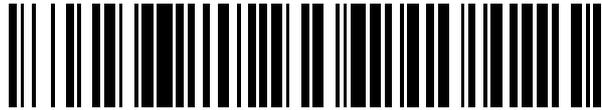


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 523**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/755** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2013 PCT/EP2013/052948**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13120939**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013 E 13704770 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2814502**

54 Título: **Variantes del Factor de von Willebrand que tienen afinidad de unión al Factor VIII mejorada**

30 Prioridad:

**15.02.2012 EP 12155509**

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

**26.01.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHULTE, STEFAN;  
WEIMER, THOMAS y  
HOFMANN, KAY**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Francisco**

ES 2 651 523 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**

Variantes del Factor de von Willebrand que tienen afinidad de unión al Factor VIII mejorada

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende un Factor de von Willebrand modificado que presenta una afinidad de unión mejorada al Factor VIII. La invención se refiere además a un complejo que comprende el polipéptido y FVIII, a un polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención y a un método para producir el polipéptido. Adicionalmente, la invención se refiere al uso terapéutico o profiláctico del polipéptido o del complejo de la invención para tratar trastornos hemorrágicos.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 Existen diversos trastornos hemorrágicos causados por deficiencias de los factores de coagulación sanguíneos. Los trastornos más comunes son la hemofilia A y B, como resultado de deficiencias del factor VIII y IX de coagulación sanguínea, respectivamente. Otro trastorno hemorrágico conocido es la enfermedad de von Willebrand.

15 En el plasma, FVIII existe principalmente como un complejo no covalente con FvW (Factor de von Willebrand, en inglés, VWF) y su función coagulante es acelerar la conversión, dependiente del factor IXa, del factor X al Xa. Debido a la formación del complejo entre FVIII y FvW se ha supuesto durante mucho tiempo que las funciones de FVIII y FvW son dos funciones de la misma molécula. Tan solo en los años setenta se aclaró que FVIII y FvW son moléculas distintas que forman un complejo en condiciones fisiológicas. En los años ochenta se determinó entonces la constante de disociación de aproximadamente 0,2 nmol/L (Leyte et al., Biochem J 1989, 257: 679-683) y se estudió la secuencia de ADN de ambas moléculas.

20 La hemofilia clásica o hemofilia A es un trastorno hemorrágico hereditario. Es el resultado de una deficiencia ligada al cromosoma X del FVIII de la coagulación sanguínea, y afecta casi exclusivamente a los varones, con una incidencia de entre uno y dos individuos por cada 10.000. El defecto del cromosoma X es transmitido por mujeres portadoras, las cuales no son hemofílicas. La manifestación clínica de la hemofilia A es un aumento de la tendencia a la hemorragia. Antes de introducir el tratamiento con concentrados de FVIII, la esperanza de vida media de una persona con hemofilia grave era inferior a 20 años. El uso de concentrados de FVIII procedentes del plasma ha mejorado considerablemente la situación de los pacientes con hemofilia A, incrementando mucho la esperanza de vida media, teniendo la mayoría de ellos la posibilidad de vivir una vida más o menor normal. Sin embargo, ha habido ciertos problemas con los concentrados derivados del plasma y su uso, el más grave de los cuales ha sido la transmisión de virus. Hasta ahora, los virus que causan la hepatitis B, la hepatitis no A no B y el SIDA han afectado gravemente a la población. Desde entonces se han desarrollado últimamente diferentes métodos de inactivación de virus y nuevos concentrados de FVIII altamente purificados que establecen un nivel muy alto de seguridad también para FVIII derivado del plasma.

35 En pacientes con hemofilia A grave sometidos a un tratamiento profiláctico, FVIII se tiene que administrar por vía intravenosa (i.v.) aproximadamente 3 veces por semana debido a la corta semivida en plasma de FVIII, de aproximadamente 12 a 14 horas. Cada administración i.v. es engorrosa, se asocia con dolor y conlleva el riesgo de una infección ya que esta se realiza principalmente en el hogar por el propio paciente o por los padres de niños a los que se ha diagnosticado hemofilia A.

Por lo tanto, sería muy deseable crear un FVIII con una semivida funcional incrementada que permita una preparación de composiciones farmacéuticas que contengan FVIII, que se tengan que administrar con menos frecuencia.

40 Se han realizado diversos intentos de prolongar la semivida de FVIII no activado, ya sea mediante la reducción de su interacción con receptores celulares (documentos WO 03/093313A2, WO 02/060951A2), fijando covalentemente polímeros a FVIII (documentos WO 94/15625, WO 97/11957 y US 4970300), mediante encapsulación de FVIII (documento WO 99/55306), mediante la introducción de nuevos sitios de unión a metal (documento WO 97/03193), fijando covalentemente el dominio A2 con el dominio A3 mediante un enlace peptídico (documentos WO 97/40145 y WO 03/087355) o un enlace disulfuro (documento WO 02/103024A2) o fijando covalentemente el dominio A1 con el dominio A2 (documento WO2006/108590).

50 Otro enfoque para mejorar la semivida funcional de FVIII o de FvW es mediante una PEGilación de FVIII (documentos WO 2007/126808, WO 2006/053299, WO 2004/075923) o mediante una PEGilación de FvW (documento WO 2006/071801), en donde el FvW pegilado, al tener una semivida incrementada, también mejora de forma indirecta la semivida de FVIII presente en el plasma. También se han descrito proteínas de fusión de FVIII (documentos WO 2004/101740, WO2008/077616 y WO 2009/156137).

55 Un FvW ausente, que es funcionalmente defectuoso o que solo está disponible en una cantidad reducida en diferentes formas de la enfermedad de von Willebrand (EvW), es una glicoproteína adhesiva multimérica presente en el plasma de mamíferos, que tiene múltiples funciones fisiológicas. Durante la hemostasia primaria, FvW actúa como un mediador entre receptores específicos en la superficie de plaquetas y componentes de la matriz extracelular, tales como colágeno. Por otra parte, FvW sirve como vehículo y proteína estabilizante para FVIII procoagulante.

FvW se sintetiza en las células endoteliales y megacariocitos como una molécula precursora de 2813 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADNc de FvW de tipo silvestre se describen en Collins et al. 1987, Proc Natl. Acad. Sci. USA. 84:4393-4397. El polipéptido precursor, pre-pro-FvW, consiste en un péptido señal de 22 residuos, un pro-péptido de 741 residuos y el polipéptido de 2050 residuos que se encuentra en el FvW maduro en el plasma (Fischer et al., FEBS Lett. 351: 345-348, 1994). Después de la escisión del péptido señal en el retículo endoplasmático, se forma un puente disulfuro C-terminal entre dos monómeros de FvW. Durante un transporte adicional a través de la vía secretora, se añaden 12 cadenas laterales de carbohidrato ligadas a N y 10 ligadas a O. Más importante, los dímeros de FvW se multimerizan a través de puentes disulfuro N-terminales y el propéptido de 741 aminoácidos de longitud se escinde mediante la enzima PACE/furina en el aparato de Golgi tardío. El propéptido, así como los multímeros de alto peso molecular de FvW (FvW-HMWM) se almacenan en los cuerpos de Weibel-Pallade de las células endoteliales o en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas.

Una vez secretado en el plasma, la proteasa ADAMTS13 escinde el FvW dentro del dominio A1 de FvW. Por lo tanto, el FvW plasmático consiste en toda una serie de multímeros que van desde dímeros individuales de 500 kDa a multímeros que consisten en hasta más de 20 dímeros con un peso molecular superior a 10.000 kDa. El FvW-HMWM tiene por tanto la actividad hemostática más fuerte, que se puede medir en actividad de cofactor ristocetina (FvW:RCo). Cuanto mayor sea la relación de FvW:RCo/antígeno de FvW, mayor será la cantidad relativa de multímeros de alto peso molecular.

Los defectos en FvW causan la enfermedad de von Willebrand (EvW), que se caracteriza por un fenotipo de sangrado más o menos pronunciado. La EvW de tipo 3 es la forma más grave en la que FvW falta por completo, la EvW de tipo 1 se refiere a una pérdida cuantitativa de FvW y su fenotipo puede ser muy leve. La EvW de tipo 2 se refiere a defectos cualitativos del FvW y puede ser tan grave como la EvW de tipo 3. La EvW de tipo 2 tiene muchas subformas, algunas de las cuales están asociadas con la pérdida o la disminución de multímeros de alto peso molecular. La EvW de tipo 2a se caracteriza por una pérdida de los multímeros intermedios y grandes. La EvW de tipo 2B se caracteriza por una pérdida de los multímeros de mayor peso molecular.

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

En el plasma, FVIII se une con alta afinidad a FvW, que lo protege de un catabolismo prematuro y por tanto desempeña, además de su papel en la hemostasia primaria, un papel crucial para regular los niveles plasmáticos de FVIII y como consecuencia también es un factor central para controlar la hemostasia secundaria. La semivida de FVIII no activado unido a FvW es de aproximadamente 12 a 14 horas en plasma. En la enfermedad de von Willebrand de tipo 3, en la que FvW no está presente o casi no está presente, la semivida de FVIII es de solo aproximadamente 6 horas, dando lugar a síntomas de hemofilia A de leves a moderados en estos pacientes, debido a la disminución de las concentraciones de FVIII. El efecto estabilizador de FvW sobre FVIII también se ha utilizado para ayudar a la expresión recombinante de FVIII en células CHO (Kaufman et al. 1989, Mol Cell Biol).

