directamente la concentración de FX en una preparación de reserva, que puede activarse por FVIIa. Este valor valorado para sitio activo se emplea cuando se calcula la concentración de FX para usar en un ensayo indirecto tal como los ensayos dependientes de  
 35 FT e independientes de FT descritos en el Ejemplo 4.

Ya que las modificaciones no resultarán evidentes para los expertos en la materia, se pretende que la presente invención se limite solamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

#### 45 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Catalyst Biosciences, Inc.  
 Edwin Madison  
 Christopher Thanos

50 <120> POLIPÉPTIDOS DE FACTOR VII QUE SE MODIFICAN Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 3800003.00236 (4919EP)

55 <140> Desconocido  
 <141> Presentado con la presente

<150> 61/124.021  
 <151> 11-04-2008

60 <160> 371

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

65 <210> 1



<211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>  
 <223> Isoforma a de precursor del Factor VII

<400> 1

```

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

10

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

<210> 2  
 <211> 444  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Isoforma b de precursor del Factor VII

10 <400> 2

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

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

<210> 3  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Factor VIIa maduro

<400> 3

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

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

<210> 4  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

5

<220>  
 <223> Precursor del Factor VII

10

<400> 4

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

Asp Pro Gly Ala Gly Arg Phe Cys Trp Cys His Glu Gly Tyr Ala Leu  
 145 150 155  
 Gln Ala Asp Gly Val Ser Cys Ala Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly  
 165 170 175  
 Lys Ile Pro Val Leu Glu Lys Arg Asn Gly Ser Lys Pro Gln Gly Arg  
 180 185 190  
 Ile Val Gly Gly His Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala  
 195 200 205  
 Met Leu Lys Leu Asn Gly Ala Leu Leu Cys Gly Gly Thr Leu Val Gly  
 210 215 220  
 Pro Ala Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Glu Arg Leu Arg Ser  
 225 230 235 240  
 Arg Gly Asn Leu Thr Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Arg Val  
 245 250 255  
 Glu Gly Pro Glu Gln Glu Arg Arg Val Ala Gln Ile Ile Val Pro Lys  
 260 265 270  
 Gln Tyr Val Pro Gly Gln Thr Asp His Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu  
 275 280 285  
 Ala Gln Pro Val Ala Leu Gly Asp His Val Ala Pro Leu Cys Leu Pro  
 290 295 300  
 Asp Pro Asp Phe Als Asp Gln Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Ala  
 305 310 315 320  
 Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Glu Arg Gly Val Thr Ala Arg Lys  
 325 330 335  
 Leu Met Val Val Leu Val Pro Arg Leu Leu Thr Gln Asp Cys Leu Gln  
 340 345 350  
 Gln Ser Arg Gln Arg Pro Gly Gly Pro Val Val Thr Asp Asn Met Phe  
 355 360 365  
 Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser  
 370 375 380  
 Gly Gly Pro His Ala Thr Arg Phe Arg Gly Thr Trp Phe Leu Thr Gly  
 385 390 395 400  
 Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Ala Ala Gly His Phe Gly Ile  
 405 410 415  
 Tyr Thr Arg Val Ser Arg Tyr Thr Ala Trp Leu Arg Gln Leu Met Gly  
 420 425 430  
 His Pro Pro Ser Arg Gln Gly Phe Gln Val Pro Leu Leu Pro  
 435 440 445

<210> 5  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<220>  
 <223> Precursor del Factor VII

<400> 5

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

Cys	Leu	Leu	Asp	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Lys	Ser	Lys	Asn	Glu
		115						120					125		
Gln	Leu	Ile	Cys	Ala	Asn	Glu	Asn	Gly	Asp	Cys	Asp	Gln	Tyr	Cys	Arg
		130				135					140				
Asp	His	Val	Gly	Thr	Lys	Arg	Thr	Cys	Ser	Cys	His	Glu	Asp	Tyr	Thr
145					150					155					160
Leu	Gln	Pro	Asp	Glu	Val	Ser	Cys	Lys	Pro	Lys	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys
				165					170					175	
Gly	Arg	Ile	Pro	Val	Val	Glu	Lys	Arg	Asn	Ser	Ser	Ser	Arg	Gln	Gly
			180					185					190		
Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Asn	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln
		195					200					205			
Ala	Val	Leu	Lys	Ile	Asn	Gly	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Val	Leu	Leu
		210				215					220				
Asp	Ala	Arg	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Asn	Ile	Arg
225				230						235					240
Tyr	Trp	Gly	Asn	Ile	Thr	Val	Val	Met	Gly	Glu	His	Asp	Phe	Ser	Glu
				245					250					255	
Lys	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Val	Arg	Arg	Val	Thr	Gln	Val	Ile	Met	Pro
			260					265					270		
Asp	Lys	Tyr	Ile	Arg	Gly	Lys	Ile	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg
		275					280					285			
Leu	His	Arg	Pro	Val	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu
		290				295					300				
Pro	Glu	Lys	Ser	Phe	Ser	Glu	Asn	Thr	Leu	Ala	Arg	Ile	Arg	Phe	Ser
305					310					315					320
Arg	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu
				325					330					335	
Glu	Leu	Met	Ser	Ile	Glu	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu
			340					345					350		
Glu	His	Ala	Lys	His	Ser	Ser	Asn	Thr	Pro	Lys	Ile	Thr	Glu	Asn	Met
		355					360					365			
Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Met	Asp	Gly	Thr	Lys	Asp	Ala	Cys	Lys	Gly	Asp
		370				375					380				
Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	His	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr
385					390					395					400
Gly	Val	Val	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	Ala	Ala	Ile	Gly	His	Ile	Gly
				405					410					415	
Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Asp	Trp	Leu	Val	Arg	His	Met
			420					425					430		
Asp	Ser	Lys	Leu	Gln	Val	Gly	Val	Phe	Arg	Leu	Pro	Leu	Leu		
		435					440						445		

<210> 6  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Pan paniscus*

5

<220>  
 <223> Precursor del Factor VII

10

<220>  
 <221> INCIERTO

<222> (0)...(0)  
 <223> Xaa podría ser cualquier aminoácido

15

<400> 6

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Glu Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Ile Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Leu Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr Tyr  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Asn Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Xaa Leu Leu Xaa Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Ala Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Ile Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Ala Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Ser Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 7  
 <211> 466  
 <212> PRT

<213> *Pan troglodytes*

<220>

<223> Precursor del Factor VII

5

<220>

<221> INCIERTO

<222> (0)...(0)

10

<223> Xaa podría ser cualquier aminoácido

<400> 7



Met	Val	Ser	Gln	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gln
1				5					10					15	
Gly	Cys	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Glu	Ala	Ser	Gly	Gly	Glu	Thr
			20					25					30		
Arg	Asp	Xaa	Xaa	Trp	Lys	Pro	Gly	Pro	His	Arg	Val	Phe	Ile	Thr	Gln
		35					40					45			
Glu	Glu	Ala	His	Gly	Val	Leu	His	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Phe
		50				55					60				
Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu
65					70					75				80	
Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Leu	Glu	Arg
				85					90					95	
Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser
			100					105					110		
Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr
		115					120					125			
Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	Tyr
	130					135					140				
Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln
145					150					155				160	
Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu
				165					170					175	
Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu
			180					185						190	
Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys
		195					200					205			
Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys
	210					215					220				
Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	
225					230					235				240	
Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp
			245						250					255	
Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp
			260				265						270		
Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val
		275					280					285			
Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Ile	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala
	290					295					300				
Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro
305					310					315					320
Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Ala	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val
				325					330					335	
Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala
			340					345					350		
Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln
		355					360					365			
Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr
	370					375					380				
Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys
385					390					395				400	
Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp
				405					410					415	
Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Ser	Val	Gly
			420					425					430		
His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln
			435					440				445			
Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro
	450					455					460				
Phe	Pro														
465															

<210> 8  
<211> 444

<212> PRT  
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <220>  
 <223> Precursor del Factor VII

<400> 8

Met	Ala	Pro	Gln	Ala	Arg	Gly	Leu	Gly	Leu	Cys	Ser	Leu	Leu	Ala	Leu
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ser	Leu	Ala	Ala	Val	Phe	Ile	Thr	Gln	Glu	Glu	Ala	His	Ser
			20					25					30		
Val	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Ala	Asn	Ser	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg
		35					40					45			
Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu	Leu	Cys	Ser	Phe	Glu
	50					55					60				
Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Gln	Ser	Thr	Glu	Arg	Thr	Lys	Gln	Phe	Trp
65					70					75					80
Ile	Thr	Tyr	Asn	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser	Asn	Pro	Cys	Gln	Asn
			85						90					95	
Gly	Gly	Ser	Cys	Glu	Asp	Gln	Ile	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu
			100					105					110		
Ala	Asp	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Lys	Asn	Lys	Asn	Asp	Gln	Leu
			115					120					125		
Ile	Cys	Met	Tyr	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His
	130					135					140				
Val	Gly	Ser	Gln	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Thr	Leu	Leu
145					150					155					160
Pro	Asn	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Asp	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys
				165					170					175	
Val	Pro	Ala	Leu	Glu	Lys	Arg	Gly	Ala	Ser	Asn	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile
			180					185					190		
Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Ala	Ala
			195				200					205			
Leu	Met	Asn	Gly	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Leu	Asp	Thr
	210					215					220				
His	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Leu	Ser	Ser	Leu
225					230					235					240
Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Glu
				245					250					255	
Gly	Asp	Glu	Gln	Val	Arg	His	Val	Ala	Gln	Leu	Ile	Met	Pro	Asp	Lys
			260					265					270		
Tyr	Val	Pro	Gly	Lys	Thr	Asp	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu
		275					280						285		
Gln	Pro	Ala	Ala	Leu	Thr	Asn	Asn	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu
		290				295					300				
Arg	Asn	Phe	Ser	Glu	Ser	Thr	Leu	Ala	Thr	Ile	Arg	Phe	Ser	Arg	Val
305					310					315					320
Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Tyr	Arg	Gly	Ala	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu
				325					330					335	
Met	Ala	Ile	Asp	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Val	Glu	Gln
			340					345					350		
Ser	Glu	His	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Glu	Val	Thr	Gly	Asn	Met	Phe	Cys
		355					360					365			
Ala	Gly	Tyr	Leu	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ala	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly
			370				375					380			
Gly	Pro	His	Ala	Thr	Ser	Tyr	His	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Val
385					390					395					400
Val	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	Ala	Ala	Val	Gly	His	Val	Gly	Val	Tyr
				405					410					415	
Thr	Arg	Val	Ser	Arg	Tyr	Thr	Glu	Trp	Leu	Ser	Arg	Leu	Met	Arg	Ser
			420					425					430		
Lys	Leu	His	His	Gly	Ile	Gln	Arg	His	Pro	Phe	Pro				
		435					440								

<210> 9  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> *Rattus norvegicus*

5

<220>  
<223> Precursor del Factor VII

10

<400> 9

Met	Val	Pro	Gln	Thr	His	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Tyr	Phe	Leu	Leu	Gln
1				5					10					15	
Leu	Gln	Gly	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Phe	Ile	Thr	Gln	Glu	Glu	Ala
			20					25					30		
His	Gly	Val	Leu	His	Arg	Gln	Arg	Arg	Ala	Asn	Ser	Leu	Leu	Glu	Glu
		35				40						45			
Leu	Trp	Ser	Ser	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Asn	Glu	Glu	Arg	Cys	Ser
	50					55					60				
Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Ser	Pro	Glu	Arg	Thr	Lys	Gln
65					70					75					80
Phe	Trp	Thr	Ile	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser	Asn	Pro	Cys
			85						90					95	
Gln	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Gln	Asp	His	Leu	Lys	Ser	Tyr	Val	Cys	Phe
		100						105					110		
Cys	Pro	Leu	Asp	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Lys	Asn	Lys	Asn	Glu
		115					120					125			
Gln	Leu	Ile	Cys	Ala	Asn	Glu	Asn	Gly	Asp	Cys	Asp	Gln	Tyr	Cys	Arg
	130					135					140				
Asp	His	Val	Gly	Thr	Lys	Arg	Thr	Cys	Ser	Cys	His	Glu	Asp	Tyr	Val
145					150						155				160
Leu	Gln	Pro	Asp	Glu	Val	Ser	Cys	Lys	Pro	Lys	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys
			165						170					175	
Gly	Arg	Ile	Pro	Val	Val	Glu	Lys	Arg	Asn	Phe	Ser	Arg	Pro	Gln	Gly
		180						185					190		
Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Tyr	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln
		195					200					205			
Ala	Val	Leu	Lys	Phe	Asn	Glu	Ala	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Val	Leu	Leu
	210					215					220				
Asp	Thr	Arg	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Phe	Gly
225				230						235					240
Lys	Leu	Val	Asn	Ile	Thr	Val	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	Phe	Ser	Glu
			245						250					255	
Lys	Glu	Gly	Thr	Glu	Gln	Val	Arg	Leu	Val	Glu	Gln	Val	Ile	Met	Pro
			260					265					270		
Asn	Lys	Tyr	Thr	Arg	Gly	Arg	Thr	Asp	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Arg
		275					280					285			
Leu	His	Arg	Pro	Val	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu
	290					295					300				
Pro	Glu	Arg	Ala	Phe	Ser	Glu	Asn	Thr	Leu	Ala	Ser	Ile	Arg	Phe	Ser
305					310					315					320
Arg	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu
			325						330					335	
Glu	Leu	Met	Val	Ile	Glu	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu
			340						345						
Glu	His	Ala	Lys	His	Ser	Ala	Asn	Thr	Pro	Arg	Ile	Thr	Glu	Asn	Met
		355					360					365			
Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Met	Asp	Gly	Thr	Lys	Asp	Ala	Cys	Lys	Gly	Asp
	370					375					380				
Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	His	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr
385					390					395					400
Gly	Val	Val	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	Ala	Ala	Ile	Gly	His	Ile	Gly
				405					410					415	
Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Asp	Trp	Leu	Val	Lys	Tyr	Met
			420					425					430		
Asp	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Gly	Ile	Ser	Arg	Val	Ser	Leu	Leu		
		435					440						445		

<210> 10  
 <211> 469  
 <212> PRT  
 <213> *Macaca mulatta*

<220>

<223> Precursor del Factor VII

<400> 10

Met Val Ser Arg Ala Leu Gly Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Ala Thr Phe Leu Pro Gln Ala Gly Ser Leu Arg  
 20 25 30  
 Pro Gln Glu Lys Thr Gln Asp Leu Leu Trp Lys Pro Gly Pro His  
 35 40 45  
 Arg Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Gln  
 50 55 60  
 Arg Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Arg Glu Cys Lys Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile  
 85 90 95  
 Phe Lys Asp Leu Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp  
 100 105 110  
 Gly Asp Gln Cys Ala Ser Asn Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys  
 115 120 125  
 Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ser Phe Glu Gly  
 130 135 140  
 Arg Asn Tyr Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly  
 145 150 155 160  
 Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Ala Gly Ala Lys Arg Ser Cys Trp  
 165 170 175  
 Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Met Pro  
 180 185 190  
 Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn  
 195 200 205  
 Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Arg Val Cys Pro Lys  
 210 215 220  
 Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu  
 225 230 235 240  
 Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His  
 245 250 255  
 Cys Phe Asp Lys Ile Lys Ser Trp Arg Asn Leu Thr Ala Val Leu Gly  
 260 265 270  
 Glu His Asp Leu Ser Glu His Glu Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val  
 275 280 285  
 Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Leu Gly Ala Thr Asn His  
 290 295 300  
 Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Gln Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His  
 305 310 315 320  
 Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Met Phe Ser Glu Arg Thr Leu  
 325 330 335  
 Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp  
 340 345 350  
 Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Ala Leu Asn Val Pro Arg Leu  
 355 360 365  
 Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Gln Lys Ala Glu Ala Ser Pro  
 370 375 380  
 Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Arg  
 385 390 395 400  
 Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr Arg Tyr Arg  
 405 410 415  
 Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala  
 420 425 430  
 Ala Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu  
 435 440 445  
 Trp Leu Gln Lys Leu Met His Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu  
 450 455 460  
 Arg Ala Pro Phe Pro  
 465

5

<210> 11  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> *Sus scrofa*

5

<220>  
 <223> Precursor del Factor VII (isoforma b)

<400> 11

10

```

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

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

<210> 12  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> *Canis familiaris*

5

<220>  
 <223> Precursor del Factor VII

10

<400> 12

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

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

<210> 13  
 <211> 433  
 <212> PRT  
 <213> *Brachydanio rerio*

5

<220>



<223> Precursor del Factor VII

<400> 13

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

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

5

<210> 14  
 <211> 441  
 <212> PRT

<213> *Fugu rubripes*

<220>

<223> Precursor del Factor VII

5

<400> 14

Met	Arg	Leu	Arg	Val	Phe	Phe	Thr	Leu	Val	Phe	Thr	Phe	Thr	His	Cys
1				5					10					15	
Arg	Ala	Ala	Ser	Val	Phe	Leu	Asp	Ala	Asp	Lys	Ala	His	Asp	Val	Leu
			20					25					30		
Val	Arg	Thr	Arg	Arg	Tyr	Asn	Ser	Gly	Trp	Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Lys
		35					40					45			
Gly	Asp	Leu	Lys	Arg	Glu	Cys	Leu	Glu	Glu	Ile	Cys	Ser	Tyr	Glu	Glu
	50					55					60				
Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	His	Thr	Lys	Thr	Thr	Asp	Glu	Phe	Trp	Lys
65					70					75					80
Ile	Tyr	Asn	Arg	Pro	Asn	Ser	Cys	Lys	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Ser	Cys	Ser	Ala	Glu	Gly	Ser	Ser	Tyr	Thr	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro
			100					105					110		
Glu	Phe	Ser	Gly	Val	Asp	Cys	Glu	Leu	Glu	Tyr	Gln	Thr	Val	Pro	Asp
		115					120					125			
Thr	Cys	Leu	Leu	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	His	Phe	Cys	His	Glu	Asn
	130					135					140				
Ser	Ala	Gly	Gln	Arg	Gly	Asn	Cys	Ser	Cys	Ala	Asp	Gly	Tyr	Asp	Leu
					150						155				160
Asp	Val	Asp	Gly	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Lys	Glu	Ser	Val	Ala	Cys	Gly
				165					170					175	
Met	Val	Leu	Ser	Ala	Gln	Phe	Glu	His	Asn	Gln	Leu	Asn	Pro	Arg	Ala
			180						185					190	
Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Asn	Glu	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln
		195					200					205			
Val	Leu	Leu	Val	Tyr	Lys	Gly	Lys	Gly	Phe	Cys	Gly	Gly	Val	Ile	Tyr
	210					215					220				
Lys	Pro	Thr	Trp	Ile	Leu	Thr	Ala	Ser	His	Cys	Met	Ala	Asp	Ile	Asp
				230						235					240
Val	Gln	Phe	Leu	Lys	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Thr	Glu	Val	Asp
				245					250					255	
Glu	Gly	Thr	Glu	Gln	Ile	Ile	Gln	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Met	His	Glu
			260					265					270		
Lys	Tyr	Val	Pro	Arg	Thr	Ala	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	His	Leu
		275					280						285		
Ala	Val	Pro	Ile	Thr	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Ala	Ile	Pro	Val	Cys	Leu	Pro
	290					295					300				
Thr	Arg	Pro	Leu	Ala	Glu	Arg	Glu	Leu	Trp	Ala	Val	Ser	Leu	His	Thr
305					310					315					320
Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Arg	Ser	Glu	Asn	Gly	Pro	Thr	Ser	His	Leu
				325					330					335	
Leu	Arg	Gln	Leu	Lys	Val	Pro	Arg	Ile	Arg	Thr	Gln	Gln	Cys	Ile	Glu
			340					345					350		
Glu	Ser	Gly	Val	Val	Leu	Thr	Gln	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Met
		355					360					365			
Glu	Gly	Arg	Gln	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val
	370					375					380				
Thr	Lys	Tyr	Lys	Lys	Thr	Val	Phe	Leu	Leu	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly
385					390					395					400
Lys	Gly	Cys	Ala	Arg	Pro	Gly	Asn	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Arg	Val	Ala
				405					410					415	
Asn	Tyr	Leu	Glu	Trp	Ile	His	Asn	Arg	Thr	Ala	Thr	Val	Asn	Gln	Pro
		420						425					430		
Thr	Asn	Asn	Thr	Glu	Asn	Phe	Thr	Thr							
		435					440								

10

<210> 15  
 <211> 425  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*

5

<220>  
 <223> Precursor del Factor VII

<400> 15

10

```

Met Val Ser Arg Gln Cys Val Ala Leu Leu Leu Cys Phe Pro Leu Leu
 1          5          10
Val Pro Pro Ser Leu Glu Ala Val Phe Leu Lys Gln Glu Glu Ala Asn
 20
Ser Ile Phe Gln Arg His Arg Arg Ala Asn Ser Phe Phe Glu Glu Ile
 35          40          45
Lys Leu Gly Pro Leu Glu Arg Glu Cys Ile Glu Glu Lys Cys Ser Phe
 50          55          60
Glu Glu Ala Arg Glu Ile Tyr Arg Asp Asp Glu Arg Thr Lys Glu Phe
 65          70          75          80
Trp His Ile Tyr Ser Asp Pro Asn Gln Cys Asp Ser Ser Pro Cys Gln
 85
Asn Gly Gly Ser Cys Asp Asp Gln Phe Gln Asp Tyr Val Cys Arg Cys
 100          105          110
Pro Pro Glu Tyr Glu Gly Lys Ser Cys Glu Thr Ala Val Ala Glu Asn
 115          120          125
Leu Lys Cys Ile Tyr Asp Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ala Asp
 130          135          140
Glu Gln Ser Glu Lys Arg Val Cys Phe Cys Ala Glu Gly Tyr Ala Leu
 145          150          155          160
Ala Ser Asp Gly Val Ser Cys Ile Pro Gln Val Lys Tyr Pro Cys Gly
 165          170          175
Thr Ile Pro Val Leu Ala Arg Lys Asn Thr Thr Ala Gln Gly Arg Ile
 180          185          190
Val Gly Gly Val Thr Cys Pro Pro Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu
 195          200          205
Ile Ile Gln Asp Gln Lys Gly Lys Cys Gly Gly Ser Leu Leu Ser Pro
 210          215          220
Glu Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Leu Asp Tyr Ala His Ser Lys
 225          230          235          240
Gln Leu Arg Val Arg Leu Gly Glu Tyr Ser Val Lys Val Ala Glu Lys
 245          250          255
Thr Glu Gln Glu Ser Gly Val Ser Lys Ile Ile Arg His Glu Glu Tyr
 260          265          270
Thr Ile Gly Gln Val Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Glu Thr
 275          280          285
Pro Val Asn Leu Thr Asp Phe Val Val Pro Ile Cys Leu Pro Glu Lys
 290          295          300
Arg Phe Ala Val Tyr Glu Leu Ser Ser Ile Lys Phe Ser Met Val Ser
 305          310          315          320
Gly Trp Gly Arg Leu Leu Asp Gly Gly Ala Thr Ser Thr Phe Leu Met
 325          330          335
Arg Val His Leu Pro Arg Val Lys Thr Gln Glu Cys Glu Lys Gln Ala
 340          345          350
Asn Leu Asn Ile Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Asp Leu Thr Gly
 355          360          365
Lys Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr Lys
 370          375          380
Tyr Lys Asn Thr Trp Phe Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Lys Gly
 385          390          395          400
Cys Ala Val Glu Gly Ser Tyr Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Arg Tyr
 405          410          415
Ile Asn Trp Leu Lys Arg His Met Glu
 420          425
    
```

<210> 16  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> *Pongo pygmaeus*

5

<220>  
 <223> Factor VII (fragmento)

10

<400> 16

```

Gly Val Ala Glu Ala Ser Gly Gly Glu Thr Arg Asp Met Gln Trp Lys
1 5 10 15
Leu Gly Pro His Arg Val Phe Ile Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20 25 30
Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Thr Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
35 40 45
Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
50 55 60
Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Leu Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65 70 75 80
Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
85 90 95
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
    
```

```

            100                        105                        110
Asp Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Met Tyr Lys Asp Asp Gln Leu Ile
            115                        120                        125
Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Met
            130                        135                        140
Gly Ala Lys Arg Ser Cys Trp Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
145                          150                          155                          160
Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
            165                        170                        175
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
            180                        185                        190
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
            195                        200                        205
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
            210                        215                        220
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
225                          230                          235                          240
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Arg Asp Gly
            245                        250                        255
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
            260                        265                        270
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
            275                        280                        285
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
            290                        295                        300
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305                          310                          315                          320
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
            325                        330                        335
Ala Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
            340                        345                        350
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
            355                        360                        365
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
            370                        375                        380
Pro His Ala Thr Arg Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385                          390                          395                          400
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Ala Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
            405                        410                        415
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Cys Ser Glu
            420                        425                        430
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
            435                        440

```

5  
 <210> 17  
 <211> 221  
 <212> PRT  
 <213> Gorilla gorilla

10  
 <220>  
 <223> Factor VII (fragmento)

<220>  
 <221> INCIERTO

15  
 <222> (0)...(0)  
 <223> Xaa podría ser cualquier aminoácido

<400> 17

```

Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp
 1      5      10      15
Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp
 20     25     30

```

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

<210> 18  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Variante FVII L13P

10

<400> 18

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

Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 19  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor F64L)

<400> 19

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

Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 20  
 <211> 466  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor L73Q)

10 <400> 20

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Gln Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95



Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 21  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor E79Q)

<400> 21

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30

```

Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
   35                               40                               45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
   50                               55                               60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Gln Glu
   65                               70                               75                               80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
   85
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
   100                               105                               110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
   115                               120                               125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
   130                               135                               140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
   145                               150                               155                               160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
   165                               170                               175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
   180                               185                               190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
   195                               200                               205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
   210                               215                               220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
   225                               230                               235                               240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
   245                               250                               255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
   260                               265                               270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
   275                               280                               285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
   290                               295                               300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
   305                               310                               315                               320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
   325                               330                               335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
   340                               345                               350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
   355                               360                               365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
   370                               375                               380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
   385                               390                               395                               400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
   405                               410                               415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
   420                               425                               430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
   435                               440                               445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
   450                               455                               460
Phe Pro
465

```

<210> 22  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor S120P)

5

10

<400> 22

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Pro Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro

<210> 23  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor C121F)

<400> 23

10

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1          5          10 Leu Leu Gly Leu Gln
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
          20          25          30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
          35          40          45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
          50          55          60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
          65          70          75          80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
          85          90          95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
          100          105          110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Phe Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
          115          120          125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
          130          135          140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
          145          150          155          160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
          165          170          175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
          180          185          190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
          195          200          205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
          210          215          220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
          225          230          235          240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
          245          250          255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
          260          265          270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
          275          280          285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
          290          295          300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
          305          310          315          320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
          325          330          335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
          340          345          350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
          355          360          365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
          370          375          380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
          385          390          395          400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
    
```

```

                405                410                415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
                420                425                430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
                435                440                445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
                450                455                460
Phe Pro
465
    
```

<210> 24  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor L125P)

<400> 24

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1                    5                    10                    15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
                20                25                30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
                35                40                45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
 50                    55                    60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
 65                    70                    75                    80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                90                95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
                100                105                110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Pro Gln Ser Tyr
                115                120                125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
                130                135                140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
 145                    150                    155                    160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                170                175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
                180                185                190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
                195                200                205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
                210                215                220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
 225                    230                    235                    240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                250                255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
                260                265                270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
                275                280                285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
                290                295                300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
 305                    310                    315                    320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                330                335
    
```

```

Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
      340      345      350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
      355      360      365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
      370      375      380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
      385      390      395
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
      405      410      415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
      420      425      430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
      435      440      445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
      450      455      460
Phe Pro
      465

```

<210> 25  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor Y128C)

10

<400> 25

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Cys  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270

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

<210> 26  
 <211> 466

<212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 5 <223> Variante FVII (precursor R139K)

<400> 26

```

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



		195					200					205			
Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys
	210					215					220				
Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	
225					230				235					240	
Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp
				245					250					255	
Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp
			260					265					270		
Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val
		275					280					285			
Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala
	290					295					300				
Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro
305					310						315				320
Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val
				325					330					335	
Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala
			340					345						350	
Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln
			355				360					365			
Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr
	370					375					380				
Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys
385					390					395					400
Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp
				405					410					415	
Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly
			420					425					430		
His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln
	435						440					445			
Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro
	450					455					460				
Phe	Pro														
465															

<210> 27  
 <211> 466  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor R139Q)

10 <400> 27

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

Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Gln Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 28  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII R139W

<400> 28

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60

Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Trp Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 29  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor C151S)

<400> 29

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Ser Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 30  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>

<223> Variante FVII (precursor E154K)

5

<400> 30

Met	Val	Ser	Gln	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gln
1				5					10					15	
Gly	Cys	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Glu	Thr
			20					25					30		
Arg	Asp	Met	Pro	Trp	Lys	Pro	Gly	Pro	His	Arg	Val	Phe	Val	Thr	Gln
	35						40					45			
Glu	Glu	Ala	His	Gly	Val	Leu	His	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Phe
	50					55						60			
Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu
65					70					75				80	
Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg
			85						90					95	
Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser
			100					105					110		
Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr
	115						120					125			
Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His
	130					135					140				
Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Lys	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln
145					150					155					160
Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu
			165						170					175	
Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu
			180					185					190		
Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys
	195						200					205			
Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys
	210					215					220				
Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly
225					230					235					240
Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp
			245						250					255	
Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp
			260				265						270		
Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val
	275						280					285			
Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala
	290					295					300				
Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro
305					310					315					320
Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val
			325						330					335	
Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala
			340					345					350		
Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln
	355						360					365			
Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr
	370					375				380					
Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys
385					390					395					400
Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp
			405						410					415	
Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly
			420					425					430		

His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 31  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor G157C)

<400> 31

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Cys Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365

Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 32  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor G157S)

<400> 32

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Ser Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300

Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 33  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor G157V)

<400> 33

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



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

<210> 34  
 <211> 466  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor Q160R)

10 <400> 34

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

Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 35  
 <211> 466  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor P194T)

10 <400> 35

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

Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Thr Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 36  
 <211> 466  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor C195R)

10 <400> 36

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45

Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Arg Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 37  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor K197E)

<400> 37

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Glu Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 38  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Variante FVII (precursor R212Q)

<400> 38

5

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
1 5 10 15  
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
20 25 30  
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
35 40 45  
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
50 55 60  
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
65 70 75 80  
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
85 90 95  
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
100 105 110  
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
115 120 125  
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
130 135 140  
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
145 150 155 160  
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
165 170 175  
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
180 185 190  
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
195 200 205  
Pro Gln Gly Gln Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
210 215 220  
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
225 230 235 240  
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
245 250 255  
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
260 265 270  
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
275 280 285  
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
290 295 300  
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
305 310 315 320  
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
325 330 335  
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
340 345 350  
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
355 360 365  
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
370 375 380  
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
385 390 395 400  
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
405 410 415  
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly

			420					425				430			
His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln
		435					440					445			
Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro
	450					455					460				
Phe	Pro														
465															

<210> 39  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor G216D)

<400> 39

Met	Val	Ser	Gln	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gln
1				5					10					15	
Gly	Cys	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Glu	Thr
			20					25					30		
Arg	Asp	Met	Pro	Trp	Lys	Pro	Gly	Pro	His	Arg	Val	Phe	Val	Thr	Gln
	35						40					45			
Glu	Glu	Ala	His	Gly	Val	Leu	His	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Phe
	50					55					60				
Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu
65					70					75					80
Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg
			85						90					95	
Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser
			100					105					110		
Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr
		115						120				125			
Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His
	130					135					140				
Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln
145					150					155					160
Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu
			165						170					175	
Gly	Tyr	Ser	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	
			180					185					190		
Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys
	195						200					205			
Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Asp	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys
	210					215					220				
Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	
225					230				235						240
Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp
			245						250					255	
Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp
			260					265					270		
Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val
		275					280					285			
Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala
	290					295					300				
Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro
305					310					315					320
Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val
			325						330					335	
Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala
			340					345					350		
Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln

		355						360						365			
Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr		
	370					375					380						
Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys		
385					390				395						400		
Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp		
				405					410					415			
Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly		
			420					425						430			
His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln		
	435						440					445					
Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro		
	450					455					460						
Phe	Pro																
465																	

<210> 40  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor C238Y)

<400> 40

Met	Val	Ser	Gln	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gln		
1				5					10					15			
Gly	Cys	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Glu	Thr		
			20					25					30				
Arg	Asp	Met	Pro	Trp	Lys	Pro	Gly	Pro	His	Arg	Val	Phe	Val	Thr	Gln		
	35						40					45					
Glu	Glu	Ala	His	Gly	Val	Leu	His	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Phe		
	50					55					60						
Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu		
65				70					75					80			
Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg		
			85						90					95			
Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser		
			100						105					110			
Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr		
		115					120					125					
Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His		
	130					135					140						
Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln		
145					150						155			160			
Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu		
			165						170					175			
Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu		
			180					185						190			
Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys		
	195						200					205					
Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys		
	210					215					220						
Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Tyr	Gly	Gly		
225				230						235					240		
Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp		
			245						250					255			
Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp		
			260					265					270				
Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val		
		275					280						285				



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

<210> 41  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor T241N)

10

<400> 41

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

Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 42  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor C254Y)

<400> 42

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

```

145          150          155          160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
          165          170          175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
          180          185          190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
          195          200          205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
          210          215          220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225          230          235          240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Tyr Phe Asp
          245          250          255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
          260          265          270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
          275          280          285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
          290          295          300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305          310          315          320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
          325          330          335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
          340          345          350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
          355          360          365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
          370          375          380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385          390          395          400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
          405          410          415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
          420          425          430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
          435          440          445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
450          455          460
Phe Pro
465

```

<210> 43  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor A266T)

<400> 43

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1          5          10          15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
          20          25          30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
          35          40          45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
          50          55          60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65          70          75          80

```

Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Thr Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 44  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor R283W)

<400> 44

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln

1				5					10					15		
Gly	Cys	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Glu	Thr	
			20					25					30			
Arg	Asp	Met	Pro	Trp	Lys	Pro	Gly	Pro	His	Arg	Val	Phe	Val	Thr	Gln	
		35					40					45				
Glu	Glu	Ala	His	Gly	Val	Leu	His	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Phe	
	50					55					60					
Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu	
65					70					75					80	
Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg	
				85						90					95	
Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser	
			100					105						110		
Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr	
							120					125				
Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His	
	130					135						140				
Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln	
145					150					155					160	
Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu	
				165						170				175		
Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	
			180					185						190		
Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	
		195					200							205		
Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	
						215					220					
Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	
225						230				235					240	
Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	
				245					250					255		
Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	
			260					265					270			
Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Trp	Arg	Val	Ala	Gln	Val	
		275					280					285				
Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	
	290					295					300					
Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro	
305					310						315				320	
Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	
				325					330					335		
Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	
			340					345						350		
Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	
			355					360						365		
Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	
	370					375					380					
Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys	
385					390					395					400	
Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp	
				405					410					415		
Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly	
			420					425						430		
His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln	
		435					440					445				
Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro	
	450					455						460				
Phe	Pro															
465																

<210> 45  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Variante FVII (precursor V295D)

&lt;400&gt; 45

5

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1      5      10      15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
 20      25      30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
 35      40      45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
 50      55      60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
 65      70      75
Gln Cys Ser Phe Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
 85      90      95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
 100     105     110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
 115     120     125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
 130     135     140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
 145     150     155
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
 165     170     175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
 180     185     190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
 195     200     205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
 210     215     220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
 225     230     235
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
 245     250     255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
 260     265     270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
 275     280     285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Asp Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
 290     295     300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
 305     310     315
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
 325     330     335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
 340     345     350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
 355     360     365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
 370     375     380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
 385     390     395
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
 405     410     415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
 420     425     430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln

```

Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 435 440 445  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 46  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor D302H)

<400> 46

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His His Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365

Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 47

<211> 466

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Variante FVII (precursor D302N)

10

<400> 47

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asn Ile Ala



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

<210> 48  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor A304T)

10

<400> 48

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

Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Thr  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 49  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor A304V)

<400> 49

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

145. 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Val  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 50  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor R307C)

<400> 50

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80

Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Cys Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 51  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor R307H)

<400> 51

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln

1				5					10					15		
Gly	Cys	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Glu	Thr	
			20					25					30			
Arg	Asp	Met	Pro	Trp	Lys	Pro	Gly	Pro	His	Arg	Val	Phe	Val	Thr	Gln	
		35					40					45				
Glu	Glu	Ala	His	Gly	Val	Leu	His	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Phe	
	50					55					60					
Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu	
65					70					75					80	
Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg	
				85					90					95		
Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser	
			100					105					110			
Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr	
		115					120					125				
Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His	
	130					135					140					
Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln	
145					150					155					160	
Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu	
			165						170					175		
Gly	Tyr	Ser	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu		
			180					185					190			
Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	
		195					200					205				
Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	
	210					215					220					
Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly		
225					230					235				240		
Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	
			245						250					255		
Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	
			260				265						270			
Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	
		275					280					285				
Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	
	290					295					300					
Leu	Leu	His	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro	
305					310						315				320	
Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	
				325					330					335		
Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	
			340					345						350		
Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	
		355					360					365				
Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	
	370					375					380					
Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys	
385					390					395					400	
Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp	
				405					410					415		
Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly	
			420					425						430		
His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln	
	435						440					445				
Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro	
	450					455						460				
Phe	Pro															
465																

<210> 52  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Variante FVII (precursor V312M)

<400> 52

5

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1      5      10      15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
 20      25      30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
 35      40      45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
 50      55      60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
 65      70      75      80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
 85      90      95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
 100     105     110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
 115     120     125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
 130     135     140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
 145     150     155     160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
 165     170     175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
 180     185     190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
 195     200     205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
 210     215     220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
 225     230     235     240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
 245     250     255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
 260     265     270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
 275     280     285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
 290     295     300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Met Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
 305     310     315     320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
 325     330     335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
 340     345     350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
 355     360     365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
 370     375     380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
 385     390     395     400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
 405     410     415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
 420     425     430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
 435     440     445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
 450     455     460
Phe Pro
 465

```

<210> 53  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor E325K)

10

<400> 53

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1          5          10          15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
 20          25          30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
 35          40          45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
 50          55          60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
 65          70          75          80
Gln Cys Ser Phe Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
 85          90          95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
 100          105          110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
 115          120          125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
 130          135          140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
 145          150          155          160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
 165          170          175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
 180          185          190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
 195          200          205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
 210          215          220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
 225          230          235          240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
 245          250          255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
 260          265          270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
 275          280          285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
 290          295          300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
 305          310          315          320
Leu Cys Leu Pro Lys Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
 325          330          335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
 340          345          350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
 355          360          365
    
```

Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 54  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor T332M)

<400> 54

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala



290	295	300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro		
305	310	315
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Met Leu Ala Phe Val		
	325	330
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala		
	340	345
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln		
	355	360
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr		
	370	375
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys		
385	390	395
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp		
	405	410
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly		
	420	425
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln		
	435	440
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro		
	450	455
Phe Pro		460
465		

<210> 55  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor V341F)

<400> 55

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

Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Phe Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 56  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor A352T)

10

<400> 56

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

```

145          150          155          160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
165
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
180
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
195
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
210
Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
245
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
260
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
275
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
290
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
325
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Thr
340
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
355
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
370
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
405
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
420
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
435
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
450
Phe Pro
465

```

<210> 57  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor A354V)

<400> 57

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
20 25 30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
35 40 45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
50 55 60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65 70 75 80

```

Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Val Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 58  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor M358I)

10

<400> 58

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln

1				5					10					15	
Gly	Cys	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Glu	Thr
			20					25					30		
Arg	Asp	Met	Pro	Trp	Lys	Pro	Gly	Pro	His	Arg	Val	Phe	Val	Thr	Gln
		35					40					45			
Glu	Glu	Ala	His	Gly	Val	Leu	His	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Phe
	50					55					60				
Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu
65					70					75				80	
Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg
				85					90					95	
Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser
			100					105					110		
Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr
		115						120				125			
Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His
	130					135					140				
Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln
145					150					155					160
Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu
			165						170					175	
Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu
			180					185					190		
Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys
		195					200						205		
Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys
	210					215					220				
Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly
225					230					235					240
Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp
			245						250					255	
Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp
			260					265					270		
Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val
		275					280					285			
Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala
	290					295					300				
Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro
305					310						315				320
Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val
				325					330					335	
Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala
			340					345						350	
Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Ile	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln
		355					360					365			
Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr
	370					375					380				
Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys
385					390					395					400
Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp
				405					410					415	
Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly
			420					425					430		
His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln
	435						440					445			
Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro
	450					455						460			
Phe	Pro														
465															

<210> 59  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>

<223> Variante FVII (precursor M358V)