Existe una necesidad de moléculas de FvW que tengan una afinidad mejorada hacia FVIII con el fin de estabilizar el FVIII. Se ha encontrado sorprendentemente que mutaciones en el dominio D' de FvW pueden aumentar la afinidad de FvW hacia FVIII. Esto permite proporcionar complejos de FVIII/FvW que tienen una alta afinidad, lo que es ventajoso en la terapia y la profilaxis de un trastorno hemorrágico.

### COMPENDIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende un Factor de von Willebrand modificado (FvW),

en donde la secuencia de aminoácidos de dicho FvW modificado tiene al menos una mutación dentro del dominio D' en relación con la secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW de tipo silvestre: como se muestra en SEQ ID NO: 31,

y en donde la afinidad de la unión de dicho polipéptido que comprende un FvW modificado, con un Factor VIII (FVIII) es mayor que la de un polipéptido de referencia, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido de referencia es idéntica a la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido que comprende un FvW modificado, excepto que la secuencia de aminoácidos del dominio D' del polipéptido de referencia consiste en SEQ ID NO: 31.

Según una realización preferida del primer aspecto, la afinidad de la unión del polipéptido con el Factor VIII supera a la del polipéptido de referencia en al menos un 10 por ciento.

En otra realización preferida, la constante de afinidad  $K_A$  de la unión del polipéptido con el Factor VIII de tipo silvestre, es de al menos  $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ .

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que comprende un Factor de von Willebrand modificado (FvW),

en donde la secuencia de aminoácidos de dicho FvW modificado tiene al menos una sustitución dentro del dominio D' en relación con la secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW de tipo silvestre, como se muestra en SEQ ID NO: 31,

5 en donde dicha sustitución reemplaza un aminoácido cargado negativamente presente en el dominio D' de FvW de tipo silvestre, como se muestra en SEQ ID NO: 31, con un aminoácido neutro o con un aminoácido cargado positivamente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que comprende un Factor de von Willebrand modificado (FvW),

10 en donde la secuencia de aminoácidos de dicho FvW modificado tiene al menos una sustitución dentro del dominio D' en relación con la secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW de tipo silvestre, como se muestra en SEQ ID NO: 31,

en donde dicha sustitución reemplaza un aminoácido neutro presente en el dominio D' de FvW de tipo silvestre, como se muestra en SEQ ID NO: 31, con un aminoácido cargado positivamente.

15 Se prefiere que la mutación dentro del dominio D' incluya una sustitución de aminoácidos en una de las posiciones 779, 781, 787, 789, 793, 794, 796, 798, 802, 818, 819, 825, 835, 838 y 853 de la secuencia de aminoácidos de FvW como se muestra en SEQ ID NO: 2.

20 Se prefiere además que la mutación dentro del dominio D' incluya una sustitución de aminoácidos en una de las posiciones 779, 781, 789, 793, 794, 802, 818, 819, 835, 838 y 853 de la secuencia de aminoácidos de FvW, como se muestra en SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos dentro del dominio D' se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en Asp779Asn, Leu781 Pro, Glu787Gln, Thr789Ala, Gln793Arg, Asn794Lys, Asp796Ala, Glu798Gln, Met802Arg, Met802Lys, Glu818Ala, Glu818Lys, Asn819Lys, Glu825Lys, Glu835Gln, Pro838Lys y Asp853Asn, en donde la numeración se refiere a SEQ ID NO: 2.

25 En otra realización, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34, con la condición de que el dominio D' del FvW modificado contenga al menos una sustitución con respecto a SEQ ID NO: 31. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 35, con la condición de que el dominio D' del FvW modificado contenga al menos una sustitución con respecto a SEQ ID NO: 31.

30 En otra realización, el polipéptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2, con la condición de que el dominio D' del FvW modificado contenga al menos una sustitución de aminoácidos que incrementa la unión de FVIII, mediante una mejora de la atracción electrostática entre el polipéptido FvW de la invención y FVIII, caracterizada porque los residuos ácidos del dominio D' de FvW se sustituyen por aminoácidos neutros o básicos, o los residuos neutros se sustituyen por aminoácidos básicos.

35 En otra realización preferida, el polipéptido de la presente invención comprende, además, una proteína que mejora la semivida (HLEP). Preferiblemente, la HLEP es una albúmina. El extremo N-terminal de la albúmina se puede fusionar con el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos de FvW.

Un segundo aspecto de la presente invención es un complejo que comprende una molécula de Factor VIII y un polipéptido de la presente invención. Preferiblemente, el complejo tiene una constante de disociación  $K_D$  de 0,2 nmol/L o menor. Más preferiblemente, el Factor VIII en el complejo es el polipéptido de SEQ ID NO: 37.

40 Todavía otro aspecto de la presente invención es el polipéptido de la presente invención o el complejo de la presente invención para uso en el tratamiento o la profilaxis de un trastorno hemorrágico, por ejemplo, la enfermedad de von Willebrand (EvW) o la hemofilia.

Aún otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la presente invención o el complejo de la presente invención.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para tratar un trastorno hemorrágico, que comprende administrar a un paciente que lo requiere, una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido de la presente invención o del complejo de la presente invención. Preferiblemente, el trastorno hemorrágico es EvW o hemofilia A.

En aún otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un plásmido o un vector que comprende el polinucleótido de la presente invención. El plásmido o el vector es preferiblemente un plásmido de expresión o un vector de expresión.

50 En otro aspecto, la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende el polinucleótido o el plásmido de la presente invención.

La invención incluye además un método para producir un polipéptido que comprende un FvW modificado, que com-

prende

(a) cultivar las células hospedadoras de la presente invención en condiciones tales que se expresa el polipéptido que comprende un FvW modificado; y

5 (b) opcionalmente, recuperar el polipéptido que comprende un FvW modificado a partir de las células hospedadoras o del medio de cultivo.

Todavía otro aspecto de esta invención es un método para aumentar la afinidad de la unión con el Factor VIII del FvW, que comprende introducir una mutación en el dominio D' de la secuencia de aminoácidos de FvW, que no está presente en la secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW de tipo silvestre como se muestra en SEQ ID NO: 31.

10 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un FvW modificado que tiene mayor afinidad hacia FVIII que un FvW no modificado para aumentar la semivida de FVIII. El FvW modificado es preferiblemente un polipéptido de la invención como se define en este documento, o un FvW modificado como se define en este documento. Más preferiblemente, el FvW modificado es una proteína de fusión, lo más preferiblemente una proteína de fusión con albúmina.

15 Un aspecto adicional de la invención es un método para preparar un complejo que comprende Factor VIII y FvW, comprendiendo dicho método mezclar una molécula de Factor VIII con el polipéptido de la presente invención o su versión con semivida ampliada.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

El polipéptido de la presente invención comprende un Factor de von Willebrand modificado.

20 *FvW*

La expresión "Factor de von Willebrand" o "FvW", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier polipéptido que tiene la actividad biológica de FvW de tipo silvestre. El gen que codifica FvW de tipo silvestre se transcribe en un ARNm de 9 kb que se traduce en un pre-propolipéptido de 2813 aminoácidos con un peso molecular estimado de 310.000 Da. El pre-propolipéptido contiene un péptido señal de 22 aminoácidos, un propolipéptido de 741 aminoácidos y la subunidad madura. La escisión del propolipéptido de 741 aminoácidos desde el extremo N-terminal da como resultado un FvW maduro que consiste en 2050 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos del pre-propolipéptido de FvW se muestra en SEQ ID NO: 2. A menos que se indique de otro modo, la numeración de los aminoácidos de los residuos de FvW en esta solicitud se refiere a SEQ ID NO: 2, incluso si la molécula de FvW no necesita comprender todos los residuos de SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos de FvW maduro se muestra en SEQ ID NO: 32. El término "FvW" tal y como se usa en esta memoria, se refiere a la forma madura de FvW a menos que se indique lo contrario.

30 El propolipéptido de FvW de tipo silvestre comprende múltiples dominios, que están dispuestos en el orden siguiente:

D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK

35 Los dominios D1 y D2 representan el propéptido que se escinde para obtener el FvW maduro. El dominio D' abarca los aminoácidos 764 a 865 de SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW de tipo silvestre se muestra en SEQ ID NO: 31. Los 90 residuos carboxiterminales comprenden el dominio "CK" que es homólogo a la superfamilia de proteínas "nudo de cistina". Estos miembros de la familia tienen una tendencia a dimerizarse a través de enlaces disulfuro.

40 Preferiblemente, el FvW de tipo silvestre comprende la secuencia de aminoácidos de FvW maduro como se muestra en SEQ ID NO: 32. También se incluyen adiciones, inserciones, deleciones N-terminales, C-terminales o internas de FvW, siempre que se conserve la actividad biológica de FvW. La actividad biológica se conserva en el sentido de la invención si el FvW con deleciones conserva al menos 10%, preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 75% de la actividad biológica de FvW de tipo silvestre. La actividad biológica de FvW de tipo silvestre puede ser determinada por el experto usando métodos para la actividad del cofactor ristocetina (Federici AB et al. 2004. Haematologica 89:77-85), la unión de FvW a GP Iba del complejo de glicoproteína plaquetaria Ib-V-IX (Sucker et al. 2006. Clin Appl Thromb Hemost. 12: 305-310), o un ensayo de unión a colágeno (Kallas & Talpsep. 2001. Annals of Hematology 80:466-471).