<400> 59

5

Met	Val	Ser	Gln	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gln
1				5					10					15	
Gly	Cys	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Glu	Thr
			20					25					30		
Arg	Asp	Met	Pro	Trp	Lys	Pro	Gly	Pro	His	Arg	Val	Phe	Val	Thr	Gln
	35						40					45			
Glu	Glu	Ala	His	Gly	Val	Leu	His	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Phe
	50					55						60			
Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu
	65				70					75				80	
Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg
			85						90					95	
Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser
			100					105					110		
Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr
	115						120					125			
Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His
	130					135					140				
Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln
	145				150					155				160	
Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu
			165						170					175	
Gly	Tyr	Ser	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	
			180					185					190		
Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys
	195					200						205			
Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys
	210					215					220				
Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly
	225				230					235				240	
Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp
			245						250					255	
Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp
			260					265					270		
Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val
		275					280					285			
Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala
	290					295					300				
Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro
	305				310					315					320
Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val
			325						330					335	
Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala
			340					345					350		
Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln
		355					360					365			
Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr
	370					375					380				
Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys
	385				390					395					400
Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp
			405						410					415	
Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly
			420					425					430		
His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln



	370					375						380			
Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys
385					390					395					400
Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp
				405					410					415	
Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly
			420					425					430		
His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln
		435					440					445			
Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro
	450					455					460				
Phe	Pro														
465															

<210> 61  
 <211> 466  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor R364Q)

10 <400> 61

Met	Val	Ser	Gln	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gln
1				5					10					15	
Gly	Cys	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Glu	Thr
			20					25					30		
Arg	Asp	Met	Pro	Trp	Lys	Pro	Gly	Pro	His	Arg	Val	Phe	Val	Thr	Gln
		35				40						45			
Glu	Glu	Ala	His	Gly	Val	Leu	His	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Phe
	50				55						60				
Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu
65				70					75					80	
Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg
			85					90						95	
Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser
			100					105					110		
Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr
		115					120					125			
Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His
	130					135					140				
Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln
145				150					155					160	
Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu
				165					170					175	
Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu
			180					185					190		
Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys
		195					200					205			
Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys
	210					215					220				
Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly
225				230					235					240	
Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp
			245						250					255	
Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp
			260					265					270		
Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val
		275					280					285			
Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala
		290				295					300				



Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Gln Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 62  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor T367S)

<400> 62

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

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

<210> 63  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor C370F)

10

<400> 63

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

Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Phe Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 64  
 <211> 466  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor C389G)

10 <400> 64

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser

```

          100                      105                      110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
          115                      120                      125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
          130                      135                      140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
          145                      150                      155
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
          165                      170                      175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
          180                      185                      190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
          195                      200                      205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
          210                      215                      220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
          225                      230                      235
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
          245                      250                      255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
          260                      265                      270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
          275                      280                      285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
          290                      295                      300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
          305                      310                      315
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
          325                      330                      335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
          340                      345                      350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
          355                      360                      365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
          370                      375                      380
Glu Tyr Met Phe Gly Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
          385                      390                      395
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
          405                      410                      415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
          420                      425                      430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
          435                      440                      445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
          450                      455                      460
Phe Pro
          465

```

<210> 65  
 <211> 466  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor G391S)

10 <400> 65

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
  1          5          10          15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
          20          25          30

```

```

Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
   35                               40                               45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
   50                               55                               60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
   65                               70                               75                               80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
   85                               90                               95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
  100                               105                               110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
  115                               120                               125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
  130                               135                               140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
  145                               150                               155                               160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
  165                               170                               175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
  180                               185                               190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
  195                               200                               205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
  210                               215                               220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
  225                               230                               235                               240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
  245                               250                               255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
  260                               265                               270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
  275                               280                               285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
  290                               295                               300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
  305                               310                               315                               320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
  325                               330                               335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
  340                               345                               350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
  355                               360                               365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
  370                               375                               380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
  385                               390                               395                               400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
  405                               410                               415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
  420                               425                               430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
  435                               440                               445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
  450                               455                               460
Phe Pro
  465

```

<210> 66  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor G402E)

5

10

<400> 66

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Glu Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460

Phe Pro  
 465

<210> 67  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor G402R)

10

<400> 67

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1      5      10      15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
 20      25      30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
 35      40      45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
 50      55      60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
 65      70      75      80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
 85      90      95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
 100     105     110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
 115     120     125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
 130     135     140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
 145     150     155     160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
 165     170     175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
 180     185     190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
 195     200     205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
 210     215     220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
 225     230     235     240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
 245     250     255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
 260     265     270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
 275     280     285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
 290     295     300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
 305     310     315     320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
 325     330     335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
 340     345     350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
 355     360     365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
 370     375     380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
    
```

```

385                               390                               395                               400
Lys Arg Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                               405                               410                               415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
                               420                               425                               430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
                               435                               440                               445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
                               450                               455                               460
Phe Pro
465

```

<210> 68  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor D403H)

10

<400> 68

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1                               5                               10                               15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
                               20                               25                               30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
 35                               40                               45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
 50                               55                               60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
 65                               70                               75                               80
Gln Cys Ser Phe Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
 85                               90                               95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
 100                               105                               110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
 115                               120                               125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
 130                               135                               140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
 145                               150                               155                               160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
 165                               170                               175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
 180                               185                               190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
 195                               200                               205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
 210                               215                               220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
 225                               230                               235                               240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
 245                               250                               255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
 260                               265                               270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
 275                               280                               285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
 290                               295                               300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Thr Asp His Val Val Pro
 305                               310                               315                               320

```



Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly His Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 69  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor R413Q)

10

<400> 69

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

```

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

```

<210> 70  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor T419M)

10

<400> 70

```

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

```

Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Met Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 71  
 <211> 466  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor G435E)

10 <400> 71

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser

100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Glu Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 72  
 <211> 466  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor E445K)

10 <400> 72

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln

		35				40					45				
Glu	Glu	Ala	His	Gly	Val	Leu	His	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Phe
	50					55					60				
Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu
65					70					75					80
Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg
				85					90					95	
Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser
			100					105					110		
Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr
		115					120					125			
Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His
	130					135					140				
Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln
145					150					155					160
Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu
				165					170						175
Gly	Tyr	Ser	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	
			180				185						190		
Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys
		195					200						205		
Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys
	210					215						220			
Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	
225					230				235						240
Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp
			245						250					255	
Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp
			260				265						270		
Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val
		275					280						285		
Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala
	290					295					300				
Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro
305					310						315				320
Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val
				325					330					335	
Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala
			340					345						350	
Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln
		355					360						365		
Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr
	370					375					380				
Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys
385					390						395				400
Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp
				405					410					415	
Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly
			420					425						430	
His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Lys	Trp	Leu	Gln
		435					440					445			
Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro
	450					455						460			
Phe	Pro														
465															

<210> 73  
 <211> 466  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante FVII (precursor R375W)

10 <400> 73

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg  
 85 90 95  
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser  
 100 105 110  
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp  
 245 250 255  
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp  
 260 265 270  
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala  
 340 345 350  
 Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln  
 355 360 365  
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Trp Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr  
 370 375 380  
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

<210> 74  
 <211> 466  
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Variante FVII (precursor R375K)

5

<400> 74

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1          5          10          15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
          20          25          30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
          35          40          45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
 50          55          60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
 65          70          75          80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
          85          90          95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
          100          105          110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
          115          120          125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
 130          135          140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
 145          150          155          160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
          165          170          175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
          180          185          190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
          195          200          205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
 210          215          220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
 225          230          235          240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
          245          250          255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
          260          265          270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
          275          280          285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
 290          295          300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
 305          310          315          320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
          325          330          335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
          340          345          350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
          355          360          365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Lys Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
          370          375          380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
 385          390          395          400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
          405          410          415

```

Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly  
 420 425 430  
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro  
 450 455 460  
 Phe Pro  
 465

5 <210> 75  
 <211> 304  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Precursor de la isoforma a de IRFT  
 <400> 75

Met Ile Tyr Thr Met Lys Lys Val His Ala Leu Trp Ala Ser Val Cys  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Asn Leu Ala Pro Ala Pro Leu Asn Ala Asp Ser Glu Glu  
 20 25 30  
 Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu Pro Leu Lys  
 35 40 45  
 Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys  
 50 55 60  
 Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu  
 65 70 75 80  
 Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser  
 85 90 95  
 Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala Asn Arg Ile  
 100 105 110  
 Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu  
 115 120 125  
 Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn  
 130 135 140  
 Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly  
 145 150 155 160  
 Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu  
 165 170 175  
 Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly Thr Gln Leu Asn  
 180 185 190  
 Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val Pro Ser Leu  
 195 200 205  
 Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly  
 210 215 220  
 Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly  
 225 230 235 240  
 Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn  
 245 250 255  
 Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly Phe Ile  
 260 265 270  
 Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys  
 275 280 285  
 Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe Val Lys Asn Met  
 290 295 300

15 <210> 76  
 <211> 276  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>  
 <223> Isoforma a de IRFT madura



<400> 76

```

Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu
 1      5      10  15
Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp
 20      25      30
Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
 35      40      45
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn
 50      55      60
Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn
 65      70      75      80
Ala Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe
 85      90      95
Cys Phe Leu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg
 100
Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly
 115      120      125
Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys
 130      135      140
Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly
 145      150      155      160
Thr Gln Leu Asn Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys
 165      170      175
Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
 180      185      190
Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn
 195      200      205
Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly
 210      215      220
Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys
 225      230      235      240
Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys
 245      250      255
Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe
 260      265      270
Val Lys Asn Met
 275

```

5 <210> 77  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Precursor de la isoforma b de IRFT

<400> 77

```

Met Ile Tyr Thr Met Lys Lys Val His Ala Leu Trp Ala Ser Val Cys
 1      5      10      15
Leu Leu Leu Asn Leu Ala Pro Ala Pro Leu Asn Ala Asp Ser Glu Glu
 20      25      30
Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu Pro Pro Leu Lys
 35      40      45
Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys
 50      55      60
Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu
 65      70      75      80
Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser
      85      90      95
Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala Asn Arg Ile
 100      105      110
Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu
 115      120      125
Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn
 130      135      140
Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly
 145      150      155      160
Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu
 165      170      175
Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly Thr Gln Leu Asn
 180      185      190
Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val Pro Ser Leu
 195      200      205
Phe Val Thr Lys Glu Gly Thr Asn Asp Gly Trp Lys Asn Ala Ala His
 210      215      220
Ile Tyr Gln Val Phe Leu Asn Ala Phe Cys Ile His Ala Ser Met Phe
 225      230      235      240
Phe Leu Gly Leu Asp Ser Ile Ser Cys Leu Cys
 245      250

```

<210> 78  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Isoforma b de IRFT madura

10

<400> 78

```

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

```

<210> 79  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> IRFT-2 maduro

10

<400> 79

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

<210> 80  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Quimotripsinógeno B maduro

10

<400> 80

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

```

Asp Phe Pro Ala Gly Thr Leu Cys Ala Thr Thr Gly Trp Gly Lys Thr
 130                               135           140
Lys Tyr Asn Ala Asn Lys Thr Pro Asp Lys Leu Gln Gln Ala Ala Leu
145                               150           155           160
Pro Leu Leu Ser Asn Ala Glu Cys Lys Lys Ser Trp Gly Arg Arg Ile
                               165           170           175
Thr Asp Val Met Ile Cys Ala Gly Ala Ser Gly Val Ser Ser Cys Met
                               180           185           190
Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gln Lys Asp Gly Ala Trp Thr
                               195           200           205
Leu Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Asp Thr Cys Ser Thr Ser Ser
                               210           215           220
Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Thr Lys Leu Ile Pro Trp Val Gln Lys
225                               230           235           240
Ile Leu Ala Ala Asn
                               245

```

- <210> 81
- <211> 3141
- 5 <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
  
- <220>
- 10 <223> Variante 1 de transcrito de FVII
  
- <400> 81

agtcccatgg	ggaatgtcaa	caggcagggg	cagcactgca	gagatttcat	catggtctcc	60
caggccctca	ggctcctctg	ccttctgctt	gggcttcagg	gctgcctggc	tgcaggcggg	120
gtcgctaagg	cctcaggagg	agaaacacgg	gacatgccgt	ggaagccggg	gcctcacaga	180
gtcttctgaa	cccaggaggga	agcccacggc	gtcctgcacc	ggcgcggcg	cgccaacggg	240
ttcctggagg	agctgcggcc	gggctccctg	gagagggagt	gcaaggagga	gcagtgcctc	300
ttcgaggagg	cccgggagat	cttcaaggac	gctgagagga	cgaagctgtt	ctggatttct	360
tacagtgatg	gggaccagtg	tgcctcaagt	ccatgccaga	atgggggctc	ctgcaaggac	420
cagctccagt	cctatatctg	cttctgcctc	cctgccttcg	agggccggaa	ctgtgagacg	480
cacaaggatg	accagctgat	ctgtgtgaac	gagaaacggg	gctgtgagca	gtactgcagt	540
gaccacacgg	gcaccaagcg	ctcctgtcgg	tgccacgagg	ggtactctct	gctggcagac	600
ggggtgtcct	gcacacccac	agtTgaatat	ccatgtggaa	aaatacctat	tctagaaaaa	660
agaaatgcca	gcaaacccca	aggccgaatt	gtggggggca	aggtgtgcc	caaaggggag	720
tgtccatggc	aggtcctgtt	gttggTgaat	ggagctcagt	tgtgtggggg	gaccctgatc	780
aacaccatct	gggtggctctc	cgcggccac	tgtttcgaca	aaatcaagaa	ctggaggaac	840
ctgatcgcg	tgctgggcga	gcacgacctc	agcagacacg	acggggatga	gcagagccgg	900
cggtggcgg	aggtcatcat	cccagcac	tacgtcccgg	gcaccaccaa	ccactgcagt	960
gcgctgctcc	gcctgcacca	gcccgtggtc	ctcactgacc	atgtggtgcc	cctctgcctg	1020
ccggaacgga	cgttctctga	gaggacgctg	gccttcgtgc	gcttctcatt	ggtcagcggc	1080
tggggccagc	tgctggaccg	tggcggccag	gcctggagc	tcatggtcct	caactgtccc	1140
cggctgatga	cccaggactg	cctgcagcag	tcacggaagg	tgggagactc	cccaaatatc	1200
acggagtaca	tgttctgtgc	cggtactcgg	gatggcagca	aggactcctg	caagggggac	1260
agtggaggcc	cacatgccac	ccactaccgg	ggcactggtt	acctgacggg	catcgtcagc	1320
tggggccagg	gctgcgcaac	cgtgggccac	tttgggggtg	acaocagggt	ctccagtagc	1380
atcgagtggc	tgcaaaagct	catgcgctca	gagccacgcc	caggagtccct	cctgcgagcc	1440
ccatttccct	agcccagcag	ccctggcctg	tggagagaaa	gccaaaggctg	cgtcgaactg	1500
tcctggcacc	aaatcccata	tattctctctg	cagttaatgg	ggtagaggag	ggcatgggag	1560
ggagggagag	gtggggaggg	agacagagac	agaaacagag	agagacagag	acagagagag	1620
actgagggag	agactctgag	gacatggaga	gagactcaaa	gagactccaa	gattcaaaga	1680
gactaataga	gacacagaga	tggaatagaa	aagatgagag	gcagagggcag	acagggcctg	1740
gacagagggg	caggggagtg	ccaagggtgt	cctgagggca	gacagcccag	gcagagctcc	1800
ttacctccct	tcagccaagc	ccacctgcac	gtgatctgct	ggcctcaggc	tgctgctctg	1860
ccttcattgc	tggagacagt	agaggcatga	acacacatgg	atgcacacac	acacacgcca	1920
atgcacacac	acagagatat	gcacacacac	ggatgcacac	acagatggtc	acacagagat	1980
acgcaaacac	accgatgcac	acgcacatag	agatatgcac	acacagatgc	acacacagat	2040
atacacatgg	atgcacgcac	atgccaatgc	acgcacacat	cagtgcacac	ggatgcacag	2100
agatatgcac	acaccgatgt	gcgcacacac	agatatgcac	acacatggat	gagcacacac	2160

acaccaatgc	gcacacacac	cgatgtacac	acacagatgc	acacacagat	gcacacacac	2220
cgatgctgac	tccatgtgtg	ctgtcctctg	aaggcggttg	tttagctctc	acttttctgg	2280
ttcttatcca	tatcatctt	cacttcagac	aattcagaag	catcaccatg	catggtggcg	2340
aatgccccca	aactctccc	caaatgtatt	tctcccttog	ctgggtgccg	ggctgcacag	2400
actattcccc	acctgcttcc	cagcttcaca	ataaacggct	gcgtctcctc	cgcacacctg	2460
tggTgcctgc	caccactcgg	gttgcccatt	atcattttt	ggagcccccg	gtgctcatcc	2520
tctgagatgc	tcttttcttt	cacaattttc	aacatcactg	aaatgaacc	tcacatggaa	2580
gctatttttt	aaaaacaaaa	gctgtttgat	agatgtttga	ggctgtagct	cccaggatcc	2640
tgtggaattg	gatgttctct	ccctgccaca	gcccttgtca	atgatatttc	acagagaccc	2700
tgggagcacc	tgctcaagag	tcaggyaac	acgcatcact	aaatgcaagt	tcccaggccc	2760
tggctgcagt	gggaggacct	ggcaagctgc	actcttgctg	agtccccagg	gtggtggaag	2820
aagaatgaga	aacacatgaa	cagagaaatg	gggaggtgac	aaacagtgcc	cccactcaga	2880
ctccggcaag	cacggctcag	agagtggact	cgatgccatc	cctgcagggc	cgtcctgggc	2940
accactggca	ctcacagcag	caaggtgggc	accattggca	ctcacagcag	caagggcaggc	3000
accagcaacc	cacctcgggg	gcactcaggc	atcatctact	tcagagcaga	cagggctctat	3060
gaactacag	cgtgggctgc	ttccaaggca	ccctgctctt	gtaaataaag	ttttatggga	3120
acacaaaaaa	aaaaaaaaaa	a				3141

<210> 82  
 <211> 3075  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Variante 2 de transcrito de FVII

5

10

<400> 82

```

agtcccatgg ggaatgtcaa caggcagggg cagcactgca gagatttcat catggtctcc 60
caggccctca ggctcctctg cottctgctt gggcttcagg gctgcctggc tgcagtcttc 120
gtaaccacag aggaagccoa cggogt cctg caccggcgcc ggcgcgcaa cgggttctg 180
gaggagctgc ggccgggctc cctggagagg gagtgcdaagg aggagcagt g ctcttcagag 240
gaggcccggg agatcttcaa ggacgcggag aggacgaagc tgttctggat ttcttacagt 300
gatggggacc agtgtgcctc aagtccatgc cagaatgggg gctcctgcaa ggaccagctc 360
cagtctata tctgcttctg cctccctgcc ttcgagggcc ggaactgtga gacgcacaag 420
gatgaccagc tgatctgtgt gaacgagaac ggcgctgtg agcagtactg cagtgaccac 480
acgggcacca agcgcctcctg tcggtgccac gaggggtact ctctgctggc agacgggggtg 540
tcctgcacac ccacagttga atatccatgt ggaaaaatac ctattctaga aaaaagaaat 600
gccagcaaac cccaaggcgg aattgtgggg ggcaagggtg gccccaaagg ggagtgtcca 660
tggcaggtcc tgttgttggg gaatggagct cagttgtgtg gggggaccct gatcaacacc 720
atctgggtgg tctccgcggg ccaactgtttc gacaaaatca agaactggag gaacctgatc 780
gcggtctatg gcgagcacga cctcagcgag cacgcagcgg atgagcagag ccggcgggtg 840
gcgcaggtca tcatccccag cacgtacgtc ccgggcacca ccaaccacga catcgcgctg 900
ctccgctctc accagccctg ggtcctcact gaccatgtgg tccccctctg cctgcccgaa 960
cggacgttct ctgagaggac gctggccttc gtgcgcttct cattgggtcag cggctggggc 1020
cagctgctgg accgtggcgc cacggccctg gagctcatgg tcctcaacgt gccccggctg 1080
atgaccacag actgcctgca gcagtacgg aaggtgggag actccccaaa tatcacggag 1140
tacatgttct gtgccggcta ctcggatggc agcaaggact cctgcaaggg ggacagtgga 1200
ggcccacatg ccaccocacta ccggggcacg ttgtacctga cgggcatcgt cagctggggc 1260
cagggctgcg caaccgtggg ccactttggg gtgtacacca ggggtctcca gtacatcgag 1320
tggctgcaaa agctcatgcg ctcagagcca cgcccaggag tctcctgcg agccccattt 1380
ccctagccca gcagccctgg cctgtggaga gaaagccaag gctgogt cga actgtcctgg 1440
caccaaatcc catatattct tctgcagtta atggggtaga ggagggcatg ggagggaggg 1500
agaggtgggg agggagacag agacagaaac agagagagac agagacagag agagactgag 1560
ggagagactc tgaggacatg gagagagact caaagagact ccaagattca aagagactaa 1620
tagagacaca gagatggaat agaaaagatg agagcgagag gcagacaggg gctggcaga 1680
ggggcagggg agtgccaagg ttgtcctgga ggcagacagc ccagctgagc ctcttacct 1740
ccctcagcc aagccacct gcacgtgatc tgctggcctc aggtctgtgc tctgectca 1800
ttgctggaga cagttagagg atgaacacac atggatgcac acacacacac gccaatgcac 1860
acacacagag atatgcacac acacggatgc acacacagat ggtcacacag agatacgcaa 1920
acacaccgat gcacacgcac atagagatat gcacacacag atgcacacac agatatacac 1980
atggatgcac gcacatgcca atgcacgcac acatcagtgc acacggatgc acagagatat 2040
gcacacaccg atgtgcgcac acacagatat gcacacacat ggatgagcac acacacacca 2100
atgcgcacac acaccgatgt acacacacag atgcacacac agatgcacac acaccgatgc 2160