#### *Factor VIII*

50 Las expresiones "Factor VIII de coagulación sanguínea", "Factor VIII" y "FVIII" se usan indistintamente en este documento. "Factor VIII de coagulación sanguínea" incluye FVIII de coagulación sanguínea de tipo silvestre, así como derivados de FVIII de coagulación sanguínea de tipo silvestre que tienen la actividad procoagulante de FVIII de coagulación sanguínea de tipo silvestre. Los derivados pueden tener deleciones, inserciones y/o adiciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de FVIII de tipo silvestre. El término FVIII incluye formas procesadas proteolíticas.

ticamente de FVIII, por ejemplo, la forma antes de la activación, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera.

El término "FVIII" incluye cualquier variante de FVIII o mutantes que tienen al menos 25%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 75% de la actividad biológica del factor VIII de tipo silvestre.

5 Como ejemplos no limitativos, las moléculas de FVIII incluyen mutantes de FVIII que previenen o reducen la escisión con APC (Amano 1998. *Thromb. Haemost.* 79:557-563), mutantes de FVIII que estabilizan aún más el dominio A2 (documento WO 97/40145), mutantes de FVIII que producen un aumento de la expresión (Swaroop et al. 1997. *JBC* 272:24121-24124), mutantes de FVIII que reducen su inmunogenicidad (Lollar 1999. *Thromb Haemost.* 82:505-508), FVIII reconstituido a partir de cadenas pesadas y ligeras expresadas de forma diferente (Oh et al. 1999. *Exp. Mol.* 10 Med. 31:95-100), mutantes de FVIII que reducen la unión a receptores conduciendo a un catabolismo de HSPG de tipo FVIII (proteoglicanos de sulfato de heparán) y/o LRP (proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad) (Ananyeva et al. 2001. *TCM*, 11:251-257), variantes de FVIII estabilizadas por enlaces disulfuro (Gale et al., 2006. *J. Thromb Hemost* 4:1315-1322), mutantes de FVIII con propiedades mejoradas de secreción (Miao et al., 2004. *Blood* 103:3412-3419), mutantes de FVIII con actividad específica de cofactor incrementada (Wakabayashi et al., 2005. *Biochemistry* 44: 10298-304), mutantes de FVIII con una mejora de la biosíntesis y la secreción, reducción de la interacción chaperona RE, mejora del transporte RE-Golgi, aumento de la activación o resistencia a la inactivación y semivida mejorada (resumido por Pipe 2004. *Sem. Thromb. Hemost.* 30:227-237). Todos estos mutantes de FVIII y variantes se incorporan en este documento como referencia en su totalidad.

20 Preferiblemente FVIII comprende la secuencia de longitud completa de FVIII como se muestra en SEQ ID NO: 36. También se incluyen adiciones, inserciones, sustituciones, deleciones N-terminales, C-terminales o internas de FVIII, siempre que se conserve la actividad biológica del FVIII. La actividad biológica se conserva en el sentido de la invención si el FVIII con modificaciones conserva al menos 10%, preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 50%, lo más preferiblemente al menos 75% de la actividad biológica de FVIII de tipo silvestre. La actividad biológica de FVIII puede ser determinada por el experto tal como se describe a continuación.

25 Un ensayo adecuado para determinar la actividad biológica de FVIII es, por ejemplo, el ensayo de coagulación de una etapa o de dos etapas (Rizza et al. 1982. *Coagulation assay of FVIII:C and FIXa* en Bloom ed. *The Hemophilias*. NY Churchhill Livingston 1992) o el ensayo de sustrato cromogénico FVIII:C (S. Rosen, 1984. *Scand J Haematol* 33: 139-145, supl.). El contenido de estas referencias se incorpora en este documento como referencia.

30 La secuencia de aminoácidos de la forma de tipo silvestre madura de FVIII de coagulación sanguínea humana se muestra en SEQ ID NO: 36. La referencia a una posición de aminoácido de una secuencia específica significa la posición de dicho aminoácido en la proteína de tipo silvestre de FVIII y no excluye la presencia de mutaciones, por ejemplo, deleciones, inserciones y/o sustituciones en otras posiciones en la secuencia a la que se hace referencia. Por ejemplo, una mutación en "Glu2004", haciendo referencia a SEQ ID NO: 36 no excluye que en el homólogo modificado uno o varios aminoácidos en las posiciones 1 a 2332 de SEQ ID NO: 36 estén ausentes.

35 "FVIII" y/o "FvW" dentro de la definición anterior también incluyen variaciones alélicas naturales que pueden existir y tener lugar de un individuo a otro. "FVIII" y/o "FvW" dentro de la anterior definición incluyen además variantes de FVIII y/o FvW. Tales variantes difieren en uno o varios residuos de aminoácidos de la secuencia de tipo silvestre. Ejemplos de tales diferencias pueden incluir como sustituciones de aminoácidos conservadoras, es decir, sustituciones dentro de grupos de aminoácidos con características similares, por ejemplo (1) aminoácidos pequeños, (2) aminoácidos ácidos, (3) aminoácidos polares, (4) aminoácidos básicos, (5) aminoácidos hidrófobos y (6) aminoácidos aromáticos. Ejemplos de tales sustituciones conservadoras se muestran en la tabla 1 siguiente.

**Tabla 1:**

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

*FvW modificado*

5 El FvW modificado de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la de FvW de tipo silvestre. Según la presente invención, el FvW modificado tiene al menos una mutación dentro de su dominio D', en comparación con la secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW de tipo silvestre, como se muestra en SEQ ID NO: 31. La mutación puede ser una delección, inserción o sustitución. Preferiblemente, la mutación es una sustitución de aminoácidos.

10 La secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW modificado puede tener una o varias mutaciones en relación con SEQ ID NO: 31. La secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW modificado puede tener una, dos, tres, cuatro, cinco o más mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 31. Se prefiere que la secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW modificado tenga una, dos o tres mutaciones en relación con SEQ ID NO: 31. Lo más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW modificado tiene exactamente una sustitución con respecto a la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 31.

15 En un primer enfoque, las posiciones de aminoácidos que están mutadas preferiblemente en el FvW modificado aumentan la carga positiva del dominio D' y/o reducen la carga negativa del mismo. Este primer enfoque se denomina en este documento como "enfoque electrostático". Esto se puede conseguir mediante la sustitución de al menos un aminoácido que tiene una carga negativa a pH 7,4, con al menos un aminoácido que es neutro o tiene una carga positiva a pH 7,4. Alternativamente, esto se puede conseguir mediante la sustitución de al menos un aminoácido que es neutro a pH 7,4 con al menos un aminoácido que tiene una carga positiva a pH 7,4. Estos tipos de aminoácidos se definen del modo siguiente:

- 20 – Los aminoácidos que tienen una carga negativa a pH 7,4 son ácido aspártico (aspartato) y ácido glutámico (glutamato); que se conocen de aquí en adelante como "aminoácidos cargados negativamente".
- Los aminoácidos que tienen una carga positiva a pH 7,4 son lisina y arginina; que se conocen de aquí en adelante como "aminoácidos cargados positivamente".
- 25 – Los aminoácidos que son neutros a pH 7,4 son alanina, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, valina, fenilalanina, tirosina, triptófano, prolina y cisteína; que se conocen de aquí en adelante como "aminoácidos neutros".

En un aspecto del enfoque electrostático, la invención se refiere a un polipéptido que comprende un Factor de von Willebrand modificado (FvW),

30 en donde la secuencia de aminoácidos de dicho FvW modificado tiene al menos una sustitución dentro del dominio D' en relación con la secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW de tipo silvestre, tal y como se muestra en SEQ ID NO: 31,

en donde dicha sustitución reemplaza un aminoácido cargado negativamente presente en el dominio D' de FvW de tipo silvestre tal y como se muestra en SEQ ID NO: 31, con un aminoácido neutro o con un aminoácido cargado positivamente.

35 En otro aspecto del enfoque electrostático, la invención se refiere a un polipéptido que comprende un Factor de von Willebrand modificado (FvW),

en donde la secuencia de aminoácidos de dicho FvW modificado tiene al menos una sustitución dentro del dominio D' en relación con la secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW de tipo silvestre, tal y como se muestra en SEQ ID NO: 31,

40 en donde dicha sustitución reemplaza un aminoácido neutro presente en el dominio D' de FvW de tipo silvestre, tal y como se muestra en la SEQ ID NO: 31, con un aminoácido cargado positivamente.

El FvW modificado de la presente invención incluye, pero no se limita a, las siguientes realizaciones de acuerdo con el enfoque electrostático, los cuales se pueden combinar entre sí.

45 En una primera realización de acuerdo con el enfoque electrostático, el aminoácido en la posición 779 de la secuencia de aminoácidos de FvW es un aminoácido neutro o un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido en la posición 779 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser lisina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 779 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser arginina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 779 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser un aminoácido neutro.

50 En una segunda realización de acuerdo con el enfoque electrostático, el aminoácido en la posición 787 de la secuencia de aminoácidos de FvW es un aminoácido neutro o un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido en la posición 787 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser lisina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 787 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser arginina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 787 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser un aminoácido neutro.

En una tercera realización de acuerdo con el enfoque electrostático, el aminoácido en la posición 793 de la secuencia de aminoácidos de FvW es un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido en la posición 793 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser lisina.

Alternativamente, el aminoácido en la posición 793 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser arginina.

5 En una cuarta realización de acuerdo con el enfoque electrostático, el aminoácido en la posición 794 de la secuencia de aminoácidos de FvW es un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido en la posición 794 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser lisina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 794 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser arginina.

10 En una quinta realización de acuerdo con el enfoque electrostático, el aminoácido en la posición 796 de la secuencia de aminoácidos de FvW es un aminoácido neutro o un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido en la posición 796 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser lisina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 796 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser arginina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 796 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser un aminoácido neutro.

15 En una sexta realización de acuerdo con el enfoque electrostático, el aminoácido en la posición 798 de la secuencia de aminoácidos de FvW es un aminoácido neutro o un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido en la posición 798 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser lisina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 798 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser arginina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 798 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser un aminoácido neutro.

20 En una séptima realización de acuerdo con el enfoque electrostático, el aminoácido en la posición 802 de la secuencia de aminoácidos de FvW es un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido en la posición 802 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser lisina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 802 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser arginina.

25 En una octava realización de acuerdo con el enfoque electrostático, el aminoácido en la posición 818 de la secuencia de aminoácidos de FvW es un aminoácido neutro o un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido en la posición 818 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser lisina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 818 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser arginina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 818 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser un aminoácido neutro.

30 En una novena realización de acuerdo con el enfoque electrostático, el aminoácido en la posición 819 de la secuencia de aminoácidos de FvW es un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido en la posición 819 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser lisina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 819 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser arginina.

35 En una décima realización de acuerdo con el enfoque electrostático, el aminoácido en la posición 825 de la secuencia de aminoácidos de FvW es un aminoácido neutro o un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido en la posición 825 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser lisina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 825 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser arginina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 825 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser un aminoácido neutro.

40 En una undécima realización de acuerdo con el enfoque electrostático, el aminoácido en la posición 835 de la secuencia de aminoácidos de FvW es un aminoácido neutro o un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido en la posición 835 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser lisina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 835 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser arginina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 835 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser un aminoácido neutro.

45 En una duodécima realización de acuerdo con el enfoque electrostático, el aminoácido en la posición 838 de la secuencia de aminoácidos de FvW es un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido en la posición 838 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser lisina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 838 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser arginina.

50 En una decimotercera realización, el aminoácido en la posición 853 de la secuencia de aminoácidos de FvW es un aminoácido neutro o un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido en la posición 853 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser lisina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 853 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser arginina. Alternativamente, el aminoácido en la posición 853 de la secuencia de aminoácidos de FvW puede ser un aminoácido neutro.

En un segundo enfoque alternativo, un aminoácido en el dominio D' se puede sustituir con un aminoácido diferente que se conserva evolutivamente o es al menos polimórfico en la posición respectiva. Este segundo enfoque se denomina de aquí en adelante "enfoque evolutivo".

55 Una sustitución con un aminoácido diferente que se conserva evolutivamente en el sentido de la invención significa que un aminoácido dado dentro del dominio D' el cual está presente (i) solo en los seres humanos, se reemplaza con

5 un aminoácido diferente que se conserva en otras especies en la posición del aminoácido correspondiente, o (ii) que está presente solo en los seres humanos y algunas otras especies pero no en la mayoría de las especies, se sustituye con el aminoácido correspondiente más abundante que está presente en la mayoría de las otras especies, o (iii) es un polimorfismo humano común. Esto significa que al menos un residuo del dominio D' de FvW se sustituye con un aminoácido diferente que está presente en la misma posición en uno o varios polimorfos u ortólogos de FvW que tienen un dominio D' diferente de SEQ ID NO: 31.

El FvW modificado de la presente invención incluye, pero no se limita a, las siguientes realizaciones de acuerdo con el enfoque evolutivo, que se pueden combinar entre sí y con cualquier realización(es) del enfoque electrostático.

10 En una primera realización de acuerdo con el enfoque evolutivo, el aminoácido en la posición 781 de la secuencia de aminoácidos de FvW es una prolina.

En una segunda realización de acuerdo con el enfoque evolutivo, el aminoácido en la posición 789 de la secuencia de aminoácidos de FvW es alanina, glicina, serina o valina.

En otras realizaciones preferidas de la invención, el dominio D' del FvW modificado tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 33).

15 **SLSCRPPMVK LVC<sup>1</sup>PAX<sup>1</sup>NX<sup>2</sup>RA EGL<sup>3</sup>CX<sup>4</sup>KTCX<sup>5</sup> X<sup>6</sup>YX<sup>7</sup>LX<sup>8</sup>CMSX<sup>9</sup>G CVSGCLCPPG**  
**MVRHX<sup>10</sup>X<sup>11</sup>RCVA LX<sup>12</sup>RCPCFHQG KX<sup>13</sup>YAX<sup>14</sup>GETVK IGCNTCVCRX<sup>15</sup> RKWNCTDHVC DA**

20 El dominio D' modificado en el polipéptido de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una de las realizaciones de la siguiente tabla 2. Cada línea con "realización n<sup>o</sup>" representa una realización en la que el dominio D' en el polipéptido de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 33, en donde de X<sup>1</sup> hasta X<sup>15</sup> tienen los significados indicados. "neut" significa un aminoácido neutro.

Tabla 2.

Realización nº	x <sup>1</sup>	x <sup>2</sup>	x <sup>3</sup>	x <sup>4</sup>	x <sup>5</sup>	x <sup>6</sup>	x <sup>7</sup>	x <sup>8</sup>	x <sup>9</sup>	x <sup>10</sup>	x <sup>11</sup>	x <sup>12</sup>	x <sup>13</sup>	x <sup>14</sup>	x <sup>15</sup>
Tipo silvestre	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
1.1	ne ut	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
1.2	K	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
1.3	R	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
2.1	D	P	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
3.1	D	L	ne ut	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
3.2	D	L	K	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
3.3	D	L	R	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
4.1	D	L	E	A	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
4.2	D	L	E	G	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
4.3	D	L	E	S	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
4.4	D	L	E	V	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
5.1	D	L	E	T	K	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
5.2	D	L	E	T	R	N	D	E	M	E	N	E	E	P	D
6.1	D	L	E	T	Q	K	D	E	M	E	N	E	E	P	D
6.2	D	L	E	T	Q	R	D	E	M	E	N	E	E	P	D
7.1	D	L	E	T	Q	N	ne ut	E	M	E	N	E	E	P	D
7.2	D	L	E	T	Q	N	K	E	M	E	N	E	E	P	D
7.3	D	L	E	T	Q	N	R	E	M	E	N	E	E	P	D
8.1	D	L	E	T	Q	N	D	ne ut	M	E	N	E	E	P	D
8.2	D	L	E	T	Q	N	D	K	M	E	N	E	E	P	D
8.3	D	L	E	T	Q	N	D	R	M	E	N	E	E	P	D
9.1	D	L	E	T	Q	N	D	E	K	E	N	E	E	P	D
9.2	D	L	E	T	Q	N	D	E	R	E	N	E	E	P	D
10.1	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	ne ut	N	E	E	P	D
10.2	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	K	N	E	E	P	D
10.3	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	R	N	E	E	P	D
11.1	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	K	E	E	P	D
11.2	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	R	E	E	P	D

Realización n°	x <sup>1</sup>	x <sup>2</sup>	x <sup>3</sup>	x <sup>4</sup>	x <sup>5</sup>	x <sup>6</sup>	x <sup>7</sup>	x <sup>8</sup>	x <sup>9</sup>	x <sup>10</sup>	x <sup>11</sup>	x <sup>12</sup>	x <sup>13</sup>	x <sup>14</sup>	x <sup>15</sup>
12.1	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	ne ut	E	P	D
12.2	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	K	E	P	D
12.3	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	R	E	P	D
13.1	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	ne ut	P	D
13.2	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	K	P	D
13.3	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	R	P	D
14.1	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	K	D
14.2	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	R	D
15.1	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	ne ut
15.2	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	K
15.3	D	L	E	T	Q	N	D	E	M	E	N	E	E	P	R

Las realizaciones 2.1 y 4.1-4.4 de la tabla 2 están conformes con el enfoque evolutivo, todas las demás realizaciones están conformes con el enfoque electrostático.

5 Las posiciones de los aminoácidos que se mutan preferiblemente en el FvW modificado se seleccionan a partir del grupo que consiste en las posiciones de aminoácidos 779, 781, 787, 793, 794, 796, 798, 802, 818, 819, 825, 835, 838 y 853, en donde la numeración se refiere a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2. Es decir, el dominio D' del FvW modificado tiene preferiblemente una sustitución de aminoácidos en una de las posiciones 16, 18, 26, 30, 31, 39, 55, 56, 72, 75 o 90 de SEQ ID NO: 31.

10 Preferiblemente, la sustitución de aminoácidos en el FvW modificado es en una de las posiciones 789, 802, 818, 819 o 853 de la secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 2. Es decir, el dominio D' del FvW modificado tiene preferiblemente una o varias mutaciones en las posiciones 39, 55, 56 y 90 de SEQ ID NO: 31.

De acuerdo con esta invención, la afinidad de la unión del polipéptido de la presente invención hacia FVIII es mayor que la de un polipéptido de referencia que tiene la misma secuencia de aminoácidos con excepción de la mutación en el dominio D'.