```

```

tgactccatg tgtgctgtcc tctgaaggcg gttgtttagc tctcactttt ctggttctta 2220
tccattatca tcttcacttc agacaattca gaagcatcac catgcatggt ggcgaatgcc 2280
ccccaaactc cccccaaatg tatttctccc ttcgtgggt gccgggctgc acagactatt 2340
ccccacctgc ttcccagctt cacaataaac ggctgcgtct cctccgcaca cctgtggtgc 2400
ctgccaccca ctgggttgcc catgattcat ttttgagcc cccggtgctc atcctctgag 2460
atgctctttt ctttcacaat tttcaacatc actgaaatga accctcacat ggaagctatt 2520
ttttaaanaa aaaagctgtt tgatagatgt ttgaggtgt agctcccagg atcctgtgga 2580
attggatggt ctctccctgc cacagccctt gtoaatgata tttcacagag accctgggag 2640
cacctgctca agagttaggg acacacgcac cactaaatgc aagtccccag gccctggctg 2700
cagtgggagg acctggcaag ctgactctt gctgactccc caggggtggtg gaagaagaat 2760
gagaaacaca tgaacagaga aatggggagg tgacaaacag tgccccact cagactccgg 2820
caagcacggc tcagagagtg gactcgatgc catccctgca gggcctcct gggcaccact 2880
ggcactcaca gcagcaagggt gggcaccatt ggcactcaca gcagcaaggc aggcaccagc 2940
aaccacctc gggggcactc aggcacatc tacttcagag cagacagggt ctatgaacta 3000
cagccgtggg ctgcttccaa ggcaccctgc tcttghtaat aaagttttat gggaaacacaa 3060
aaaaaaaaa aaaaa 3075

```

- 5 <210> 83
- <211> 46
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- 10 <220>
- <223> dominio Gla del factor IX

<400> 83

**Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg**  
**1 5 10 15**  
**Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe**  
**20 25 30**  
**Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val**  
**35 40 45**

5 <210> 84  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> dominio Gla del factor X

<400> 84

**Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu**  
**1 5 10 15**  
**Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu**  
**20 25 30**  
**Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys**  
**35 40 45**

15 <210> 85  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 20 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> dominio Gla de protrombina/trombina

25 <400> 85

**Ala Asn Thr Phe Leu Glu Glu Val Arg Lys Gly Asn Leu Glu Arg Glu**  
**1 5 10 15**  
**Cys Val Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe Glu Ala Leu Glu**  
**20 25 30**  
**Ser Ser Thr Ala Thr Asp Val Phe Trp Ala Lys Tyr Thr Ala**  
**35 40 45**

30 <210> 86  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>  
 <223> dominio Gla de proteína C

<400> 86

**Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg His Ser Ser Leu Glu Arg Glu**  
**1 5 10 15**  
**Cys Ile Glu Glu Ile Cys Asp Phe Glu Ala Lys Glu Ile Phe Gln**  
**20 25 30**  
**Asn Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His Val Asp**  
**35 40 45**

40 <210> 87  
 <211> 46  
 <212> PRT



<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> dominio Gla de proteína S

5

<400> 87

```

Ala Asn Ser Leu Leu Glu Glu Thr Lys Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu
 1          5          10          15
Cys Ile Glu Glu Leu Cys Asn Lys Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
          20          25          30
Asn Asp Pro Glu Thr Asp Tyr Phe Tyr Pro Lys Tyr Leu Val
          35          40          45
    
```

10

<210> 88

<211> 47

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<220>

<223> dominio Gla de osteocalcina (proteína Gla del hueso)

<400> 88

```

Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu
 1          5          10          15
Glu Pro Arg Arg Glu Val Cys Glu Leu Asn Pro Asp Cys Asp Glu Leu
          20          25          30
Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly
          35          40          45
    
```

20

<210> 89

<211> 47

<212> PRT

25

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> dominio Gla de proteína Gla de la matriz

30

<400> 89

```

Arg Ala Lys Val Gln Glu Arg Ile Arg Glu Arg Ser Lys Pro Val His
 1          5          10          15
Glu Leu Asn Arg Glu Ala Cys Asp Asp Tyr Arg Leu Cys Glu Arg Tyr
          20          25          30
Ala Met Val Tyr Gly Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Arg Tyr Phe Arg
          35          40          45
    
```

35

<210> 90

<211> 42

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

40

<223> dominio Gla de proteína específica de detención del crecimiento 6

<400> 90

```

Phe Glu Glu Ala Lys Gln Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu
 1          5          10          15
Leu Cys Ser Arg Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Asp Pro Glu
          20          25          30
Thr Asp Tyr Phe Tyr Pro Arg Tyr Leu Asp
          35          40
    
```

45

5  
 <210> 91  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <220>  
 <223> dominio Gla de proteína Z  
 <400> 91

10

<b>Ala</b>	<b>Gly</b>	<b>Ser</b>	<b>Tyr</b>	<b>Leu</b>	<b>Leu</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Leu</b>	<b>Phe</b>	<b>Glu</b>	<b>Gly</b>	<b>Asn</b>	<b>Leu</b>	<b>Glu</b>	<b>Lys</b>
<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>					<b>15</b>	
<b>Glu</b>	<b>Cys</b>	<b>Tyr</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Ile</b>	<b>Cys</b>	<b>Val</b>	<b>Tyr</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Ala</b>	<b>Arg</b>	<b>Glu</b>	<b>Val</b>	<b>Phe</b>
			<b>20</b>					<b>25</b>					<b>30</b>		
<b>Glu</b>	<b>Asn</b>	<b>Glu</b>	<b>Val</b>	<b>Val</b>	<b>Thr</b>	<b>Asp</b>	<b>Glu</b>	<b>Phe</b>	<b>Trp</b>	<b>Arg</b>	<b>Arg</b>	<b>Tyr</b>	<b>Lys</b>		
		<b>35</b>					<b>40</b>					<b>45</b>			

15  
 <210> 92  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <220>  
 <223> dominio Gla del factor VII  
 <400> 92

20

<b>Ala</b>	<b>Asn</b>	<b>Ala</b>	<b>Phe</b>	<b>Leu</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Leu</b>	<b>Arg</b>	<b>Pro</b>	<b>Gly</b>	<b>Ser</b>	<b>Leu</b>	<b>Glu</b>	<b>Arg</b>	<b>Glu</b>
<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>					<b>15</b>	
<b>Cys</b>	<b>Lys</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Gln</b>	<b>Cys</b>	<b>Ser</b>	<b>Phe</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Ala</b>	<b>Arg</b>	<b>Glu</b>	<b>Ile</b>	<b>Phe</b>	<b>Lys</b>
			<b>20</b>					<b>25</b>					<b>30</b>		
<b>Asp</b>	<b>Ala</b>	<b>Glu</b>	<b>Arg</b>	<b>Thr</b>	<b>Lys</b>	<b>Leu</b>	<b>Phe</b>	<b>Trp</b>	<b>Ile</b>	<b>Ser</b>	<b>Tyr</b>	<b>Ser</b>			
		<b>35</b>					<b>40</b>					<b>45</b>			

25  
 <210> 93  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> *Notechis scutatus scutatus*  
 <220>  
 <223> Proteasa de tipo factor de coagulación de veneno Xa - dominio Gla  
 <220>  
 <221> INCIERTO  
 <222> (0)...(0)  
 <223> Xaa podría ser cualquier aminoácido  
 <400> 93

30

35

40

<b>Ser</b>	<b>Asn</b>	<b>Ser</b>	<b>Leu</b>	<b>Phe</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Ile</b>	<b>Arg</b>	<b>Pro</b>	<b>Gly</b>	<b>Asn</b>	<b>Ile</b>	<b>Glu</b>	<b>Arg</b>	<b>Glu</b>
<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>					<b>15</b>	
<b>Cys</b>	<b>Ile</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Lys</b>	<b>Cys</b>	<b>Ser</b>	<b>Lys</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Ala</b>	<b>Arg</b>	<b>Glu</b>	<b>Val</b>	<b>Phe</b>	<b>Glu</b>
			<b>20</b>					<b>25</b>					<b>30</b>		
<b>Asp</b>	<b>Asn</b>	<b>Glu</b>	<b>Lys</b>	<b>Thr</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Phe</b>								
		<b>35</b>					<b>40</b>								

45  
 <210> 94  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> *Tropidechis carinatus*  
 <220>  
 <223> Proteasa de tipo factor de coagulación de veneno Xa - dominio Gla

<400> 94

**Ser Asn Ser Leu Phe Glu Glu Ile Arg Pro Gly Asn Ile Glu Arg Glu**  
**1 5 10 15**  
**Cys Ile Glu Glu Lys Cys Ser Lys Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu**  
**20 25 30**  
**Asp Asn Glu Lys Thr Glu Thr Phe Trp Asn Val Tyr Val Asp**  
**35 40 45**

5 <210> 95  
 <211> 464  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Precursor de antitrombina III

<400> 95

**Met Tyr Ser Asn Val Ile Gly Thr Val Thr Ser Gly Lys Arg Lys Val**  
**1 5 10 15**  
**Tyr Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ile Gly Phe Trp Asp Cys Val Thr Cys**  
**20 25 30**

15

His Gly Ser Pro Val Asp Ile Cys Thr Ala Lys Pro Arg Asp Ile Pro  
 35 40 45  
 Met Asn Pro Met Cys Ile Tyr Arg Ser Pro Glu Lys Lys Ala Thr Glu  
 50 55 60  
 Asp Glu Gly Ser Glu Gln Lys Ile Pro Glu Ala Thr Asn Arg Arg Val  
 65 70 75 80  
 Trp Glu Leu Ser Lys Ala Asn Ser Arg Phe Ala Thr Thr Phe Tyr Gln  
 85 90 95  
 His Leu Ala Asp Ser Lys Asn Asp Asn Asp Asn Ile Phe Leu Ser Pro  
 100 105 110  
 Leu Ser Ile Ser Thr Ala Phe Ala Met Thr Lys Leu Gly Ala Cys Asn  
 115 120 125  
 Asp Thr Leu Gln Gln Leu Met Glu Val Phe Lys Phe Asp Thr Ile Ser  
 130 135 140  
 Glu Lys Thr Ser Asp Gln Ile His Phe Phe Phe Ala Lys Leu Asn Cys  
 145 150 155 160  
 Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Asn Lys Ser Ser Lys Leu Val Ser Ala Asn  
 165 170 175  
 Arg Leu Phe Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Asn Glu Thr Tyr Gln Asp  
 180 185 190  
 Ile Ser Glu Leu Val Tyr Gly Ala Lys Leu Gln Pro Leu Asp Phe Lys  
 195 200 205  
 Glu Asn Ala Glu Gln Ser Arg Ala Ala Ile Asn Lys Trp Val Ser Asn  
 210 215 220  
 Lys Thr Glu Gly Arg Ile Thr Asp Val Ile Pro Ser Glu Ala Ile Asn  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Thr Val Leu Val Leu Val Asn Thr Ile Tyr Phe Lys Gly Leu  
 245 250 255  
 Trp Lys Ser Lys Phe Ser Pro Glu Asn Thr Arg Lys Glu Leu Phe Tyr  
 260 265 270  
 Lys Ala Asp Gly Glu Ser Cys Ser Ala Ser Met Met Tyr Gln Glu Gly  
 275 280 285  
 Lys Phe Arg Tyr Arg Arg Val Ala Glu Gly Thr Gln Val Leu Glu Leu  
 290 295 300  
 Pro Phe Lys Gly Asp Asp Ile Thr Met Val Leu Ile Leu Pro Lys Pro  
 305 310 315 320  
 Glu Lys Ser Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Leu Thr Pro Glu Val Leu  
 325 330 335  
 Gln Glu Trp Leu Asp Glu Leu Glu Glu Met Met Leu Val Val His Met  
 340 345 350  
 Pro Arg Phe Arg Ile Glu Asp Gly Phe Ser Leu Lys Glu Gln Leu Gln  
 355 360 365  
 Asp Met Gly Leu Val Asp Leu Phe Ser Pro Glu Lys Ser Lys Leu Pro  
 370 375 380  
 Gly Ile Val Ala Glu Gly Arg Asp Asp Leu Tyr Val Ser Asp Ala Phe  
 385 390 395 400  
 His Lys Ala Phe Leu Glu Val Asn Glu Glu Gly Ser Glu Ala Ala Ala  
 405 410 415  
 Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg Ser Leu Asn Pro Asn Arg Val  
 420 425 430  
 Thr Phe Lys Ala Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile Arg Glu Val Pro  
 435 440 445  
 Leu Asn Thr Ile Ile Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro Cys Val Lys  
 450 455 460

<210> 96  
 <211> 432  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Antitrombina III madura

<400> 96

```

His Gly Ser Pro Val Asp Ile Cys Thr Ala Lys Pro Arg Asp Ile Pro
 1      5      10      15
Met Asn Pro Met Cys Ile Tyr Arg Ser Pro Glu Lys Lys Ala Thr Glu
 20      25      30
Asp Glu Gly Ser Glu Gln Lys Ile Pro Glu Ala Thr Asn Arg Arg Val
 35      40      45
Trp Glu Leu Ser Lys Ala Asn Ser Arg Phe Ala Thr Thr Phe Tyr Gln
 50      55      60
His Leu Ala Asp Ser Lys Asn Asp Asn Asp Asn Ile Phe Leu Ser Pro
 65      70      75      80
Leu Ser Ile Ser Thr Ala Phe Ala Met Thr Lys Leu Gly Ala Cys Asn
 85      90      95
Asp Thr Leu Gln Gln Leu Met Glu Val Phe Lys Phe Asp Thr Ile Ser
 100     105     110
Glu Lys Thr Ser Asp Gln Ile His Phe Phe Phe Ala Lys Leu Asn Cys
 115     120     125
Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Asn Lys Ser Ser Lys Leu Val Ser Ala Asn
 130     135     140
Arg Leu Phe Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Asn Glu Thr Tyr Gln Asp
 145     150     155     160
Ile Ser Glu Leu Val Tyr Gly Ala Lys Leu Gln Pro Leu Asp Phe Lys
 165     170     175
Glu Asn Ala Glu Gln Ser Arg Ala Ala Ile Asn Lys Trp Val Ser Asn
 180     185     190
Lys Thr Glu Gly Arg Ile Thr Asp Val Ile Pro Ser Glu Ala Ile Asn
 195     200     205
Glu Leu Thr Val Leu Val Leu Val Asn Thr Ile Tyr Phe Lys Gly Leu
 210     215     220
Trp Lys Ser Lys Phe Ser Pro Glu Asn Thr Arg Lys Glu Leu Phe Tyr
 225     230     235     240
Lys Ala Asp Gly Glu Ser Cys Ser Ala Ser Met Met Tyr Gln Glu Gly
 245     250     255
Lys Phe Arg Tyr Arg Arg Val Ala Glu Gly Thr Gln Val Leu Glu Leu
 260     265     270
Pro Phe Lys Gly Asp Asp Ile Thr Met Val Leu Ile Leu Pro Lys Pro
 275     280     285
Glu Lys Ser Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Leu Thr Pro Glu Val Leu
 290     295     300
Gln Glu Trp Leu Asp Glu Leu Glu Glu Met Met Leu Val Val His Met
 305     310     315     320
Pro Arg Phe Arg Ile Glu Asp Gly Phe Ser Leu Lys Glu Gln Leu Gln
 325     330     335
Asp Met Gly Leu Val Asp Leu Phe Ser Pro Glu Lys Ser Lys Leu Pro
 340     345     350
Gly Ile Val Ala Glu Gly Arg Asp Asp Leu Tyr Val Ser Asp Ala Phe
 355     360     365
His Lys Ala Phe Leu Glu Val Asn Glu Glu Gly Ser Glu Ala Ala Ala
 370     375     380
Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg Ser Leu Asn Pro Asn Arg Val
 385     390     395     400
Thr Phe Lys Ala Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile Arg Glu Val Pro
 405     410     415
Leu Asn Thr Ile Ile Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro Cys Val Lys
 420     425     430

```

<210> 97  
 <211> 263  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> THIOLEST

10 <222> (0)...(0)  
 <223> Factor tisular maduro

<400> 97

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln  
 20 25 30  
 Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys  
 35 40 45  
 Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val  
 50 55 60  
 Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala  
 65 70 75 80  
 Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn  
 85 90 95  
 Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr  
 100 105 110  
 Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu  
 115 120 125  
 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg  
 130 135 140  
 Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu  
 165 170 175  
 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val  
 180 185 190  
 Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu  
 195 200 205  
 Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile  
 210 215 220  
 Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile  
 225 230 235 240  
 Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu  
 245 250 255  
 Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser  
 260

5 <210> 98  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Variante del Factor VIIa V21D/E154V/M156Q

<400> 98

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95

15

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Als Pro Phe Pro  
 405

<210> 99  
 <211> 4278  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> vector pCMV Script

10 <400> 99

atgcattagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga 60  
 gttccgcggt acataactta cggtaaattgg cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg 120  
 cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaatagggg ctttccattg 180  
 acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca 240  
 tatgccaaat acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct ggcattatgc 300  
 ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc 360  
 tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc 420  
 acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcaccaaaa 480  
 tcaacgggac tttccaaat gtcgtaacaa ctccgccccca ttgacgcaaa tgggocgtag 540  
 gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctggttta gtgaaccgtc agatccgcta 600  
 gcgattacgc caagctcgaa attaaccctc actaaaggga acaaaagctg gagctccacc 660  
 gcggtggcgg ccgctctagc cggggcggat cccccgggct gcaggaattc gatatcaagc 720

ttatcgatac	cgtcgacctc	gagggggggc	ccggtaccag	gtaagtgtac	ccaattcgcc	780
ctatagttag	togtattaca	attcactcga	tccgcttcc	caacagttgc	gcagcctgaa	840
tggcgaatgg	agatccaatt	tttaagtgt a	taatgtgtta	aactactgat	tctaattggt	900
tgtgtatfff	agattcacag	tcccaaggct	catttcaggc	ccctcagtc	tcacagctcg	960
ttcatgatca	taatcagcca	taccacattt	gtagaggttt	tacttgcttt	aaaaaacctc	1020
ccacacctcc	ccctgaacct	gaaacataaa	atgaatgcaa	ttgttgttgt	taacttgttt	1080
attgcagctt	ataatggtta	caaataaagc	aatagcatca	caaatttcac	aaataaagca	1140
tttttttcc	tgcatcttag	ttgtggtttg	tccaaactca	tcaatgtatc	ttaacgcgta	1200
aattgtaagc	gttaatat	tgtaaaatt	cggttaaat	ttttgttaa	tcagctcatt	1260
tttaacca	taggccgaaa	tccgcaaat	cccttataaa	tcaaaagaat	agaccgagat	1320
agggttgagt	gttgttccag	tttggaaaca	gagtcacta	ttaaagaacg	tggactcaa	1380
cgtcaaaggg	cgaaaaaccg	tctatcaggg	cgatggcca	ctacgtgaac	catcacctca	1440
atcaagtttt	ttggggtcga	ggtgccgtaa	agcactaat	cggaacccta	aagggagccc	1500
ccgatttaga	gcttgacggg	gaaagccggc	gaacgtggcg	agaaaggaag	ggaagaaagc	1560
gaaaggagcg	ggcgctaggg	cgctggcaag	tgtagcggtc	acgctgcgcy	taaccaccac	1620
accogccgcy	cttaatgcgc	cgctacaggg	cgctcaggt	ggcacttttc	ggggaaatgt	1680
gcgoggaacc	cctatttgtt	tatttttcta	aatacattca	aatatgtatc	cgctcatgag	1740
acaataacc	tgataaatgc	ttcaataata	ttgaaaaagg	aagaatcctg	aggcggaaag	1800
aaccagctgt	ggaatgtgtg	tcagttaggg	tgtggaaagt	cccaggctc	cccagcaggo	1860
agaagtatgc	aaagcatgca	tctcaattag	tcagcaacca	ggtgtggaaa	gtccccaggg	1920
tccccagcag	gcagaagtat	gcaaagcatg	catctcaatt	agtcagcaac	catagctccg	1980
cccctaactc	cgcccatccc	gcccctaact	ccgccagtt	ccgccattc	tccgccccat	2040
ggctgactaa	ttttttttat	ttatgcagag	gocgagggcg	cctcggcctc	tgagctatc	2100
cagaagttag	gaggaggctt	ttttggaggc	ctaggctttt	gcaaagatcg	atcaagagac	2160
aggatgagga	tcgtttcgca	tgattgaaca	agatggattg	cacgcaggtt	ctcggccgcy	2220
ttgggtggag	aggctattcg	gotatgactg	ggcacaacag	acaatcggct	gctctgatgc	2280
cgccgtgttc	cggtgtcag	cgcaagggcg	cccgttctt	tttgtcaaga	ccgacctgtc	2340
cggtgccctg	aatgaactgc	aagacgaggg	agcgcggcta	togtggctgg	ccacgacggg	2400
cgttccttgc	gcagctgtgc	tcgacgttgt	cactgaagcg	ggaagggact	ggctgctatt	2460
gggogaagtg	ccggggcagg	atctcctgtc	atctcactt	gctcctgcc	agaaagtatc	2520
catcaaggct	gcctcaatgc	ggcggctgca	tacgcttgat	ccggctacct	gccattcga	2580
ccaccaagcg	aaacatcgca	tcgagcagc	acgtactcgg	atggaagccg	gtcttgtcga	2640
tcaggatgat	ctggacgaag	aacatcaggg	gctcgcgcca	gccaactgt	tcgccaggct	2700
caaggcgagc	atgcccgagc	gocgagatct	cgctcgtgacc	catggcgatg	cctgcttgcc	2760
gaatatcatg	gtggaaaatg	gcccgttttc	tggattcact	gactgtggcc	ggctgggtgt	2820
ggcggaccgc	tatcaggaca	tagcgttggc	taccctgat	attgctgaag	aacttggcgg	2880
cgaatgggct	gaccgcttcc	tcgtgcttta	cgctatcgcc	gctccgatt	cgagcgcatt	2940
cgcttctat	cgcttcttg	acgagttctt	ctgagcggga	ctctggggt	cgaaatgacc	3000
gaccaagcga	cgcccaacct	gccatcacga	gatttcgatt	ccaccgccgc	cttctatgaa	3060
aggttgggct	toggaatcgt	tttccgggac	gcccgttggg	tgatcctcca	gcccggggat	3120
ctcatgctgg	agttcttcgc	ccaccctagg	gggaggctaa	ctgaaacacg	gaaggagaca	3180
ataccggaag	gaaccgcgc	tatgacggca	ataaaaagac	agaataaaac	gcacgggtgt	3240
gggtcgtttg	ttcataaacg	cggggttcgg	tcccagggct	ggcactctgt	cgatacccca	3300
ccgagacccc	attggggcca	atacggccgc	gtttcttctt	tttccccacc	ccacccccca	3360
agttcgggtg	aaggcccagg	gctcgcagcc	aacgtcgggg	cggcagggcc	tgccatagcc	3420
tcaggttact	catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	3480
taggtgaaga	tcctttttga	taatctcatg	accaaaatcc	cttaacgtga	gttttctgtc	3540
cactgagcgt	cagaccccgt	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	ttttttctg	3600
cgctaatct	gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgt	ttgtttgccc	3660
gatcaagagc	taccaactct	ttttccgaag	gtactggct	tcagcagagc	gcagatacca	3720
aatactgtcc	ttctagtgt a	gcccgtagtt a	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	3780
cctacatacc	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtg	cgataagctg	3840
tgtcttaccg	ggttggactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggtgga	3900
acgggggggt	cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	3960
ctacagcgtg	agctatgaga	aagocccaag	cttccogaag	ggagaaaggc	ggacaggtat	4020
ccgtaagcg	gcagggctcg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	4080
tggatcttt	atagtoctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atttttgtga	4140
tgtctgtcag	ggggcgggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	4200
ctggccttt	gctggccttt	tgctcacatg	ttcttctctg	cgttatcccc	tgattctgtg	4260
gataaccgta	ttaccgcc					4278

- <210> 100
- <211> 45
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial



<220>  
 <223> Cebador directo de PCR del Factor VII CBO-125

5 <400> 100  
 gcatcatgac gtgacggatc cgccacatg gtcctccagg ccctc 45

<210> 101  
 <211> 45  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador inverso de PCR del Factor VII CBO-126

15 <400> 101  
 gatcgtacga tacgtgaatt cctagggaaa tggggctcgc aggag 45

<210> 102  
 <211> 1398  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>  
 <223> ADNc de FVII (molde para PCR)

25 <400> 102

<b>atggtctccc</b>	<b>aggccctcag</b>	<b>gctcctctgc</b>	<b>cttctgcttg</b>	<b>ggcttcaggg</b>	<b>ctgcctggct</b>	<b>60</b>
<b>gcaggcgggg</b>	<b>tcgctaaggc</b>	<b>ctcaggagga</b>	<b>gaaacacggg</b>	<b>acatgccgtg</b>	<b>gaagccgggg</b>	<b>120</b>
<b>cctcacagag</b>	<b>tcttcgtaac</b>	<b>ccaggaggaa</b>	<b>gccacggcg</b>	<b>tcctgcaccg</b>	<b>gcgccggcgc</b>	<b>180</b>
<b>gccaacgcgt</b>	<b>tectggagga</b>	<b>gctgcggccg</b>	<b>ggctccctgg</b>	<b>agagggagtg</b>	<b>caaggaggag</b>	<b>240</b>
<b>cagtgtcct</b>	<b>tcgaggaggc</b>	<b>ccgggagatc</b>	<b>ttcaaggacg</b>	<b>cggagaggac</b>	<b>gaagotgttc</b>	<b>300</b>
<b>tggatttctt</b>	<b>acagtgatgg</b>	<b>ggaccagtgt</b>	<b>gcctcaagtc</b>	<b>catgccagaa</b>	<b>tgggggctcc</b>	<b>360</b>
<b>tgcaaggacc</b>	<b>agctccagtc</b>	<b>ctatatctgc</b>	<b>ttctgcctcc</b>	<b>ctgccttcga</b>	<b>gggccggaac</b>	<b>420</b>
<b>tgtgagacgc</b>	<b>acaaggatga</b>	<b>ccagctgatc</b>	<b>tgtgtgaacg</b>	<b>agaacggcgg</b>	<b>ctgtgagcag</b>	<b>480</b>
<b>tactgcagtg</b>	<b>accacacggg</b>	<b>caccaagcgc</b>	<b>tcctgtcggg</b>	<b>gccacgaggg</b>	<b>gtactctctg</b>	<b>540</b>
<b>ctggcagcg</b>	<b>gggtgtcctg</b>	<b>cacaccaca</b>	<b>gttgaatata</b>	<b>catgtggaaa</b>	<b>aatacctatt</b>	<b>600</b>
<b>ctagaaaaaa</b>	<b>gaaatgccag</b>	<b>caaaccocaa</b>	<b>ggccgaattg</b>	<b>tggggggcaa</b>	<b>ggtgtgcccc</b>	<b>660</b>
<b>aaaggggagt</b>	<b>gtccatggca</b>	<b>ggtcctgttg</b>	<b>ttggtgaatg</b>	<b>gagctcagtt</b>	<b>gtgtgggggg</b>	<b>720</b>
<b>accctgatca</b>	<b>acaccatctg</b>	<b>ggtggtctcc</b>	<b>gcggcccaact</b>	<b>gtttcgacaa</b>	<b>aatcaagaac</b>	<b>780</b>
<b>tggaggaacc</b>	<b>tgatcgcggt</b>	<b>gctgggcgag</b>	<b>cacgacctca</b>	<b>gcgagcacga</b>	<b>cggggatgag</b>	<b>840</b>
<b>cagagccggc</b>	<b>gggtggcgca</b>	<b>ggtcatcatc</b>	<b>cccagcacgt</b>	<b>acgtcccggg</b>	<b>caccaccaac</b>	<b>900</b>
<b>cacgacatcg</b>	<b>cgctgctccg</b>	<b>cctgcaccag</b>	<b>cccgtggtcc</b>	<b>tcactgacca</b>	<b>tgtggtgccc</b>	<b>960</b>
<b>ctctgcctgc</b>	<b>ccgaacggac</b>	<b>gttctctgag</b>	<b>aggacgctgg</b>	<b>ccttcgtgcg</b>	<b>cttctcattg</b>	<b>1020</b>
<b>gtcagcggct</b>	<b>ggggccagct</b>	<b>gctggaccgt</b>	<b>gycgccacgg</b>	<b>ccctggagct</b>	<b>catggtcctc</b>	<b>1080</b>
<b>aacgtgcccc</b>	<b>ggotgatgac</b>	<b>ccaggactgc</b>	<b>ctgcagcagt</b>	<b>cacggaaggt</b>	<b>gggagactcc</b>	<b>1140</b>
<b>ccaaatatca</b>	<b>cggagtacat</b>	<b>gttctgtgcc</b>	<b>ggctactcgg</b>	<b>atggcagcaa</b>	<b>ggactcctgc</b>	<b>1200</b>
<b>aagggggaca</b>	<b>gtggaggccc</b>	<b>acatgccacc</b>	<b>cactaccggg</b>	<b>gcacgtggtg</b>	<b>cctgacgggc</b>	<b>1260</b>
<b>atcgtcagct</b>	<b>ggggccaggg</b>	<b>ctgcgcaacc</b>	<b>gtgggccact</b>	<b>ttgggggtga</b>	<b>caccagggtc</b>	<b>1320</b>
<b>tcccagtaaa</b>	<b>tcgagtggct</b>	<b>gcaaaagctc</b>	<b>atgcgctcag</b>	<b>agccacgccc</b>	<b>aggagtctct</b>	<b>1380</b>
<b>ctgcgagccc</b>	<b>catttccc</b>					<b>1398</b>

30 <210> 103  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> secuencia de unión a albúmina de suero

40 <400> 103

**Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp**  
**1 5 10 15**  
**Glu Asp Asp Phe**  
**20**

5 <210> 104  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> secuencia de unión a albúmina de suero  
 <400> 104

**Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu**  
**1 5 10**

15 <210> 105  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> secuencia de unión a albúmina de suero  
 <400> 105

**Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp**  
**1 5 10**

25 <210> 106  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> secuencia de unión a albúmina de suero  
 <400> 106

**Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp**  
**1 5 10**

40 <210> 107  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> secuencia de unión a albúmina de suero  
 <400> 107

**Gly Gly Gly Ser Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu**  
**1 5 10 15**  
**Trp**

50 <210> 108  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> secuencia de unión a albúmina de suero

<400> 108

5

**Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp**  
**1 5 10**

<210> 109

<211> 17

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de unión a albúmina de suero

15

<400> 109

**Gly Gly Gly Ser Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu**  
**1 5 10 15**  
**Asp**

20

<210> 110

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> secuencia de unión a integrina de plaquetas IIb-IIIa

<400> 110

30

**Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val**  
**1 5 10**

<210> 111

<211> 12

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de unión a integrina de plaquetas IIb-IIIa

40

<400> 111

**Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val Cys**  
**1 5 10**

45

<210> 112

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> secuencia de unión a integrina de plaquetas IIb-IIIa

<400> 112

**Gly Gly Gly Ser Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val Cys**  
**1 5 10 15**

55

<210> 113

<211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>  
 <223> Q286N

<400> 113

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Asn Leu Leu
 275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405
    
```

10

<210> 114  
 <211> 406  
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Q286E

5

<400> 114

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100     105     110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115     120     125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130     135     140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145     150     155     160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165     170     175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180     185     190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195     200     205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210     215     220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225     230     235     240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245     250     255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260     265     270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Glu Leu Leu
 275     280     285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290     295     300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305     310     315     320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325     330     335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340     345     350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355     360     365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370     375     380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385     390     395     400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405
    
```

10

<210> 115

<211> 406

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>  
<223> Q286D

<400> 115

5

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15      20      25      30      35      40      45      50      55      60      65      70      75      80
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30      35      40      45      50      55      60      65      70      75      80      85      90      95
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45      50      55      60      65      70      75      80      85      90      95      100      105      110
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60      65      70      75      80      85      90      95      100      105      110      115      120      125
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80      85      90      95      100      105      110      115      120      125      130      135      140
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95      100      105      110      115      120      125      130      135      140      145      150      155      160
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100      105      110      115      120      125      130      135      140      145      150      155      160      165      170      175
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115      120      125      130      135      140      145      150      155      160      165      170      175      180      185      190
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130      135      140      145      150      155      160      165      170      175      180      185      190      195      200      205
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145      150      155      160      165      170      175      180      185      190      195      200      205      210      215      220
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165      170      175      180      185      190      195      200      205      210      215      220      225      230      235      240
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180      185      190      195      200      205      210      215      220      225      230      235      240      245      250      255
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195      200      205      210      215      220      225      230      235      240      245      250      255      260      265      270
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210      215      220      225      230      235      240      245      250      255      260      265      270      275      280      285
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225      230      235      240      245      250      255      260      265      270      275      280      285      290      295      300
His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245      250      255      260      265      270      275      280      285      290      295      300      305      310      315      320
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260      265      270      275      280      285      290      295      300      305      310      315      320      325      330      335
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Asp Leu Leu
 275      280      285      290      295      300      305      310      315      320      325      330      335      340      345      350
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290      295      300      305      310      315      320      325      330      335      340      345      350      355      360      365
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305      310      315      320      325      330      335      340      345      350      355      360      365      370      375      380
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325      330      335      340      345      350      355      360      365      370      375      380      385      390      395      400
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340      345      350      355      360      365      370      375      380      385      390      395      400      405
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355      360      365      370      375      380      385      390      395      400
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370      375      380      385      390      395      400
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

<210> 116  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10

<220>  
<223> Q286S

15

<400> 116

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
      65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
      115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
      130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
      145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
      180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
      195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
      210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
      225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
      260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Ser Leu Leu
      275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
      290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
      305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
      340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
      355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
      370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
      385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

5 <210> 117  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q286T

<400> 117

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
      115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145      150      155
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      160      165      170
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225      230      235
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      240      245      250
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr Leu Leu
275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      320      325      330
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      400      405

```

<210> 118  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Q286R

<400> 118

5

10



Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

<210> 119  
<211> 406  
5 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
10 <223> Q286K

<400> 119

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Lys Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 120  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Q286A

<400> 120

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
      65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
      115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
      130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
      145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
      180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
      195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
      210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
      225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
      260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Ala Leu Leu
      275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
      290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
      305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
      340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
      355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
      370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
      385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

<210> 121  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Q286V

10 <400> 121

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100     105
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115     120     125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130     135     140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145     150     155     160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165     170     175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180     185     190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195     200     205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210     215     220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225     230     235     240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245     250     255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260     265     270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Val Leu Leu
 275     280     285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290     295     300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305     310     315     320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325     330     335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340     345     350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355     360     365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370     375     380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385     390     395     400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

<210> 122  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Q286M

<400> 122

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
      65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
      115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
      130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
      145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
      180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
      195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
      210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
      225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
      260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Met Leu Leu
      275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
      290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
      305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
      340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
      355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
      370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
      385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

<210> 123  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Q296L

10

<400> 123

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Leu Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 124  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Q286Y

10 <400> 124

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
	35						40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170						175
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Tyr	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360						365		
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

<210> 125  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Q286G

<400> 125

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gly Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 126  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Q286F

<400> 126



Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65				70						75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105						110	
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145				150						155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	
				165				170						175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225				230						235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Phe	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305				310						315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

<210> 127  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Q2861

10 <400> 127

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Ile Leu Leu
275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

```

<210> 128  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> Q286P

10

<400> 128

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Pro Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 129  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Q286H

<400> 129

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly His Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 130  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Q286W

10 <400> 130

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Trp Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

<210> 131  
<211> 407  
5 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
10 <223> Q286R/ intercambio de Glu FIX

<400> 131

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe  
 20 25 30  
 Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly  
 35 40 45  
 Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp  
 50 55 60  
 Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn  
 85 90 95  
 Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser  
 100 105 110  
 Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys  
 115 120 125  
 Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
 130 135 140  
 Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala  
 165 170 175  
 Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
 180 185 190  
 Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg  
 210 215 220  
 Arg Val Ala Gln Val Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
 245 250 255  
 Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu  
 275 280 285  
 Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro  
 290 295 300  
 Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
 325 330 335  
 Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
 340 345 350  
 Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
 370 375 380  
 Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 132  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Q286R/H257A

10 <400> 132

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

<210> 133  
<211> 406  
5 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
10 <223> Q286R/S222A

<400> 133

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro

405

<210> 134  
<211> 406  
5 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
10 <223> Q286R/S222A/H257A

<400> 134



Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25						30	
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105						110	
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ala	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
Ala	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										

405

5 <210> 135  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q286R/S222A/intercambio de Gla FIX

<400> 135

```

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1      5      10      15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
 20      25      30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
 35      40      45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
 50      55      60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
 65      70      75      80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
 85      90      95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
 100     105     110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
 115     120     125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
 130     135     140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
 145     150     155     160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
 165     170     175     180
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
 180     185     190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
 195     200     205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
 210     215     220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
 225     230     235     240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
 245     250     255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
 260     265     270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
 275     280     285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
 290     295     300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
 305     310     315     320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
 325     330     335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
 340     345     350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
 355     360     365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
 370     375     380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
 385     390     395     400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
    
```

405

5 <210> 136  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q286R/H257A/intercambio de Gla FIX

<400> 136

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe  
 20 25 30  
 Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly  
 35 40 45  
 Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp  
 50 55 60  
 Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn  
 85 90 95  
 Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser  
 100 105 110  
 Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys  
 115 120 125  
 Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
 130 135 140  
 Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala  
 165 170 175  
 Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
 180 185 190  
 Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg  
 210 215 220  
 Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
 245 250 255  
 Asp Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu  
 275 280 285  
 Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro  
 290 295 300  
 Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
 325 330 335  
 Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
 340 345 350  
 Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
 370 375 380  
 Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro

405

5 <210> 137  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q286R/S222A/H257A/intercambio de Gla FIX

<400> 137

```

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1      5      10      15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
      20      25      30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
      35      40      45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
      50      55      60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
      65      70      75      80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
      85      90      95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
      100      105      110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
      115      120      125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
      130      135      140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
      145      150      155      160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala
      165      170      175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
      180      185      190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
      195      200      205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
      210      215      220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
      225      230      235      240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
      245      250      255
Asp Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
      260      265      270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
      275      280      285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
      290      295      300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
      305      310      315      320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
      325      330      335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
      340      345      350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
      355      360      365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
      370      375      380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
      385      390      395      400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
    
```

405

5 <210> 138  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q286R/M298Q

<400> 138

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
 275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
 290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385      390      395      400

```

Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 139  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q286R/M298Q/K341Q

&lt;400&gt; 139

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100     105
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115     120     125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130     135     140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145     150     155     160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165     170     175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180     185     190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195     200     205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210     215     220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225     230     235     240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245     250     255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260     265     270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
 275     280     285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
 290     295     300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305     310     315     320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325     330     335
Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340     345     350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355     360     365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370     375     380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385     390     395     400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

5 <210> 140  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q286R/M298Q/R199E

<400> 140

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Glu Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
 275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
 290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

5 <210> 141  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q286R/M298Q/intercambio de Gla FIX

<400> 141

```

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1      5      10      15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
 20      25      30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
 35      40
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
 50      55      60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
 65      70      75      80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
 85      90      95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
 100     105     110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
 115     120     125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
 130     135     140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
 145     150     155     160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala
 165     170     175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
 180     185     190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
 195     200     205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
 210     215     220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
 225     230     235     240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
 245     250     255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
 260     265     270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
 275     280     285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
 290     295     300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
 305     310     315     320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
 325     330     335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
 340     345     350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
 355     360     365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
 370     375     380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val