15 La afinidad de la unión de una molécula de FvW hacia una molécula de Factor VIII se puede determinar mediante un ensayo de unión utilizado en la técnica. Por ejemplo, la molécula de FvW se puede inmovilizar sobre un soporte sólido, se aplican concentraciones crecientes de Factor VIII, se incuban durante un cierto período de tiempo y después del lavado, se determina el Factor VIII unido con un ensayo cromogénico. La constante de afinidad o la constante de disociación se pueden determinar entonces mediante un análisis de Scatchard u otro método adecuado.

20 Un método para determinar la afinidad de la unión del Factor VIII humano con el Factor de von Willebrand se describe en Vlot et al. (1995), Blood, volumen 85, número 11, 3150-3157. Preferiblemente, sin embargo, la afinidad de FvW hacia el Factor VIII se determina como se describe en el Ejemplo 4 de esta solicitud.

25 Cualquier indicación en este documento sobre la afinidad, incluyendo constantes de disociación, se refiere preferiblemente a la unión del FvW modificado de la invención, o del polipéptido de la invención a FVIII de cadena sencilla representado por la secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 37.

La constante de disociación del complejo que consiste en FvW y FVIII es preferiblemente de 0,2 nmol/L o menor, más preferiblemente de 0,175 nmol/L o menor, más preferiblemente de 0,15 nmol/L o menor, más preferiblemente de 0,125 nmol/L o menor, más preferiblemente de 0,1 nmol/L o menor, más preferiblemente de 0,05 nmol/L o menor, lo más preferiblemente de 0,01 nmol/L o menor.

30 La constante de disociación  $K_D$  de un complejo del polipéptido de la invención y el Factor VIII de SEQ ID NO: 37 es típicamente menor que el 90% de la constante de disociación  $K_D$  de un complejo del polipéptido de referencia (por ejemplo, el polipéptido de SEQ ID NO: 32) y el Factor VIII de SEQ ID NO: 37. La constante de disociación  $K_D$  de un

complejo del polipéptido de la invención y el Factor VIII de SEQ ID NO: 37 es preferiblemente menor que el 75%, más preferiblemente menor que el 50%, más preferiblemente menor que el 25%, más preferiblemente menor que el 10%, más preferiblemente menor que el 5% de la constante de disociación  $K_D$  de un complejo del polipéptido de referencia (por ejemplo, el polipéptido de SEQ ID NO: 32) y el Factor VIII de SEQ ID NO: 37.

- 5 La afinidad de la unión del polipéptido de la presente invención que comprende el FvW modificado, hacia el Factor VIII es superior a la del polipéptido de referencia en al menos un 10%, preferiblemente en al menos un 20%, más preferiblemente en al menos un 30%, más preferiblemente en al menos un 50%, más preferiblemente en al menos un 75%, más preferiblemente en al menos un 100%, más preferiblemente en al menos un 250%, más preferiblemente en al menos un 500%, más preferiblemente en al menos un 1000%, más preferiblemente en al menos un 10000%, lo más preferiblemente en al menos un 100000%.

Se ha encontrado que la afinidad del polipéptido de la invención hacia el Factor VIII de cadena sencilla (por ejemplo, representado por SEQ ID NO: 37) es mayor que hacia un Factor VIII heterodímero "bicatenario" (por ejemplo, representado por SEQ ID NO: 36). Por lo tanto, la molécula preferida de Factor VIII en el complejo de la invención es un Factor VIII de cadena sencilla, lo más preferiblemente es el polipéptido de SEQ ID NO: 37.

- 15 El polipéptido de referencia es un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a la del polipéptido de la presente invención, excepto en la mutación dentro del dominio D' de FvW. Es decir, el polipéptido de referencia tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos idéntica a la del polipéptido de la presente invención, con la condición de que el dominio D' en el polipéptido de referencia consista en la secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 31. En otras palabras, la única diferencia en la secuencia entre el polipéptido de la invención y el polipéptido de referencia se encuentra en la secuencia de aminoácidos del dominio D'. El polipéptido de referencia se ha preparado preferiblemente en las mismas condiciones que el polipéptido de la invención.

El polipéptido de la presente invención puede consistir en el FvW modificado. En otra realización, el polipéptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos adicional, preferiblemente una secuencia de aminoácidos heteróloga. La secuencia de aminoácidos heteróloga normalmente no se fusiona con FvW en la naturaleza.

- 25 La presente invención es particularmente útil en los casos en que se emplea una variante de FvW que tiene una semivida mejorada. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la fusión de FvW con albúmina de suero humano. Se ha encontrado, sin embargo, que tales proteínas de fusión pueden tener una afinidad reducida hacia FVIII en comparación con FvW de tipo silvestre. Esto incluye el riesgo de que un complejo de proteína de fusión de FvW y FVIII administrado a un paciente, se pueda disociar con bastante rapidez, y el FVIII disociado del complejo se uniría al FvW endógeno. El efecto positivo de la formación de complejos entre un FvW con una semivida incrementada y FVIII, en donde también se incrementa la semivida de FVIII, se puede perder de este modo si la afinidad entre la proteína de fusión de FvW y FVIII es demasiado baja. Este problema se resuelve mejorando la unión de FvW a FVIII de acuerdo con esta invención. Como las proteínas de fusión de FvW tienen el riesgo particular de tener una afinidad reducida hacia FVIII, la presente invención es particularmente aplicable en proteínas de fusión de FvW.
- 30
- 35 Por lo tanto, en una realización, el polipéptido de la presente invención comprende el FvW modificado y una proteína que mejora la semivida (HLEP). Preferiblemente, la HLEP es una albúmina.

Una o varias HLEPs se pueden fusionar a la parte C-terminal de FvW, preferiblemente de modo que no interfieran con las capacidades de unión de FvW, por ejemplo, a FVIII, plaquetas, heparina o colágeno.

En una realización, el FvW modificado tiene la siguiente estructura:

- 40 N-FvW-C-L1-H, [fórmula 1]

en donde

N es una parte N-terminal de FvW,

L1 es un enlace químico o una secuencia enlazadora

H es una HLEP y

- 45 C es una parte C-terminal de FvW

- L1 puede ser un enlace químico o una secuencia enlazadora que consiste en uno o varios aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 50, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5 o de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2 o 3) aminoácidos y que pueden ser iguales o diferentes entre sí. Por lo general, las secuencias enlazadoras no están presentes en la posición correspondiente en el factor de coagulación de tipo silvestre. Ejemplos de aminoácidos adecuados presentes en L1 incluyen Gly y Ser.

Las secuencias de HLEP preferidas se describen más abajo. Asimismo, se incluyen en la invención fusiones con el "aminoácido N-terminal" exacto de la HLEP respectiva, o fusiones con la "parte N-terminal" de la HLEP respectiva, que incluye delecciones N-terminales de uno o varios aminoácidos de la HLEP.

El FvW modificado o el complejo del FVIII con el FvW modificado de la invención puede comprender más de una secuencia de HLEP, por ejemplo, dos o tres secuencias de HLEP. Estas secuencias múltiples de HLEP pueden estar fusionadas con la parte C-terminal de FvW en tándem, por ejemplo, como repeticiones sucesivas.

### Secuencias enlazadoras

5 De acuerdo con esta invención, el resto del polipéptido terapéutico se puede acoplar al resto HLEP a través de un enlazador peptídico. El enlazador debe ser no inmunogénico y puede ser un enlazador no escindible o escindible.

Los enlazadores no escindibles pueden estar compuestos de residuos de glicina y serina alternantes, como se ejemplifica en el documento WO2007/090584.

10 En otra realización de la invención, el enlazador peptídico entre el resto FVIII y/o FvW y el resto albúmina consiste en secuencias peptídicas, que sirven como enlazadores naturales entre los dominios en proteínas humanas. Preferiblemente, tales secuencias peptídicas en su entorno natural se encuentran cerca de la superficie de la proteína y son accesibles para el sistema inmune, de modo que se puede asumir una tolerancia natural contra esa secuencia. En el documento WO2007/090584 se proporcionan ejemplos.

15 Los enlazadores escindibles deben ser suficientemente flexibles como para permitir la escisión con proteasas. En una realización preferida, la escisión del enlazador se realiza de forma comparablemente igual de rápida que la activación de FVIII dentro de la proteína de fusión, si la proteína de fusión es un FVIII modificado.

El enlazador escindible comprende preferentemente una secuencia obtenida a partir de

- a) el propio polipéptido terapéutico que se va a administrar, si contiene sitios de escisión proteolítica que se escinden proteolíticamente durante la activación del polipéptido terapéutico,
- 20 b) un polipéptido del sustrato, escindido por una proteasa que se activa o se forma con la participación del polipéptido terapéutico.
- c) un polipéptido implicado en la coagulación o la fibrinólisis

25 La región enlazadora en una realización más preferida comprende una secuencia de FVIII y/o FvW, que debería dar como resultado una disminución del riesgo de propiedades neoantigénicas de la proteína de fusión expresada. También en caso de que la proteína terapéutica sea FVIII que se tiene que activar proteolíticamente, la cinética de la escisión del péptido enlazador reflejará más estrechamente la cinética de activación relacionada con la coagulación del zimógeno.

Los péptidos enlazadores son preferiblemente escindibles con las proteasas del sistema de coagulación, por ejemplo, FIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa y FVIIa.