385.          390          395          400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
          405

```

5 <210> 142  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q286R/Q366V



<400> 142

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145      150      155
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225      230      235
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
 275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305      310      315
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
 355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

5 <210> 143  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q286R/A292N/A294S/Q366V

&lt;400&gt; 143

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Asn Thr Ser Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro

5 <210> 144  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> A175S/Q286R/Q366V





<400> 146

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25						30	
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105						110	
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
						135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
Ser	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385						390				395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5

<210> 147  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>  
 <223> H257S/Q286R/Q366V

<400> 147

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 Ser Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 148  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222AH257A/Q286R/Q366V

<400> 148

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

- 5 <210> 149
- <211> 406
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- 10 <220>
- <223> Q286R/H373A
  
- <400> 149

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
      115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
      130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
      145      150      155
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
      180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
      195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
      210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
      225      230      235
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
      260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
      275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
      290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
      305      310      315
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
      340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
      355      360      365
Ala Thr Val Gly Ala Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
      370      375      380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
      385      390      395
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

5 <210> 150  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222A/H257A/Q286R/M158Q

<400> 150



Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 151  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> Q286R/K341D

<400> 151

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Asp Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile

370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

- 5 <210> 152
- <211> 406
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- 10 <223> Q286R/Q366D
- <400> 152

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys  
355 360 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 153  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> Q286R/Q366N

<400> 153

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 154  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> Q286R/M298Q/Q366D

<400> 154

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100     105
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115     120     125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130     135     140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145     150     155     160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165     170     175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180     185     190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195     200     205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210     215     220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225     230     235     240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245     250     255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260     265     270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
 275     280     285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
 290     295     300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305     310     315     320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325     330     335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340     345     350

Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys
 355     360     365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370     375     380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385     390     395     400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

5 <210> 155  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q286R/M298Q/Q366N

<400> 155

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100     105     110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115     120     125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130     135     140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145     150     155     160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165     170     175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180     185     190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195     200     205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210     215     220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225     230     235     240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245     250     255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260     265     270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
 275     280     285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
 290     295     300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305     310     315     320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325     330     335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340     345     350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly Cys
 355     360     365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370     375     380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385     390     395     400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

- <210> 156
- 5 <211> 406
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- <220>
- 10 <223> Q286R/H373F

<400> 156

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145      150      155
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225      230      235
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
 275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305      310      315
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325      330      335

Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355      360      365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385      390      395
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

5 <210> 157  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q286R/M298Q/H373F

<400> 157

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
		20						25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
	35					40					45				
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
			85						90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135						140			
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	
			165						170				175		
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
			245						250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
					325				330						335
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	Phe	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 158  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> M298Q



<400> 158

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100     105     110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115     120     125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130     135     140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145     150     155     160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165     170     175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180     185     190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195     200     205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210     215     220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225     230     235     240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245     250     255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260     265     270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
 275     280     285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
 290     295     300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305     310     315     320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325     330     335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340     345     350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355     360     365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370     375     380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385     390     395     400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

5 <210> 159  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239S

<400> 159

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ser Asn
 225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
 275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305      310      315      320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

5 <210> 160  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239N

<400> 160

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Asn Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 161  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239Q

<400> 161

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
      65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
      115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
      130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
      145      150      155
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
      180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
      195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
      210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Gln Asn
      225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
      260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
      275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
      290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
      305      310      315      320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
      340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
      355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
      370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
      385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

5 <210> 162  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239V

&lt;400&gt; 162

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100     105     110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115     120     125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130     135     140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145     150     155
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165     170     175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180     185     190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195     200     205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210     215     220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val Asn
225     230     235
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245     250     255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260     265     270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275     280     285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290     295     300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305     310     315     320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325     330     335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340     345     350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355     360     365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370     375     380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385     390     395     400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

5 <210> 163  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239L

&lt;400&gt; 163

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Leu Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 164  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239H

<400> 164

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100     105     110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115     120     125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130     135     140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145     150     155     160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165     170     175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180     185     190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195     200     205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210     215     220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr His Asn
 225     230     235     240
His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245     250     255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260     265     270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
 275     280     285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290     295     300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305     310     315     320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325     330     335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340     345     350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355     360     365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370     375     380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385     390     395     400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

5 <210> 165  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239I

<400> 165

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	
				165					170				175		
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Ile	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310						315				320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 166  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> P321K

<400> 166



Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320

Lys Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 167  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> P321E

<400> 167

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320

Glu Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 168  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> P321Y

<400> 168

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
			245						250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Tyr	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 169  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> P321S

<400> 169

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320

Ser Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 170  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> Q366D

<400> 170

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25						30	
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105						110	
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120						125		
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Asp	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

- 5 <210> 171
- <211> 406
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- 10 <223> Q366E
- <400> 171

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145      150      155
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225      230      235
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
 275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305      310      315      320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys
 355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

5 <210> 172  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q366N

<400> 172

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315      320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly Cys
355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

```

5 <210> 173  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q366T

<400> 173

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
      65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
      115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
      130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
      145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
      180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
      195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
      210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
      225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
      260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
      275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
      290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
      305      310      315      320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
      340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Gly Cys
      355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
      370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
      385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

5 <210> 174  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q366S

<400> 174



Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40				45				
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
			85						90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105						110	
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200				205				
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Ser	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 175  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> INCIERTO  
 <222> (0)...(0)  
 <223> Q366V

<400> 175

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

```

5

<210> 176  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>  
 <223> Q3661

<400> 176

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145      150      155
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225      230      235
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys
355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

```

5 <210> 177  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q366L

<400> 177

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
		20						25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295						300			

Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Leu	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 178  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q366M

<400> 178

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1          5          10          15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35          40          45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50          55          60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65          70          75          80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85          90          95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100          105          110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115          120          125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130          135          140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145          150          155          160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165          170          175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180          185          190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195          200          205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210          215          220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225          230          235          240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245          250          255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260          265          270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275          280          285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290          295          300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305          310          315          320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325          330          335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340          345          350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Met Gly Cys
355          360          365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370          375          380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385          390          395          400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

```

5

<210> 179  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>  
 <223> H373D

15

<400> 179

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly Asp Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 180  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> H373E

<400> 180

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly Glu Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

- <210> 181
- 5 <211> 406
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- 10 <223> H373S
- <400> 181

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
	35						40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
			115				120						125		
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295						300			
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	Ser	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375						380			
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 182  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H373F

<400> 182



Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165				170						175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	Phe	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 183  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H373A

<400> 183

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly Ala Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 184  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> Q366D/H373E

<400> 184

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
      115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
      130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
      145      150      155
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
      180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
      195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
      210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
      225      230      235
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
      260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
      275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
      290      295      300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
      305      310      315
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
      340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys
      355      360      365
Ala Thr Val Gly Glu Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
      370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
      385      390      395
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

5 <210> 185  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q366V/H373V

<400> 185

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
355      360      365
Ala Thr Val Gly Val Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

```

5 <210> 186  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q366V/H373L

<400> 186

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
355      360      365
Ala Thr Val Gly Leu Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

```

5 <210> 187  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Q366V/H373I

<400> 187

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
      115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
355      360      365
Ala Thr Val Gly Ile Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

<210> 188  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> K161S

10

<400> 188

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100     105     110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115     120     125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130     135     140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145     150     155     160
Ser Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165     170     175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180     185     190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195     200     205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210     215     220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225     230     235     240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245     250     255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260     265     270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
 275     280     285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290     295     300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305     310     315     320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325     330     335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340     345     350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355     360     365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370     375     380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385     390     395     400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

5 <210> 189  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> K161A

<400> 189

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Ala Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 190  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> K161V

<400> 190



Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Val Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 191  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H216S

<400> 191

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Ser Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 192  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <223> H216A

10

<400> 192

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Ala Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 193  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H216K

<400> 193

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
	35						40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	Lys	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
			245						250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 194  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H216R

<400> 194

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Arg Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 195  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222A

<400> 195

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 196  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> S222K

<400> 196

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200				205				
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Lys	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
			245						250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				

Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

<210> 197  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> S222V

10 <400> 197

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
		20						25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
	35						40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65				70						75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
			85						90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
		100						105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145				150						155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
			165						170						175
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
		180					185						190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Val	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225				230						235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
			245						250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				

Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
			325						330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
		340						345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385				390						395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

- 5 <210> 198
- <211> 406
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- 10 <220>
- <223> S222N
  
- <400> 198



Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Asn Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 199  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> S222E

<400> 199

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
		20						25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
			85						90				95		
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Glu	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295						300			

Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360						365		
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 200  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222D

<400> 200

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Asp Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 201  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> H257A

<400> 201

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
Ala	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				

Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 202  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H257S

<400> 202

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 Ser Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 203  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222K/H257A

<400> 203

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Lys Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

- <210> 204
- 5 <211> 406
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- 10 <223> H216A/H257A
- <400> 204

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Ala Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 205  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H216A/S222A

<400> 205

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Ala Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 206  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> S52A

<400> 206



Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ala	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105						110	
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
			245						250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				

Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

- 5 <210> 207
- <211> 406
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- 10 <220>
- <223> S60A
  
- <400> 207

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ala Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 208  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> E394N/P395A/R396S

<400> 208

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
		50				55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
		130				135						140			
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180				185						190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
		290				295						300			

Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375						380			
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Asn	Ala	Ser	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 209  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> R202S

<400> 209

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
		20						25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
			85						90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Ser	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
		290					295					300			
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360						365		
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										

- 5 <210> 210
- <211> 406
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- <220>
- 10 <223> A292N/A294S
  
- <400> 210





Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
	35						40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ser	Gln
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200				205				
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
		290						295				300			
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

<210> 213  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> K109N

<400> 213

5

10

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Asn Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg

290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 214  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> A122N/GI24S

<400> 214

5

10



Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

<210> 215  
<211> 406  
5 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
<223> A51N

10 <400> 215

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Asn Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg

290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 216  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> T130N/E132S

10 <400> 216

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Asn Val Ser Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg

290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 217  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> A122N/G124S/E394N/P395A/R396S

10 <400> 217

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg

290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Asn Ala Ala Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 218  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> A122N/G124S/E394N/P395A/R396S/ G318N

10 <400> 218

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg

290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Asn Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Asn Ala Ala Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 219  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> S52A/S60A

10 <400> 219

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ala Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ala Cys Lys Asp Gln
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
      65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
      115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
      130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
      145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
      180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
      195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
      210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
      225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
      260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
      275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
      290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
      305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
      340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
      355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
      370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
      385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

<210> 220  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> S52N/P54S

10 <400> 220

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
		20						25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
	35						40					45			
Gln	Cys	Ala	Asn	Ser	Ser	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65				70						75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
			85						90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
		290					295					300			
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360						365		
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375						380			
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

<210> 221  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> S119NL121S

<400> 221

5

10





```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
115      120      125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

```

<210> 223  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Q66N/Y68S

10 <400> 223

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Asn Ser Ser Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 224  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> S52N/P54S/A122N/G124S/E394N/P395A/R396S

10 <400> 224

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Asn Ser Ser Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Asn Ala Ser Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

<210> 225  
<211> 406  
5 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
10 <223> K109N/A292N/A294S

<400> 225

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Asn Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Asn Thr Ser Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg

290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 226  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> K109N/A175S

<400> 226

5

10

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
		20						25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
	35						40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
			85						90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ser	Gln	
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
		290					295					300			
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375						380			
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

<210> 227  
 <211> 417  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF

10 <400> 227

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro  
 100 105 110  
 Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Phe Cys Arg Cys His Glu Gly  
 115 120 125  
 Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr  
 130 135 140  
 Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro  
 145 150 155 160  
 Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro  
 165 170 175  
 Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr  
 180 185 190  
 Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys  
 195 200 205  
 Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu  
 210 215 220  
 Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile  
 225 230 235 240  
 Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu  
 245 250 255  
 Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu  
 260 265 270  
 Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg  
 275 280 285  
 Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr

290 295 300  
 Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp  
 305 310 315 320  
 Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu  
 325 330 335  
 Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys  
 340 345 350  
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr  
 355 360 365  
 Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His  
 370 375 380  
 Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys  
 385 390 395 400  
 Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe  
 405 410 415  
 Pro

<210> 228  
 <211> 414  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF

10 <400> 228

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys  
 115 120 125  
 Leu Trp Glu Asp Asp Phe Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly  
 130 135 140  
 Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg  
 145 150 155 160  
 Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val  
 165 170 175  
 Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn  
 180 185 190  
 Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn  
 195 200 205  
 Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His  
 210 215 220  
 Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu  
 245 250 255  
 His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro  
 260 265 270  
 Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu

275 280 285  
 Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu  
 290 295 300  
 Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln  
 305 310 315 320  
 Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe  
 325 330 335  
 Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser  
 340 345 350  
 Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly  
 355 360 365  
 Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val  
 370 375 380  
 Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg  
 385 390 395 400  
 Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405 410

5 <210> 229  
 <211> 419  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T12BP134dolinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF

<400> 229

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Gln
115      120      125
Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
130      135      140
Asp Asp Phe Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser
145      150      155      160
Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu
165      170      175
Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly
180      185      190
Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe
195      200      205
Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His
210      215      220
Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln
225      230      235      240
Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile
245      250      255
Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val
260      265      270
Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe

                275                280                285
Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly
290                295                300
Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr
305                310                315      320
Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile
325                330                335
Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser
340                345                350
Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr
355                360                365
Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val
370                375                380
Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu
385                390                395      400
Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala
405                410                415
Pro Phe Pro

```

5 <210> 230  
 <211> 411  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE



<400> 230

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly  
 100 105 110  
 Cys Leu Trp Glu Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp  
 115 120 125  
 Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro  
 130 135 140  
 Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu  
 165 170 175  
 Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp  
 180 185 190  
 Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn  
 195 200 205  
 Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp  
 210 215 220  
 Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val  
 225 230 235 240  
 Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro  
 245 250 255  
 Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly  
 275 280 285  
 Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val  
 290 295 300  
 Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg  
 305 310 315 320  
 Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly  
 325 330 335  
 Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
 340 345 350  
 His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser  
 355 360 365  
 Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg  
 370 375 380  
 Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro  
 385 390 395 400  
 Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405 410

5

<210> 231  
 <211> 408  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>  
 <223> H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE

15

<400> 231

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu  
115 120 125  
Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu  
130 135 140  
Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val  
145 150 155 160  
Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly  
165 170 175  
Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser  
180 185 190  
Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala  
195 200 205  
Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser  
210 215 220  
Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr  
225 230 235 240  
Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu  
245 250 255  
Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu  
260 265 270  
Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln  
275 280 285  
Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val  
290 295 300  
Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly  
305 310 315 320  
Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp  
325 330 335  
Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr  
340 345 350  
His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln  
355 360 365  
Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln  
370 375 380  
Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly  
385 390 395 400  
Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 232  
<211> 413  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> 128P134delinsIEDICLPRWGCLWE

<400> 232

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Ile
		115					120					125			
Glu	Asp	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Trp	Gly	Cys	Leu	Trp	Glu	Cys	Gly	Lys
	130					135					140				
Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile
145					150					155					160
Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu
				165					170					175	
Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr
			180					185						190	
Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp
		195					200					205			
Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp
	210					215					220				
Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr
225					230					235					240
Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His
				245					250					255	
Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu
				260				265						270	
Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val
		275					280					285			
Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu
	290					295					300				
Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln
305					310					315				320	
Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys
				325					330					335	
Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly
			340					345					350		
Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile
		355					360					365			
Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr
	370					375					380				
Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser
385					390					395					400
Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro			
				405					410						

5 <210> 233  
 <211> 410  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S103S111delinsDICLPRWGCLWED

<400> 233

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu  
100 105 110  
Trp Glu Asp Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly  
115 120 125  
Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile  
130 135 140  
Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly  
145 150 155 160  
Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val  
165 170 175  
Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val  
180 185 190  
Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu  
195 200 205  
Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu  
210 215 220  
Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro  
225 230 235 240  
Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val  
245 250 255  
Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe  
260 265 270  
Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp  
275 280 285  
Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu  
290 295 300  
Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys  
305 310 315 320  
Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr  
325 330 335  
Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His  
340 345 350  
Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp  
355 360 365  
Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val  
370 375 380  
Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg  
385 390 395 400  
Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405 410

5 <210> 234  
<211> 407  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> H115S126delinsDICLPRWGCLWED

<400> 234

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Cys  
115 120 125  
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
130 135 140  
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
145 150 155 160  
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala  
165 170 175  
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
180 185 190  
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
195 200 205  
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg  
210 215 220  
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr  
225 230 235 240  
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
245 250 255  
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
260 265 270  
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu  
275 280 285  
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro  
290 295 300  
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
305 310 315 320  
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
325 330 335  
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
340 345 350  
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
355 360 365  
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
370 375 380  
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
385 390 395 400  
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 235  
<211> 412  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> T128P134delinsDICLPRWGCLWED

<400> 235

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asp  
115 120 125  
Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Cys Gly Lys Ile  
130 135 140  
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val  
145 150 155 160  
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu  
165 170 175  
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile  
180 185 190  
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg  
195 200 205  
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly  
210 215 220  
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr  
225 230 235 240  
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln  
245 250 255  
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg  
260 265 270  
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser  
275 280 285  
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met  
290 295 300  
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser  
305 310 315 320  
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala  
325 330 335  
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly  
340 345 350  
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val  
355 360 365  
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr  
370 375 380  
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu  
385 390 395 400  
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405 410

5 <210> 236  
<211> 419  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> P406insIEDICLPRWGCLW

<400> 236

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly  
405 410 415  
Cys Leu Trp

5 <210> 237  
<211> 423  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> P406insGGGSIEDICLPRWGCLW

<400> 237

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Gly Gly Ser Ile Glu Asp Ile Cys Leu  
 405 410 415  
 Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp  
 420

5 <210> 238  
 <211> 419  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> P406insDICLPRWGCLWED

<400> 238



Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu  
405 410 415  
Trp Glu Asp

5 <210> 239  
<211> 423  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> P406insGGGSDICLPRWGCLWED

<400> 239

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
 275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Gly Gly Ser Asp Ile Cys Leu Pro Arg
 405      410      415
Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp
 420

```

5 <210> 240  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S103S111delinsSFGRGDIRNV

<400> 240

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1          5          10          15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20          25          30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35          40          45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50          55          60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65          70          75          80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85          90          95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val
100          105          110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
115          120          125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130          135          140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145          150          155          160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala
165          170          175
Gln Leu Cys Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180          185          190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195          200          205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
210          215          220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225          230          235          240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245          250          255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260          265          270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu
275          280          285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
290          295          300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305          310          315          320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325          330          335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340          345          350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
355          360          365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370          375          380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385          390          395          400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

```

5

<210> 241  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>  
 <223> H115S126delinsSFGRGDIRNV

<400> 241

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val Cys Thr Pro Thr  
 115 120 125  
 Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala  
 130 135 140  
 Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly  
 145 150 155 160  
 Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys  
 165 170 175  
 Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys  
 180 185 190  
 Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu  
 195 200 205  
 His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala  
 210 215 220  
 Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp  
 225 230 235 240  
 Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val  
 245 250 255  
 Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala  
 260 265 270  
 Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg  
 275 280 285  
 Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met  
 290 295 300  
 Thr Gln Asp Cys Leu Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn  
 305 310 315 320  
 Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp  
 325 330 335  
 Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly  
 340 345 350  
 Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr  
 355 360 365  
 Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp  
 370 375 380  
 Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg  
 385 390 395 400  
 Ala Pro Phe Pro

5 <210> 242  
 <211> 409  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128P134delinsSFGRGDIRNV

<400> 242

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Ser
		115					120					125			
Phe	Gly	Arg	Gly	Asp	Ile	Arg	Asn	Val	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu
	130					135					140				
Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys
145					150					155					160
Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn
			165					170						175	
Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val
		180						185					190		
Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile
			195					200					205		
Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln
	210					215					220				
Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly
225					230					235					240
Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val
				245					250					255	
Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser
			260					265					270		
Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly
		275						280					285		
Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn
	290					295					300				
Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val
305					310					315					320
Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser
				325					330					335	
Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala
			340					345					350		
Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly
		355					360						365		
Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser
	370					375					380				
Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro
385					390					395					400
Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro							
				405											

5 <210> 243  
 <211> 418  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> P406insCSFGRGDIRNVC

<400> 243

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn  
 405 410 415  
 Val Cys

5 <210> 244  
 <211> 422  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> P406insGGGSCSFGRGDIRNVC