30 Ejemplos de combinaciones de polipéptido terapéutico, enlazador escindible y HLEP incluyen las estructuras artificiales mencionadas en el documento WO2007/090584 (por ejemplo, en la tabla 2 y la figura 4) y en el documento WO2007/144173 (por ejemplo, en la tabla 3a y 3b), pero no se limitan a las mismas.

### Polipéptidos que incrementan la semivida (HLEPs)

35 Un "polipéptido que incrementa la semivida", tal y como se usa en el presente documento, se selecciona entre el grupo que consiste en albúmina, un miembro de la familia de la albúmina, la región constante de la inmunoglobulina G y fragmentos de la misma, una región y polipéptidos capaces de unirse en condiciones fisiológicas a albúmina, a miembros de la familia de la albúmina, así como a porciones de una región constante de inmunoglobulina. Puede ser una proteína de longitud completa que incrementa la semivida descrita en el presente documento (por ejemplo, albúmina, un miembro de la familia de la albúmina o la región constante de la inmunoglobulina G) o uno o varios fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica o la actividad biológica del factor de coagulación. Tales fragmentos pueden tener una longitud de 10 o más aminoácidos o pueden incluir al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100 o más aminoácidos contiguos procedentes de la secuencia de HLEP o pueden incluir una parte o todos los dominios específicos de la HLEP respectiva, siempre que el fragmento de HLEP proporcione una extensión de la semivida funcional de al menos un 25% en comparación con un FvW de tipo silvestre.

45 La porción HLEP de las estructuras artificiales con inserción de factor de coagulación, propuestas de la invención puede ser una variante de una HLEP normal. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, ya sean conservadoras o no conservadoras, en donde tales cambios no alteran sustancialmente el sitio activo, o el dominio activo que confiere las actividades biológicas del FvW modificado.

50 En particular, las estructuras artificiales de fusión de FvW y HLEP propuestas de la invención pueden incluir variantes naturales polimórficas de HLEPs y fragmentos de HLEPs. La HLEP se puede obtener a partir de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo, ser humano, vaca, oveja o cerdo. Las HLEPs de no

mamífero incluyen, pero no se limitan a, gallina y salmón.

### Albúmina como HLEP

Las expresiones "albúmina de suero humano" (HSA) y "albúmina humana" (HA) y "albúmina" (ALB) se utilizan indistintamente en esta solicitud. Las expresiones "albúmina" y "albúmina de suero" son más amplias, y abarcan albúmina de suero humano (y fragmentos y variantes de la misma), así como albúmina de otras especies (y fragmentos y variantes de las mismas).

Tal como se utiliza en este documento, "albúmina" se refiere colectivamente a un polipéptido o una secuencia de aminoácidos de albúmina, o un fragmento o una variante de albúmina, que tiene una o varias actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas) de albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a la albúmina humana o a fragmentos de la misma, especialmente la forma madura de albúmina humana como se muestra en SEQ ID NO: 38 en este documento o a albúmina de otros vertebrados o fragmentos de las mismas, o análogos o variantes de estas moléculas o fragmentos de las mismas.

En particular, las estructuras artificiales de fusión de FvW propuestas de la invención pueden incluir variantes polimórficas naturales de albúmina humana y fragmentos de albúmina humana. En términos generales, un fragmento o una variante de albúmina tendrá una longitud de al menos 10, preferiblemente al menos 40, lo más preferiblemente más de 70 aminoácidos. La variante de albúmina puede consistir preferentemente en, o alternativamente comprender al menos un dominio completo de la albúmina o fragmentos de dichos dominios, por ejemplo, los dominios 1 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 38), 2 (aminoácidos 195-387 de la SEQ ID NO: 38), 3 (aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 38), 1 + 2 (1-387 de SEQ ID NO: 38), 2 + 3 (195-585 de SEQ ID NO: 38) o 1 + 3 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 38 + aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 38). Cada dominio está compuesto por dos subdominios homólogos, a saber, 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, con regiones enlazadoras flexibles entre los subdominios que comprenden los residuos Lys106 a Glu119, Glu292 a Val315 y Glu492 a Ala511.

La porción de albúmina de las estructuras artificiales de fusión propuestas de FvW de la invención, puede comprender al menos un subdominio o un dominio de HA o modificaciones conservadoras del mismo.

En una realización preferida, el extremo N-terminal de la albúmina se fusiona con el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos del FvW modificado. Es decir, el polipéptido de la presente invención puede tener la estructura:

$$N\text{-mFvW-C-L1-A,}$$

en donde N es una parte N-terminal de FvW, mFvW es el FvW modificado como se ha descrito anteriormente, C es una parte C-terminal de FvW, L1 es un enlace químico o una secuencia enlazadora y A es albúmina tal y como se ha definido anteriormente en esta memoria.

### Inmunoglobulinas como HLEPs

Las regiones constantes (Fc) de la inmunoglobulina G (IgG) son conocidas en la técnica por aumentar la semivida de proteínas terapéuticas (Dumont JA et al., 2006. BioDrugs. 20: 151-160). La región constante de IgG de la cadena pesada consiste en 3 dominios (CH1 - CH3) y una región bisagra. La secuencia de la inmunoglobulina se puede obtener a partir de cualquier mamífero, o de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, respectivamente. IgG y fragmentos de IgG sin un dominio de unión a antígeno también se pueden usar como HLEPs. La porción de polipéptido terapéutico está conectada a IgG o a los fragmentos de IgG preferiblemente a través de la región bisagra del anticuerpo o de un enlazador peptídico, que puede ser incluso escindible. Diversos documentos de patentes y solicitudes de patente describen la fusión de proteínas terapéuticas a regiones constantes de inmunoglobulina para mejorar las semividas *in vivo* de una proteína terapéutica. Los documentos US 2004/0087778 y WO 2005/001025 describen proteínas de fusión de los dominios Fc o al menos porciones de las regiones constantes de inmunoglobulina, con péptidos biológicamente activos que aumentan la semivida del péptido, que de otro modo se eliminaría rápidamente *in vivo*. Se ha descrito que las proteínas de fusión Fc-IFN- $\beta$  logran una mayor actividad biológica, una semivida circulante prolongada y una mayor solubilidad (documento WO 2006/000448). Se han descrito proteínas Fc-EPO con una semivida en suero prolongada y una mayor potencia *in vivo* (documento WO 2005/063808), así como fusiones de Fc con G-CSF (documento WO 2003/076567), péptido similar al glucagón 1 (documento WO 2005/000892), factores de coagulación (documento WO 2004/101740) e interleucina-10 (documento US 6.403.077), todas con propiedades que prolongan la semivida.

En otra realización, la semivida funcional del polipéptido de la invención o de FVIII que forma un complejo con el polipéptido de la invención, se prolonga en comparación con la de FvW de tipo silvestre o la de FVIII que forma un complejo con FvW de tipo silvestre, o con el polipéptido de referencia, tal como se ha definido anteriormente. El aumento puede ser de más del 15%, por ejemplo, al menos del 20% o al menos del 50%. De nuevo, tales valores de semividas funcionales se pueden medir *in vitro* en muestras de sangre tomadas en diferentes intervalos de tiempo a partir de dicho mamífero, después de haber administrado el FvW modificado o el complejo de FVIII con FvW modificado.

En otra realización de la invención, el polipéptido de la invención o FVIII que forma un complejo con el polipéptido de la invención, muestra una mejora en la recuperación *in vivo* en comparación con FvW de tipo silvestre o FVIII que forma un complejo con FvW de tipo silvestre, o con el polipéptido de referencia definido anteriormente. La recuperación *in vivo* se puede determinar *in vivo*, por ejemplo, en animales normales o en modelos animales de hemofilia A, tales como ratones con el gen de FVIII desactivado en los que se esperaría encontrar un mayor porcentaje de FVIII con ensayos de antígenos o de actividad, en la circulación poco después (5 a 10 min) de la administración i.v., en comparación con el correspondiente FvW de tipo silvestre, o el polipéptido de referencia definido anteriormente.

La recuperación *in vivo* se incrementa preferiblemente en al menos un 10%, más preferiblemente en al menos un 20%, e incluso más preferiblemente en al menos un 40% con respecto al FVIII que forma un complejo con FvW de tipo silvestre, o con el polipéptido de referencia definido anteriormente.

En otra realización más de la invención, se emplean como HLEPs regiones constantes de inmunoglobulina o porciones de las mismas. Preferiblemente, se emplea la región Fc compuesta de un dominio CH2 y CH3 y una región bisagra de una IgG, más preferiblemente de una IgG1 o fragmentos o variantes de la misma, variantes que incluyen mutaciones que potencian la unión al receptor de Fc neonatal (FcRn).

### 15 Polinucleótidos

La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica un FvW modificado o un polipéptido que comprende dicho FvW modificado, como se describe en esta solicitud. El término "polinucleótido(s)" se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido que puede ser ARN o ADN no modificado, o ARN o ADN modificado. El polinucleótido puede ser ADN de cadena sencilla o de cadena doble, o ARN de cadena sencilla o de cadena doble. Tal como se utiliza en este documento, el término "polinucleótido(s)" incluye también ADN(s) o ARN(s) que comprenden una o varias bases modificadas y/o bases inusuales, tales como inosina. Se apreciará que se puede realizar una variedad de modificaciones en el ADN y el ARN que sirven para muchos fines útiles conocidos por los expertos en la técnica. El término "polinucleótido(s)", tal y como se emplea en este documento abarca tales formas de polinucleótidos, modificadas química, enzimática o metabólicamente, así como las formas químicas de ADN o ARN características de virus y células, incluyendo, por ejemplo, células simples y complejas.