<400> 244

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Gly Gly Ser Cys Ser Phe Gly Arg Gly  
405 410 415  
Asp Ile Arg Asn Val Cys  
420

5 <210> 245  
<211> 407  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> S222A/ intercambio de Gla FIX

<400> 245

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe  
 20 25 30  
 Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly  
 35 40 45  
 Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp  
 50 55 60  
 Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn  
 85 90 95  
 Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser  
 100 105 110  
 Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys  
 115 120 125  
 Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
 130 135 140  
 Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala  
 165 170 175  
 Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
 180 185 190  
 Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg  
 210 215 220  
 Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
 245 250 255  
 Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu  
 275 280 285  
 Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro  
 290 295 300  
 Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
 325 330 335  
 Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
 340 345 350  
 Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
 370 375 380  
 Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 246  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H257A/ intercambio de Gla FIX

<400> 246



```

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1      5      10
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
      20      25      30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
      35      40
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
      50      55      60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
      65      70      75      80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
      85      90      95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
      100      105
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
      115      120      125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
      130      135      140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
      145      150      155      160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
      165      170      175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
      180      185      190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
      195      200      205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
      210      215      220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
      225      230      235      240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
      245      250      255
Asp Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
      260      265      270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu
      275      280      285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
      290      295      300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
      305      310      315      320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
      325      330      335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
      340      345      350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
      355      360      365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
      370      375      380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
      385      390      395      400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

5 <210> 247  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222AH257A/ intercambio de Gla FIX

<400> 247

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe  
 20 25 30  
 Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly  
 35 40 45  
 Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp  
 50 55 60  
 Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn  
 85 90 95  
 Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser  
 100 105 110  
 Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys  
 115 120 125  
 Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
 130 135 140  
 Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala  
 165 170 175  
 Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
 180 185 190  
 Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg  
 210 215 220  
 Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
 245 250 255  
 Asp Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu  
 275 280 285  
 Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro  
 290 295 300  
 Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
 325 330 335  
 Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
 340 345 350  
 Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
 370 375 380  
 Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

- <210> 248
- 5 <211> 406
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- <220>
- 10 <223> S222A/M298Q
  
- <400> 248

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
      65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
      115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
      130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
      145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
      180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
      195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
      210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
      225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
      260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
      275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
      290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
      305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
      340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
      355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
      370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
      385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

5 <210> 249  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H257A/M298Q

<400> 249

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 250  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> S222A/H257A/M298Q

<400> 250

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 251  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222A/A292N/A294S/Q366V

<400> 251

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Asn Thr Ser Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 252  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> A175S/S222A/Q366V

<400> 252

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 253  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222A/Q366V

<400> 253

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 254  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H257S/Q366V

<400> 254



```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
      115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
      180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
      195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      245      250      255
Ser Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
      260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
      275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
      340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
      355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
      370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

5 <210> 255  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222A/H373A

<400> 255

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
 210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
 275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355      360      365
Ala Thr Val Gly Ala Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

<210> 256  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5  
 <220>  
 <223> V158T/L287T/M298K

<400> 256

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Thr Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Thr Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Lys Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 257  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> V21D/L287T/M298K

<400> 257

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
      115      120      125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro
145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
      180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
      195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
      260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Thr Leu
      275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Lys Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
      340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
      355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
      370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

<210> 258  
 <211> 411  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5  
 <220>  
 10 <223> S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V

<400> 258

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly
100      105      110
Cys Leu Trp Glu Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp
115      120      125
Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro
130      135      140
Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly
145      150      155      160
Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu
165      170      175
Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp
180      185      190
Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn
195      200      205
Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp
210      215      220
Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val
225      230      235
Pro Val Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro
245      250      255
Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr
260      265      270
Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly
275      280      285
Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val
290      295      300
Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg
305      310      315      320
Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly
325      330      335
Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro
340      345      350
His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser
355      360      365
Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg
370      375      380
Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro
385      390      395      400
Arg Pro Gly Val Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405      410

```

5 <210> 259  
 <211> 410  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S103S111delinsDICLPRWGCLWED/G237V

<400> 259

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1          5          10          15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
          20          25          30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
          35          40          45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
          50          55          60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65          70          75          80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
          85          90          95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
          100          105          110
Trp Glu Asp Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly
          115          120          125
Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile
          130          135          140
Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly
145          150          155          160
Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val
          165          170          175
Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val
          180          185          190
Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu
          195          200          205
Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu
          210          215          220
Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro
225          230          235          240
Val Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val
          245          250          255
Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe
          260          265          270
Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp
          275          280          285
Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu
          290          295          300
Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys
305          310          315          320
Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr
          325          330          335
Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His
          340          345          350
Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp
          355          360          365
Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val
          370          375          380
Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg
385          390          395          400
Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
          405          410

```

5 <210> 260  
 <211> 414  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V

<400> 260

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
		20						25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
	35						40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105						110	
Arg	Cys	Gln	Arg	Leu	Met	Glu	Asp	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Trp	Gly	Cys
		115					120					125			
Leu	Trp	Glu	Asp	Asp	Phe	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly
	130					135					140				
Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg
145					150					155					160
Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val
				165					170					175	
Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn
			180					185					190		
Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn
		195					200					205			
Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His
	210					215					220				
Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser
225					230					235				240	
Thr	Tyr	Val	Pro	Val	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu
				245					250					255	
His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro
		260					265						270		
Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu
		275					280					285			
Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu
	290					295					300				
Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln
305					310					315					320
Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe
			325						330					335	
Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser
		340						345					350		
Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly
		355					360					365			
Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val
	370					375					380				
Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg
385					390					395					400
Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro		
				405					410						

5 <210> 261  
 <211> 408  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V

<400> 261

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu  
 115 120 125  
 Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu  
 130 135 140  
 Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val  
 145 150 155 160  
 Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly  
 165 170 175  
 Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser  
 180 185 190  
 Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala  
 195 200 205  
 Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser  
 210 215 220  
 Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Val Thr  
 225 230 235 240  
 Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu  
 245 250 255  
 Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu  
 260 265 270  
 Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln  
 275 280 285  
 Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val  
 290 295 300  
 Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly  
 305 310 315 320  
 Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp  
 325 330 335  
 Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr  
 340 345 350  
 His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln  
 355 360 365  
 Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln  
 370 375 380  
 Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly  
 385 390 395 400  
 Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 262  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H115S126delinsDICLPRWGCLWED/G237V

<400> 262



Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Cys  
115 120 125  
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
130 135 140  
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
145 150 155 160  
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala  
165 170 175  
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
180 185 190  
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
195 200 205  
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg  
210 215 220  
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Val Thr Thr  
225 230 235 240  
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
245 250 255  
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
260 265 270  
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu  
275 280 285  
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro  
290 295 300  
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
305 310 315 320  
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
325 330 335  
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
340 345 350  
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
355 360 365  
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
370 375 380  
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
385 390 395 400  
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 263  
<211> 419  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> T128P134delineQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V

<400> 263

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Gln
115      120      125
Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
130      135      140
Asp Asp Phe Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser
145      150      155      160
Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu
165      170      175
Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly
180      185      190
Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe
195      200      205
Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His
210      215      220
Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln
225      230      235      240
Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Val Thr Thr Asn His Asp Ile
245      250      255
Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val
260      265      270
Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe
275      280      285
Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly
290      295      300
Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr
305      310      315      320
Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile
325      330      335
Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser
340      345      350
Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr
355      360      365
Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val
370      375      380
Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu
385      390      395      400
Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala
405      410      415
Pro Phe Pro

```

5 <210> 264  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128P134delinsIEDICLPRHGCLWE/G237V

<400> 264

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Ile  
115 120 125  
Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Cys Gly Lys  
130 135 140  
Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile  
145 150 155 160  
Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu  
165 170 175  
Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr  
180 185 190  
Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp  
195 200 205  
Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp  
210 215 220  
Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr  
225 230 235 240  
Tyr Val Pro Val Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His  
245 250 255  
Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu  
260 265 270  
Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val  
275 280 285  
Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu  
290 295 300  
Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln  
305 310 315 320  
Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys  
325 330 335  
Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly  
340 345 350  
Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile  
355 360 365  
Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr  
370 375 380  
Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser  
385 390 395 400  
Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405 410

5 <210> 265  
<211> 417  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> S103S111delinsQRLMEDICLPWGLWEDDF/G237V

<400> 265

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

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

<210> 266  
 <211> 412  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> T128P134delinsDICLPRWGCLWED/G237V

5

10

<400> 266

```

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

      130      135      140
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
145      150      155      160
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
      165      170      175
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
      180      185      190
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
      195      200      205
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
210      215      220
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
225      230      235      240
Val Pro Val Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
      245      250      255
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
      260      265      270
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
      275      280      285
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
290      295      300
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
305      310      315      320
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
      325      330      335
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
      340      345      350
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
      355      360      365
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
370      375      380
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
385      390      395      400
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405      410

```

5 <210> 267  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S103S111delinsSFGRGDIRNV/G237V

<400> 267

```

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

      130      135      140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
 145     150     155     160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
 165     170     175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
 180     185     190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
 195     200     205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
 210     215     220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Val Thr Thr
 225     230     235     240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
 245     250     255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
 260     265     270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu
 275     280     285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
 290     295     300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
 305     310     315     320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
 325     330     335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
 340     345     350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
 355     360     365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
 370     375     380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
 385     390     395     400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

5 <210> 268  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H115S126delinsSFGRGDIRNV/G237V

<400> 268

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100
Arg Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val Cys Thr Pro Thr
 115      120      125
Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala

      130      135      140
Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly
145      150      155      160
Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys
 165      170      175
Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys
 180      185      190
Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu
 195      200      205
His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala
 210      215      220
Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Val Thr Thr Asn His Asp
 225      230      235      240
Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val
 245      250      255
Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala
 260      265      270
Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg
 275      280      285
Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met
 290      295      300
Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn
 305      310      315      320
Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp
 325      330      335
Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly
 340      345      350
Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr
 355      360      365
Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp
 370      375      380
Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg
 385      390      395      400
Ala Pro Phe Pro

```

5 <210> 269  
 <211> 409  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128P134delinsSFGRGDIRNV/G237V

<400> 269

```

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

Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu
130      135      140
Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys
145      150      155
Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn
      165      170      175
Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val
      180      185      190
Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile
      195      200      205
Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln
210      215      220
Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Val
225      230      235
Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val
      245      250      255
Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser
      260      265      270
Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly
      275      280      285
Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn
290      295      300
Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val
305      310      315
Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser
      325      330      335
Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala
      340      345      350
Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly
      355      360      365
Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser
      370      375      380
Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro
385      390      395
Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

- 5 <210> 270
- <211> 406
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- 10 <220>
- <223> M298Q/H373F
  
- <400> 270



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

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 271  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S119N/L121S/A175S

<400> 271

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

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 272  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> T128N/P129A/A175S

<400> 272

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

Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 273  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> A122N/G124S/A175S

<400> 273

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

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 274  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GluFix/E39L/Q286R/M298Q

<400> 274

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

Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
 130 135 140  
 Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala  
 165 170 175  
 Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
 180 185 190  
 Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg  
 210 215 220  
 Arg Val Ala Gln Val Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
 245 250 255  
 Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu  
 275 280 285  
 Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro  
 290 295 300  
 Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
 325 330 335  
 Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
 340 345 350  
 Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
 370 375 380  
 Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 275  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GlafIX/K42I/Q286R/M298Q/

<400> 275

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

Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
 130 135 140  
 Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala  
 165 170 175  
 Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
 180 185 190  
 Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg  
 210 215 220  
 Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
 245 250 255  
 Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu  
 275 280 285  
 Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro  
 290 295 300  
 Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
 325 330 335  
 Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
 340 345 350  
 Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
 370 375 380  
 Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 276  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GluFIX/Q43S/Q286R/M298Q/

<400> 276

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

Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
 130 135 140  
 Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala  
 165 170 175  
 Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
 180 185 190  
 Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg  
 210 215 220  
 Arg Val Ala Gln Val Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
 245 250 255  
 Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu  
 275 280 285  
 Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro  
 290 295 300  
 Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
 325 330 335  
 Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
 340 345 350  
 Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
 370 375 380  
 Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 277  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GlafIX/M18R/Q286R/M298Q/

<400> 277

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

Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
 130 135 140  
 Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala  
 165 170 175  
 Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
 180 185 190  
 Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg  
 210 215 220  
 Arg Val Ala Gln Val Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
 245 250 255  
 Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu  
 275 280 285  
 Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro  
 290 295 300  
 Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
 325 330 335  
 Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
 340 345 350  
 Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
 370 375 380  
 Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 278  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GluFIX/M18K/E39L/K42I/Q43S/Q286R/M298Q/

<400> 278



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

Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
 130 135 140  
 Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala  
 165 170 175  
 Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
 180 185 190  
 Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg  
 210 215 220  
 Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
 245 250 255  
 Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu  
 275 280 285  
 Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro  
 290 295 300  
 Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
 325 330 335  
 Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
 340 345 350  
 Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
 370 375 380  
 Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 279  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/Q286R

<400> 279

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

Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 280  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/Q286R/M298Q

<400> 280

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

Ala	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145				150						155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	
			165					170					175		
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225				230						235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
			245						250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305				310						315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
			325						330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360						365		
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385				390						395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 281  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/Q286R/H373F

<400> 281

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

Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 282  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> V158D/Q286R/E296V/M298Q

<400> 282

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

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

<210> 283  
<211> 406  
5 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
10 <223> T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q

<400> 283

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

Ala	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Asp	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170						175
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
			245						250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Val	Leu	Gln	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
			355				360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

<210> 284  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> T128N/P129A/S222A

10 <400> 284

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

Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 285  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Intercambio de GluFIX/T128N/P129A/S222A/Q286R

<400> 285

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe  
 20 25 30  
 Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly  
 35 40 45  
 Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp  
 50 55 60  
 Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn  
 85 90 95  
 Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser  
 100 105 110  
 Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys  
 115 120 125  
  
 Asn Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
 130 135 140  
 Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala  
 165 170 175  
 Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
 180 185 190  
 Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg  
 210 215 220  
 Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
 245 250 255  
 Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu  
 275 280 285  
 Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro  
 290 295 300  
 Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
 325 330 335  
 Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
 340 345 350  
 Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
 370 375 380  
 Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 286  
 <211> 407  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Intercambio de GlafIX/T128N/P129A/Q286R/M298Q

10 <400> 286



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

Asn Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
 130 135 140  
 Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala  
 165 170 175  
 Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
 180 185 190  
 Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg  
 210 215 220  
 Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
 245 250 255  
 Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu  
 275 280 285  
 Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro  
 290 295 300  
 Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
 325 330 335  
 Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
 340 345 350  
 Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
 370 375 380  
 Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 287  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/M298Q

<400> 287

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

Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 288  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F

10 <400> 288

```

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

Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Val Asn Gly Ala Gln
165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355      360      365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

```

<210> 289  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> S52A/S60A/V158D/E296V/M298Q

<400> 289

5

10

```

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

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro
145      150      155
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
      180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
      195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225      230      235
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
      260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
      275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
      340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
      355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
      370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

<210> 290  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> S52A/S60A/Q286R

<400> 290

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

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

<210> 291  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> S52A/S60A/S222A

<400> 291

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

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

<210> 292  
<211> 407  
5 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
10 <223> Intercambio de GlaFIX/S52A/S60A/S222A/Q286R

<400> 292

```

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

Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130      135      140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145      150      155
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
165      170      175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180      185      190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195      200      205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
210      215      220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225      230      235      240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245      250      255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260      265      270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
275      280      285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
290      295      300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305      310      315      320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325      330      335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340      345      350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
355      360      365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370      375      380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385      390      395      400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

```

<210> 293  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 293

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

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

<210> 294  
 <211> 407  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Intercambio de GluFIX/S52A/S60A/Q286R/M298Q

10 <400> 294



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

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

5 <210> 295  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M298Q

<400> 295

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

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

5 <210> 296  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S52A/S60A/Q286R/H373F

<400> 296

```

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

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

```

5 <210> 297  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S52A/S60A/ Q286R/M298Q/H373F

<400> 297

```

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

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

```

5 <210> 298  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> V158D/T239V/E296V/M298Q

<400> 298

```

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

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

```

5 <210> 299  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239V/Q286R

<400> 299

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100     105     110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115     120     125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130     135     140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145     150     155     160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165     170     175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180     185     190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195     200     205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210     215     220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Val Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225     230     235     240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245     250     255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260     265     270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
 275     280     285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290     295     300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305     310     315     320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325     330     335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340     345     350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355     360     365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370     375     380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385     390     395     400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

5

<210> 300  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>  
 <223> S222A/T239V

<400> 300

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

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

5 <210> 301  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GlaFIX/S222A/T239V/Q286R

<400> 301

```

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1      5      10
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
 20
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
 35      40
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
 50      55      60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
 65      70      75      80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
 85
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
 100
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
 115      120
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
 130      135      140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys

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

```

5 <210> 302  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239V/Q286R/M298Q



<400> 302

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

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

5 <210> 303  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q

<400> 303

```

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

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

```

5 <210> 304  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GluFIX/T239V/Q286R/M298Q

<400> 304

```

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

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

```

5

<210> 305  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>

<223> T239V/Q286R/H373F

<400> 305

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

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

5

<210> 306

<211> 406

<212> PRT

10

<213> *Homo sapiens*

<400> 306

```

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

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

```

5 <210> 307  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> V158D/T239I/E296V/M298Q

<400> 307

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105						110	
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120						125		
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Asp	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170						175
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185						190	
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200						205		
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Ile	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265						270	
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280						285		
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Val	Leu	Gln	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345						350	
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360							365	
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375						380			
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 308  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239I/Q286R

<400> 308

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Gl  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Ly  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly As  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gl  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg As  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gl  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cy  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Th  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Ar  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pr  
 145 150 155 16  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gl  
 165 170 175

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

5 <210> 309  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222AT239I

<400> 309

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

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

5 <210> 310  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GlaFIX/S222A/T239I/Q286R



<400> 310

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

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

5 <210> 311  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239I/Q286R/M298Q

<400> 311

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Gl  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Ly  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly As  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gl  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg As  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gl  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cy  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Th  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Ar  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pr  
 145 150 155 16  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gl  
 165 170 175

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

5 <210> 312  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222A/T239I/H257A/Q286R/M298Q

<400> 312

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

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

5 <210> 313  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GlaFIX/T2391/Q286R/M298Q

<400> 313

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

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

5 <210> 314  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239I/Q286R/H373F

<400> 314

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

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

5 <210> 315  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239I/Q286R/M298Q/H373F

<400> 315

```

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

```

```

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

```

5 <210> 316  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GlaFIX/S222A/Q286R/H373F

<400> 316

```

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

```

```

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

```

5 <210> 317  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GlaFIX/S222A/Q286R/M298Q

<400> 317

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

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

5 <210> 318  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GlaFIX/S222A/Q286R/M298Q/H373F



<400> 318

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

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

5 <210> 319  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> V158D/E296V/M298Q/H373F

<400> 319

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

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

5 <210> 320  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F

<400> 320

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

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

5 <210> 321  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> H257A/Q286R/M298Q

<400> 321

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

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

5 <210> 322  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H257S/Q286R/M298Q

<400> 322

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

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

5 <210> 323  
<211> 407  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> Intercambio de GlAFIX/S222A/H257S/Q286R/

<400> 323

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe  
 20 25 30  
 Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly  
 35 40 45  
 Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp  
 50 55 60  
 Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn  
 85 90 95  
 Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser  
 100 105 110  
 Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys  
 115 120 125  
 Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys  
 130 135 140  
 Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala  
 165 170 175  
  
 Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala  
 180 185 190  
 Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg  
 210 215 220  
 Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr  
 245 250 255  
 Asp Ser Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu  
 275 280 285  
 Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro  
 290 295 300  
 Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly  
 325 330 335  
 Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His  
 340 345 350  
 Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr  
 370 375 380  
 Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 324  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222A/8257S/Q286R/M298Q

<400> 324

```

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

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

```

5 <210> 325  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> H257S/Q286R/M298Q/H373F

<400> 325

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

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

5 <210> 326  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222A/Q286R/M298Q/H373F



<400> 326

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

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

5 <210> 327  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GluFIX/Q366V

<400> 327

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

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

5 <210> 328  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> S222A/Q286R/M298Q

<400> 328

```

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

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

```

5 <210> 329  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T28N/P129A/A175S/Q366V

<400> 329

```

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

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

```

5 <210> 330  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> A122N/G124S/A175S/Q366V

<400> 330

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

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

5 <210> 331  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/A175S/S222A

<400> 331

```

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

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

```

5 <210> 332  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> A122N/G124S/A175S/S222A

<400> 332

```

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

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

```

5 <210> 333  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/A175S/Q286

<400> 333

```

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

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

```

5 <210> 334  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> A122N/G124S/A175S/Q286R



<400> 334