El experto en la técnica entenderá que debido a la degeneración del código genético, un polipéptido dado puede estar codificado por diferentes polinucleótidos. Estas "variantes" están incluidas en esta invención.

Preferiblemente, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido aislado. El término polinucleótido "aislado" se refiere a un polinucleótido que está sustancialmente exento de otras secuencias de ácidos nucleicos, tales como y no limitadas a, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos. Los polinucleótidos aislados se pueden purificar a partir de una célula hospedadora. Los métodos de purificación convencionales de ácido nucleico conocidos por los técnicos expertos se pueden utilizar para obtener polinucleótidos aislados. El término también incluye polinucleótidos recombinantes y polinucleótidos sintetizados químicamente.

La invención se refiere además a un grupo de polinucleótidos que juntos codifican el FvW modificado de la invención, o el polipéptido de la invención que comprende el FvW modificado. Un primer polinucleótido en el grupo puede codificar la parte N-terminal del FvW modificado, y un segundo polinucleótido puede codificar la parte C-terminal del FvW modificado.

Aún otro aspecto de la invención es un plásmido o un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el plásmido o el vector es un vector de expresión. En una realización particular, el vector es un vector de transferencia para uso en terapia génica humana.

La invención también se refiere a un grupo de plásmidos o vectores que comprende el grupo anterior de polinucleótidos. Un primer plásmido o vector puede contener dicho primer polinucleótido y un segundo plásmido o vector puede contener dicho segundo polinucleótido. Alternativamente, ambas secuencias codificantes se clonan en un vector de expresión, ya sea utilizando dos secuencias promotoras distintas o un promotor y un elemento de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) que se puede utilizar, por ejemplo, para dirigir la expresión de furina para mejorar la generación de FvW maduro.

Todavía otro aspecto de la invención es una célula hospedadora que comprende un polinucleótido, un plásmido o un vector de la invención, o un grupo de polinucleótidos o un grupo de plásmidos o vectores como se describen en el presente documento.

Las células hospedadoras de la invención se pueden emplear en un método para producir un FvW modificado o un polipéptido que comprende dicho FvW modificado, que forma parte de esta invención. El método comprende:

(a) cultivar células hospedadoras de la invención en condiciones tales que se expresa la proteína modificada deseada; y

(b) opcionalmente, recuperar la proteína modificada deseada a partir de las células hospedadoras o del medio de cultivo.

Se prefiere purificar el FvW modificado de la presente invención, o el polipéptido que comprende el FvW modificado hasta con  $\geq 80\%$  de pureza, más preferiblemente  $\geq 95\%$  de pureza, y se prefiere particularmente un estado farmacéuticamente puro que es mayor que una pureza del 99,9%, con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y exento de agentes infecciosos y pirógenos. Preferiblemente, un FvW modificado aislado o purificado de la invención o un polipéptido de la invención está sustancialmente exento de otros polipéptidos no relacionados.

Los diversos productos de la invención son útiles como medicamentos. Por consiguiente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un FvW modificado o un polipéptido que comprende dicho FvW modificado tal y como se describe en el presente documento, un polinucleótido de la invención, o un plásmido o un vector de la invención.

La invención también se refiere a un método para tratar a un individuo que padece un trastorno hemorrágico sanguíneo tal como hemofilia A o B o EvW. El método comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de (i) FVIII y del FvW modificado o el polipéptido que comprende el FvW modificado o (ii) del complejo de FVIII con FvW modificado o (iii) del complejo de FVIII con el polipéptido que comprende FvW modificado, tal y como se describe en el presente documento. En otra realización, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un polinucleótido de la invención o de un plásmido o un vector de la invención. Alternativamente, el método puede comprender administrar al individuo una cantidad eficaz de las células hospedadoras de la invención descritas en el presente documento.

### Expresión de los mutantes propuestos

La producción de proteínas mutantes recombinantes a niveles elevados en células hospedadoras adecuadas requiere ensamblar los ADNc modificados, mencionados anteriormente, en unidades transcripcionales eficaces junto con elementos reguladores adecuados en un vector de expresión recombinante que se puede propagar en diferentes sistemas de expresión, de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los elementos reguladores transcripcionales eficaces se podrían obtener a partir de virus que tienen células animales como sus hospedadores naturales o a partir del ADN cromosómico de células animales. Preferiblemente, se pueden utilizar combinaciones de promotor-potenciador obtenidas a partir del virus de simio 40, adenovirus, virus de polioma BK, citomegalovirus humano o la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, o combinaciones de promotor-potenciador que incluyen genes transcritos fuertemente constitutivos en células animales como beta-actina o GRP78. Con el fin de lograr niveles elevados estables de ARNm transcrito a partir de los ADNc, la unidad transcripcional debe contener en su parte 3' proximal, una región de ADN que codifica una secuencia de terminación de la transcripción-poliadenilación. Preferiblemente, esta secuencia se obtiene a partir de la región transcripcional temprana del virus de simio 40, del gen de beta-globina de conejo o del gen activador de plasminógeno de tejido humano.

Los ADNc se integran después en el genoma de una línea celular hospedadora adecuada para la expresión de las proteínas modificadas de FVIII y/o FvW. Preferiblemente, esta línea celular debería ser una línea celular animal de origen vertebrado, con el fin de asegurar un plegamiento correcto, formación de enlaces disulfuro, glicosilación ligada a asparagina y otras modificaciones posteriores a la traducción, así como la secreción en el medio de cultivo. Ejemplos de otras modificaciones posteriores a la traducción son O-sulfatación de tirosina y el procesamiento proteolítico de la cadena de polipéptido nascente. Ejemplos de líneas celulares que se pueden utilizar, son células COS de mono, células L de ratón, células C127 de ratón, células BHK-21 de hámster, células 292 de riñón embrionario humano y células CHO de hámster.

El vector de expresión recombinante que codifica los ADNc correspondientes se puede introducir en una línea celular animal de varias maneras diferentes. Por ejemplo, se pueden crear vectores de expresión recombinante a partir de vectores basados en diferentes virus animales. Ejemplos de estos son vectores basados en baculovirus, virus vaccinia, adenovirus y preferiblemente virus de papiloma bovino.

Las unidades de transcripción que codifican los ADNc correspondientes también se pueden introducir en células animales junto con otro gen recombinante que puede funcionar como marcador seleccionable dominante en estas células, con el fin de facilitar el aislamiento de clones celulares específicos que han integrado el ADN recombinante en su genoma. Ejemplos de este tipo de genes marcadores seleccionables dominantes son fosfotransferasa de amino glucósido Tn5, que confiere resistencia a la geneticina (G418), fosfotransferasa de higromicina, que confiere resistencia a la higromicina y acetil transferasa de puromicina, que confiere resistencia a la puromicina. El vector de expresión recombinante que codifica un marcador seleccionable de este tipo puede residir en el mismo vector que el que codifica el ADNc de la proteína deseada, o puede estar codificado en otro vector distinto que se introduce simultáneamente y se integra en el genoma de la célula hospedadora, dando como resultado frecuentemente un enlace físico estrecho entre las diferentes unidades transcripcionales.

Otros tipos de genes marcadores seleccionables que se pueden utilizar junto con el ADNc de la proteína deseada, se basan en diversas unidades de transcripción que codifican la dihidrofolato reductasa (dhfr). Después de la introducción de este tipo de genes en células que carecen de actividad dhfr endógena, preferentemente células CHO (DUKX-B11, DG-44), será posible que estas crezcan en medios que carecen de nucleósidos. Un ejemplo de un medio de este tipo es F12 de Ham sin hipoxantina, timidina ni glicina. Estos genes dhfr se pueden introducir junto

con las unidades transcripcionales de ADNc de FVIII en células CHO del tipo anterior, ya sea ligados en el mismo vector o en diferentes vectores, creando de este modo líneas celulares positivas para dhfr que producen proteína recombinante.

5 Si las líneas celulares anteriores se cultivan en presencia del inhibidor citotóxico de dhfr metotrexato, surgirán nuevas líneas celulares resistentes al metotrexato. Estas líneas celulares pueden producir proteína recombinante con una tasa incrementada debido al número amplificado de dhfr ligada y las unidades transcripcionales de proteína deseada. Cuando estas líneas celulares se propagan en concentraciones crecientes de metotrexato (1-10000 nM), se pueden obtener nuevas líneas de células que producen la proteína deseada con una tasa muy elevada.

10 Las líneas celulares anteriores que producen la proteína deseada se pueden cultivar a gran escala, ya sea en cultivo en suspensión o sobre diversos soportes sólidos. Ejemplos de estos soportes son microvehículos basados en matrices de dextrano o de colágeno, o soportes sólidos en forma de fibras huecas o diversos materiales cerámicos. Cuando se cultivan en un cultivo celular en suspensión o en microvehículos, el cultivo de las líneas celulares anteriores se puede realizar bien como un cultivo en baño o como un cultivo en perfusión con producción continua de medio condicionado durante periodos de tiempo extendidos. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, las líneas celulares anteriores son muy adecuadas para el desarrollo de un proceso industrial para la producción de las proteínas mutantes recombinantes deseadas.