```

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

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

5 <210> 335  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GlaFIX/T128N/P129A/A175S/S222A/Q286R

<400> 335

```

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

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

```

5 <210> 336  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> Intercambio de GluFIX/A122N/G124S/A175S/S222A/Q286R

<400> 336

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

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

5 <210> 337  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q

<400> 337

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

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

5 <210> 338  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q

<400> 338

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

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

5 <210> 339  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q

<400> 339

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

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

5 <210> 340  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q

<400> 340

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

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

5 <210> 341  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q/H373F

<400> 341

```

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

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

```

5 <210> 342  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F



<400> 342

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

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

5 <210> 343  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> E296V/M298Q

<400> 343

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

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

5 <210> 344  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> V158E

<400> 344

```

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

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

```

5 <210> 345  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> E296R/M298K

<400> 345

```

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

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

```

5 <210> 346  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> K337A

<400> 346

```

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

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

```

5

<210> 347  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>  
 <223> V158D/E296V/M298Q/K337A

<400> 347

```

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

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

```

5 <210> 348  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> V253N

<400> 348

```

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

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

```

5 <210> 349  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T106N

<400> 349

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

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

5 <210> 350  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T106N/V253N

<400> 350



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

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

- 5 <210> 351
- <211> 406
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- 10 <220>
- <223> K143N/N145T
  
- <400> 351

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

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

5 <210> 352  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> R315NV317T

<400> 352

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

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

5 <210> 353  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> K143N/N145T/R315N/V317T

<400> 353

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

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

5 <210> 354  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/M298Q

<400> 354

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

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

5 <210> 355  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> {intercambio de Gla FIX /K43I}/T128N/P129A/Q286R/M298Q

<400> 355

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

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

5 <210> 356  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N

<400> 356

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

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

5 <210> 357  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> {intercambio de Gla FIX /K43I}/Q286R/M298Q/Q366N

<400> 357

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

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

5 <210> 358  
 <211> 407  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> {intercambio de Gla FIX /K43I}/ T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N

<400> 358



```

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1      5      10      15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
      20      25      30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Ile Gln Tyr Ser Asp Gly
      35      40      45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
      50      55      60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
      65      70      75      80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
      85      90      95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
      100      105
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
      115      120      125
Asn Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
      130      135      140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
      145      150      155      160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
      165      170      175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
      180      185      190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
      195      200      205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
      210      215      220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
      225      230      235      240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
      245      250      255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
      260      265      270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
      275      280      285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
      290      295      300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
      305      310      315      320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
      325      330      335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
      340      345      350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly
      355      360      365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
      370      375      380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
      385      390      395      400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

5 <210> 359  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/M298Q/H373F

<400> 359

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

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

5 <210> 360  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> V158D/Q286R/E296V/M298Q

<400> 360

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
115 120 125  
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 361  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> M298Q/Q366N/H373F

<400> 361

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105						110	
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
					165				170						175
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325						330				335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Asn	Gly	Cys
			355				360						365		
Ala	Thr	Val	Gly	Phe	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 362  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239V/M298Q/H373F

<400> 362

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
			85						90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Val	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
			245						250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
			325						330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
		340						345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	Phe	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 363  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239I/M298Q/H373F

<400> 363

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 364  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F

<400> 364

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn  
 115 120 125  
 Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 365  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239V/Q286R/M298Q/Q366N

<400> 365

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
 20 25 30  
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
 275 280 285  
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
 340 345 350  
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly Cys  
 355 360 365  
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 405

5 <210> 366  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T239I/Q286R/M298Q/Q366N

<400> 366



```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100     105     110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115     120     125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130     135     140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145     150     155     160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165     170     175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180     185     190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195     200     205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210     215     220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn
 225     230     235     240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245     250     255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260     265     270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
 275     280     285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
 290     295     300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305     310     315
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325     330     335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340     345     350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly Cys
 355     360     365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370     375     380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385     390     395     400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

```

5 <210> 367  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q

<400> 367

```

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1      5      10      15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
      20      25      30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
      35      40      45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
      50      55      60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65      70      75      80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
      85      90      95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
      100      105      110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
      115      120      125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130      135      140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145      150      155      160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
      165      170      175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
      180      185      190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
      195      200      205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210      215      220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val Asn
225      230      235      240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
      245      250      255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260      265      270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
275      280      285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
290      295      300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305      310      315      320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
      325      330      335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340      345      350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355      360      365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370      375      380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385      390      395      400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
      405

```

5 <210> 368  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q

<400> 368

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn  
115 120 125  
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

5 <210> 369  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<223> T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q/H373F

<400> 369

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
		50				55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105						110	
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Asn	
		115					120					125			
Ala	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
		130				135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155				160	
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215				220					
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Val	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
			245						250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
		340						345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360					365			
Ala	Thr	Val	Gly	Phe	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
		370				375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

5 <210> 370  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <223> T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q

<400> 370

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20					25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85						90				95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105						110	
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Asn
		115					120					125			
Ala	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170						175
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205			
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Ile	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
				245					250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360						365		
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

<210> 371  
 <211> 406  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q/H373F

10 <400> 371

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu  
1 5 10 15  
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys  
20 25 30  
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp  
35 40 45  
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln  
50 55 60  
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
65 70 75 80  
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
85 90 95  
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
100 105 110  
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn  
115 120 125  
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
130 135 140  
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
145 150 155 160  
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
165 170 175  
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
180 185 190  
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
195 200 205  
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
210 215 220  
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn  
225 230 235 240  
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
245 250 255  
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
260 265 270  
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu  
275 280 285  
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg  
290 295 300  
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser  
305 310 315 320  
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser  
325 330 335  
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr  
340 345 350  
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys  
355 360 365  
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile  
370 375 380  
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu  
385 390 395 400  
Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
405

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido de factor VII (FVII) modificado, que comprende una modificación en un polipéptido de FVII, donde:

5 la modificación está en una posición correspondiente a la posición 286 en un polipéptido de FVII que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 o en un resto correspondiente en un locus alineado en un polipéptido de FVII;

la modificación en la posición 286 es un reemplazo de aminoácido con Arg (R);

10 el polipéptido de FVII modificado, cuando se activa, muestra actividad coagulante aumentada en comparación con el polipéptido de FVII que no tiene la modificación en la posición 286;

el polipéptido de FVII modificado comprende solamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 modificaciones de aminoácidos en comparación con un polipéptido no modificado y, opcionalmente, contiene un dominio Gla heterólogo o una parte del mismo; y el polipéptido de FVII no modificado comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-3.

15 2. El polipéptido de FVII modificado de la reivindicación 1, donde el polipéptido de FVII no modificado comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3.

20 3. El polipéptido de FVII modificado de la reivindicación 1, donde el polipéptido de FVII modificado es un fragmento catalíticamente activo que contiene un reemplazo en una posición correspondiente a la posición 286 en un polipéptido de FVII.

4. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que tiene solamente la modificación individual en la posición 286.

25 5. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que tiene una o dos o tres modificaciones adicionales además de la modificación en la posición 286.

30 6. El polipéptido de FVII modificado de la reivindicación 5, en el que una modificación adicional es un remplazo, una inserción o una supresión de aminoácido.

35 7. El polipéptido de FVII modificado de la reivindicación 5 o reivindicación 6, donde una modificación adicional es un reemplazo de aminoácido en una posición correspondiente a una posición seleccionada de entre 51, 52, 54, 60, 66, 68, 109, 119, 122, 124, 130, 132, 158, 161, 175, 196, 197, 199, 202, 216, 222, 237, 239, 257, 287, 290, 292, 294, 296, 298, 305, 314, 318, 321, 337, 341, 366, 373, 374, 394, 395 y 396.

40 8. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende remplazos de aminoácidos seleccionados de entre Q286R, Q286R/H257A, Q286R/S222A, Q286R/S222A/H257A, Q286R/S222A/Intercambio de Gla FIX, Q286R/H257A/Intercambio de Gla FIX, Q286R/S222A/H257A/Intercambio de Gla FIX, Q286R/Q366V, Q286R/A292N/A294S/Q366V, A175S/Q286R/Q366V, S222A/Q286R/Q366V, H257S/Q286R, H257S/Q286R/Q366V, S222A/H257A/Q286R/Q366V, Q286R/H373A, S222A/H257A/Q286R/M298Q, Q286R/K341D, Q286R/Q366D, Q286R/Q366N, Q286R/H373F, T128N/P129A/Q286R, T128N/P129A/Q286R/H373F, S52A/S60A/Q286R, S52A/S60A/Q286R/H373F/, T239V/Q286R, T239V/Q286R/H373F, T239I/Q286R/H373F, T128N/P129A/A175S/Q286R y A122N/G124S/A175S/Q286R.

45 9. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde toda o una parte contigua del dominio Gla de FVII nativo se retira y se reemplaza con un dominio Gla heterólogo, o una parte suficiente de la misma para efectuar unión a fosfolípidos.

50 10. El polipéptido de FVII modificado de la reivindicación 9, donde:

el dominio Gla heterólogo es un dominio Gla de FIX; y

el dominio Gla heterólogo contiene un reemplazo de aminoácido en una posición correspondiente a una posición seleccionada de entre las posiciones 19, 40, 43 y 44 del dominio Gla de FIX expuesto en SEQ ID NO: 83.

55 11. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende uno o más remplazos de aminoácidos que introducen o eliminan uno o más sitios de glucosilación en comparación con el polipéptido de FVII no modificado.

60 12. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el polipéptido de FVII no modificado comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3.

65 13. El polipéptido de FVII modificado de la reivindicación 12, que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 118, 131-137, 142-149, 151-153, 156, 279, 281, 285, 290, 292, 296, 299, 301, 305, 308, 310; 314, 316, 323, 334-336, 341 y 342.

14. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el polipéptido no modificado es un polipéptido humano.
- 5 15. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el polipéptido no modificado es un polipéptido no humano.
16. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-15 que es un polipéptido maduro.
- 10 17. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde solamente se modifica la secuencia primaria.
18. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, que comprende una modificación química o una modificación postraduccional.
- 15 19. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 y 18, donde el polipéptido de FVII está glucosilado, carboxilado, hidroxilado, sulfatado, fosforilado, albuminado o conjugado con un resto de polietilenglicol (PEG).
- 20 20. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, que es un polipéptido monocatenario.
21. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, que es un polipéptido bicatenario.
- 25 22. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-19 y 21 que está activado.
23. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, 21 y 22 que es un polipéptido de FVIIa que se ha activado por escisión proteolítica entre los restos R152 y 1153 de SEQ ID NO: 3, dando como resultado una proteasa de dos cadenas unida por un enlace disulfuro (FVIIa).
- 30 24. La forma bicatenaria activada del polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-19 y 21.
25. La forma bicatenaria activada del polipéptido de FVII modificado de la reivindicación 21, donde el polipéptido de FVII está completamente activado.
- 35 26. Una molécula de ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-25.
27. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 26.
- 40 28. El vector de la reivindicación 27, donde el vector es un vector procariota, vector viral o un vector eucariota.
29. El vector de la reivindicación 27 o 28, donde el vector es un vector de mamífero.
- 45 30. El vector de la reivindicación 27, donde el vector es un vector viral seleccionado de entre un adenovirus, un virus adenoasociado, un retrovirus, un virus del herpes, un lentivirus, un poxvirus y un citomegalovirus.
31. Una célula, que comprende el vector de cualquiera de las reivindicaciones 27-30.
- 50 32. La célula de la reivindicación 31, que es una célula eucariota.
33. La célula de la reivindicación 32, donde la célula eucariota es una célula de mamífero.
- 55 34. La célula de la reivindicación 33, donde la célula de mamífero se selecciona de entre células de riñón de cría de hámster (BHK-21), células 293 y células CHO.
35. Una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-25 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 60 36. La composición farmacéutica de la reivindicación 35 que se formula para administración local, sistémica o tópica.
37. La composición farmacéutica de la reivindicación 35 o reivindicación 36 que se formula para administración oral, nasal, pulmonar, bucal, transdérmica, subcutánea, intraduodenal, entérica, parenteral, intravenosa o intramuscular.
- 65 38. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 35-37 que se formula para liberación controlada.



39. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 35-38 que se formula para administración de dosificación individual.

5 40. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-25 para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada de entre trastornos de coagulación de la sangre, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilias, deficiencia del factor VII, trastornos de sangrado, sangrado quirúrgico y sangrado resultante de traumatismo.

10 41. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 35-39 para uso para el tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada de entre trastornos de coagulación de la sangre, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilias, deficiencia del factor VII, trastornos de sangrado, sangrado quirúrgico y sangrado resultante de traumatismo.

15 42. El polipéptido de FVII modificado de la reivindicación 40 para uso en el tratamiento de un paciente que tiene Hemofilia A con inhibidores o Hemofilia B con inhibidores.

43. La composición farmacéutica de la reivindicación 41 para uso en el tratamiento de un paciente que tiene hemofilia A con inhibidores.



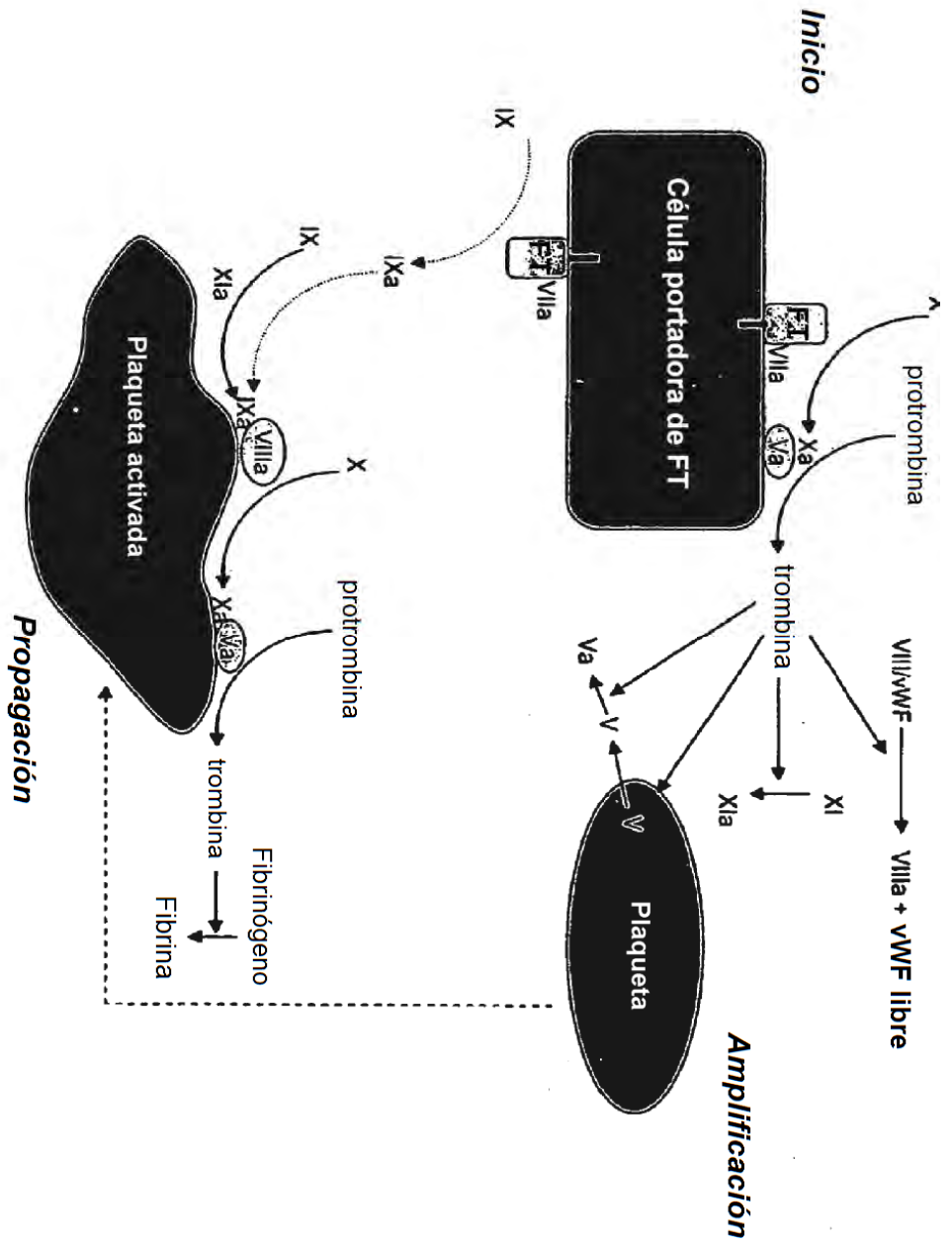


Figura 2. Modelo de coagulación basado en células

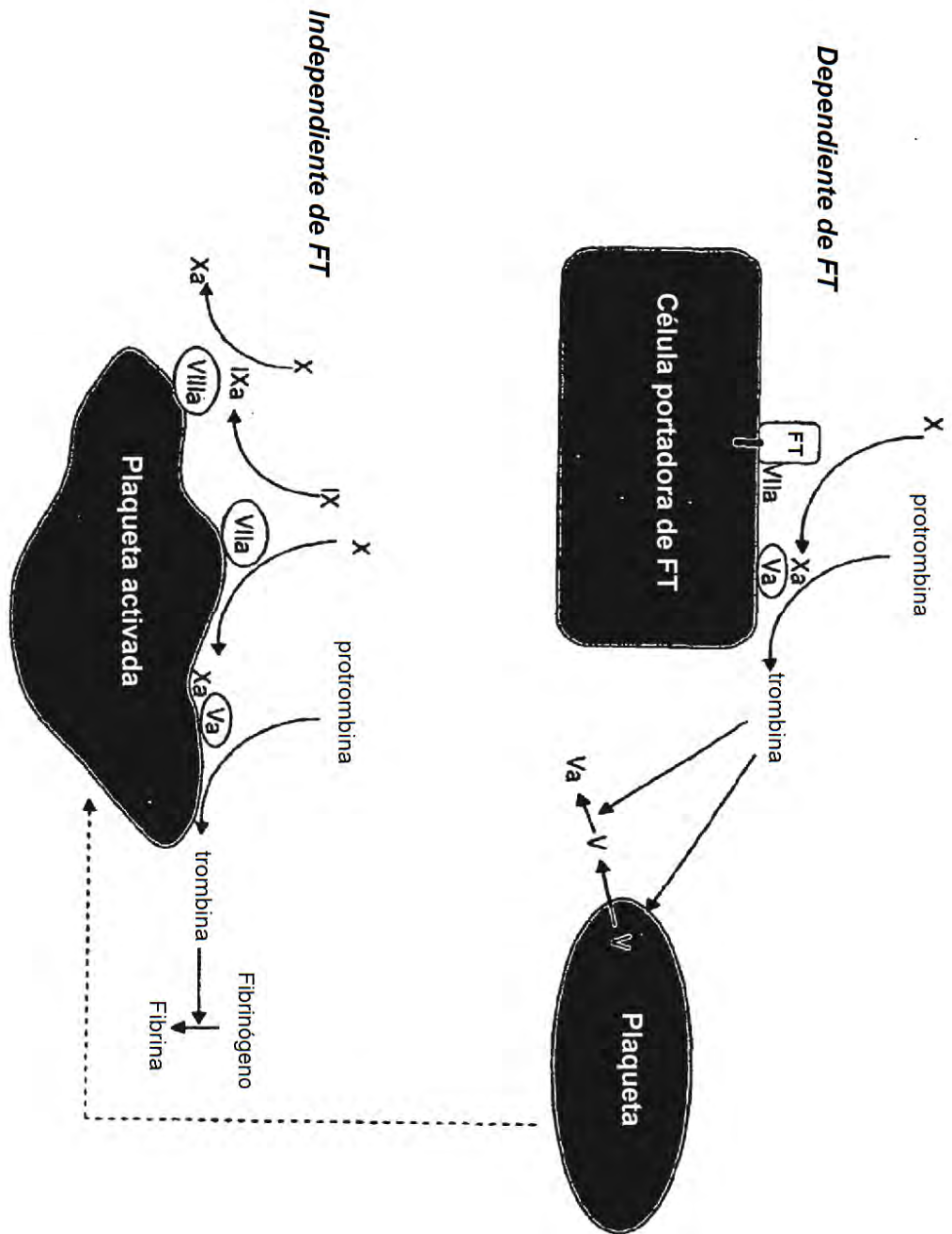


Figura 3. Inicio de la producción de trombina por FVII dependiente e independiente de FT