### Purificación y formulación

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

25 Un ejemplo de una purificación de este tipo es la adsorción de la proteína mutante recombinante a un anticuerpo monoclonal, dirigido, por ejemplo, a una HLEP, preferiblemente albúmina humana, o dirigido al factor de coagulación respectivo, que está inmovilizado sobre un soporte sólido. Después de la adsorción del FvW modificado al soporte, el lavado y la desorción, la proteína se puede purificar adicionalmente mediante una variedad de técnicas cromatográficas basadas en las propiedades anteriores. El orden de las etapas de purificación se elige, por ejemplo, según la capacidad y la selectividad de las etapas, la estabilidad del soporte u otros aspectos. Las etapas de purificación preferidas son, por ejemplo pero no se limitan a las mismas, etapas de cromatografía de intercambio iónico, etapas de cromatografía por afinidad inmune, etapas de cromatografía por afinidad, etapas de cromatografía por interacción hidrófoba, etapas de cromatografía con tinción, etapas de cromatografía con hidroxiapatita, etapas de cromatografía multimodal y etapas de cromatografía de exclusión por tamaño.

30 Con el fin de minimizar el riesgo teórico de contaminaciones con virus, se pueden incluir etapas adicionales en el procedimiento que permite una inactivación eficaz o una eliminación de los virus. Tales etapas son, por ejemplo, tratamiento térmico en estado líquido o sólido, tratamiento con disolventes y/o detergentes, radiación en el espectro visible o UV, radiación gamma o nanofiltración.

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

40 Las diversas realizaciones descritas en esta memoria se pueden combinar entre sí. La presente invención se describe además con mayor detalle en los siguientes ejemplos de la misma. Esta descripción de realizaciones específicas de la invención se realizará junto con las figuras adjuntas.

El FvW modificado tal y como se describe en esta invención, se puede formular en preparaciones farmacéuticas para uso terapéutico. La proteína purificada se puede disolver en soluciones tampón acuosas fisiológicamente compatibles, convencionales a las que se puede añadir, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas.

45 Tales vehículos y excipientes farmacéuticos así como las formulaciones farmacéuticas adecuadas son bien conocidas en la técnica (véase por ejemplo, "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)). Las técnicas de formulación farmacéutica convencionales son bien conocidas por las personas expertas en la técnica (véase, por ejemplo, 2005 Physicians' Desk Reference®, Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Gennaro et al., compiladores. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000). En particular, la composición farmacéutica que comprende la variante de polipéptido de la invención se puede formular en forma liofilizada o líquida estable. La variante de polipéptido se puede liofilizar a través de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes del uso mediante la adición de uno o varios diluyentes farmacéuticamente aceptables, tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

55 Las formulaciones de la composición se suministran al individuo a través de cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen diversos sistemas de entrega y se pueden usar para administrar la compo-

sición por cualquier vía conveniente. Preferentemente, las composiciones de la invención se administran sistémicamente. Para el uso sistémico, las proteínas de inserción de la invención se formulan para una administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmica) o entérica (por ejemplo, oral, vaginal o rectal) de acuerdo con métodos convencionales. Las rutas de administración más preferidas son la administración intravenosa y subcutánea. Las formulaciones se pueden administrar continuamente mediante infusión o mediante inyección de bolo. Algunas formulaciones incluyen sistemas de liberación lenta.

Las proteínas de inserción de la presente invención se administran a pacientes en una dosis terapéuticamente efectiva, lo que significa una dosis que es suficiente para producir los efectos deseados, prevenir o disminuir la gravedad o la propagación de la afección o indicación que se está tratando, sin llegar a una dosis que produzca efectos secundarios adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores, como por ejemplo, la indicación, la formulación, el modo de administración y se tiene que determinar en ensayos preclínicos y clínicos para cada indicación respectiva.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar sola o en combinación con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden incorporar como parte de la misma composición farmacéutica. Un ejemplo de un agente de este tipo es la combinación de FvW modificado con FVIII no modificado, o la combinación de FvW modificado con FVIII modificado.

Resumen de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos a las que se hace referencia en el presente documento:

**Tabla 3**

SEQ ID NO:	Descripción
1	secuencia de nucleótidos de ADN que codifica SEQ ID NO: 2
2	secuencia de aminoácidos de pre-propolipéptido de FvW humano
3-30	secuencias de nucleótidos de cebadores, véanse los Ejemplos
31	secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW humano
32	secuencia de aminoácidos de FvW maduro humano
33	secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW humano mutado con 15 residuos potencialmente modificados
34	secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW humano mutado con 11 residuos potencialmente modificados
35	secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW humano mutado con 11 residuos potencialmente modificados
36	secuencia de aminoácidos del Factor VIII humano
37	secuencia de aminoácidos de un Factor VIII maduro de cadena sencilla
38	secuencia de aminoácidos de albúmina sérica humana

### Ejemplos:

#### Ejemplo 1: Generación de vectores de expresión para mutantes de FvW

Un plásmido de expresión basado en pIRESpuo3 (Clontech) que contenía una secuencia de ADNc de FvW de longitud completa en su sitio de clonación múltiple se había generado previamente (pVWF 2448). La secuencia de ADNc de FvW contenida en ese vector se muestra como SEQ ID NO: 1, su secuencia de proteínas correspondiente se muestra como SEQ ID NO: 2.

Para la generación de tales vectores de expresión, el ADNc de FvW se puede amplificar mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el conjunto de cebadores FvW+ y FvW- (SEQ ID NO: 3 y 4) en condiciones convencionales conocidas por los expertos en la técnica (y como se describe, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel FM et al. (compiladores.) John Wiley & Sons, Inc.; <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>) a partir de un plásmido que contiene el ADNc de FvW (obtenible comercialmente, por ejemplo, como pMT2-WWF a partir de la ATCC, n° 67122). El fragmento resultante de la PCR se puede digerir con la endonucleasa de restricción EcoRI y ligar en el vector de expresión pIRESpuo3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), que se había linealizado con EcoRI. El plásmido de expresión resultante contendrá un ADNc de tipo silvestre de FvW aguas abajo del promotor CMV.

Con el fin de introducir mutaciones en la secuencia de FvW, se aplicó una mutagénesis dirigida al sitio (QuickChan-

ge XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) sobre el plásmido pVWF-2448 de acuerdo con el siguiente protocolo, según lo sugerido por el fabricante del kit. Para cada reacción de mutagénesis se mezclaron 5 µl de 10x tampón de reacción, 1 µl de ADN del plásmido pVWF-2448 (50 ng), 1 µl (10 pmol/µl) de cada uno de los dos respectivos oligonucleótidos de mutagénesis como se indica en la tabla 4, 1 µl de mezcla de dNTPs, 3 µl de solución Quick, 1 µl de polimerasa Turbo (2,5 U/µl) y 37 µl de H<sub>2</sub>O y se sometieron a una reacción en cadena de la polimerasa con una desnaturalización inicial durante 2 min a 95°C, 18 ciclos de a) desnaturalización durante 50 s a 95°C, b) reasociación durante 50 s a 60°C y c) elongación durante 14 min a 68°C, seguida de una sola fase de elongación terminal de 7 min a 68°C. Posteriormente se añadió 1 µl de enzima DpnI del kit y la reacción se incubó durante otros 60 min a 37°C. Después, 3 µl de la reacción de mutagénesis se transformaron en *E. coli*. Se aislaron los clones, el ADN del plásmido se extrajo y las mutaciones en las secuencias de FvW se verificaron mediante una secuenciación del ADN.

La siguiente tabla 4 enumera los oligonucleótidos usados para la mutagénesis, las mutaciones respectivas introducidas y la designación de los plásmidos resultantes con las secuencias de FvW mutantes.

Tabla 4

SEQ ID NO:	Oligonucleótido	Secuencia de oligonucleótidos para mutagénesis (5' → 3')	Mutación de FvW (de x a y)	Designación del plásmido de expresión
5	We4070	GGTGTGTCCCGCTAACAACTGCCGGGC TG	Asp 779 Asn	pIRES-2462
6	We4071	CAGCCCGCAGGTTGTTAGCGGGACACA CC		
7	We4072	GTCCCGCTGACAACCCTCGGGCTGAAG GG	Leu 781 Pro	pIRES-2463
8	We4073	CCCTTCAGCCCGAGGGTTGTCAGCGGG AC		
9	We4074	CTGAAGGGCTCGAGTGTGCCAAAACGT GCCAGAAC	Thr 789 Ala	pIRES-2464
10	We4075	GTTCTGGCACGTTTTGGCACACTCGAGC CCTTCAG		
11	We4076	GTGTACCAAACGTGCCGGAACATGAC CTGGAGTGC	Gln 793 Arg	pIRES-2465
12	We4077	GCACTCCAGGTCATAGTTCCGGCACGTT TTGGTACAC		
13	We4078	GTACCAAACGTGCCAGAAGTATGACCT GGAGTGC	Asn 794 Lys	pIRES-2466
14	We4079			

ES 2 651 523 T3

SEQ ID NO:	Oligonucleótido	Secuencia de oligonucleótidos para mutagénesis (5' → 3')	Mutación de FvW (de x a y)	Designación del plásmido de expresión
		GCACTCCAGGTCATACTTCTGGCACGTT TTGGTAC		
15	We4080	CTGGAGTGCATGAGCAGGGGCTGTGTC TCTGGCTG	Met 802 Arg	pIRES-2467
16	We4081	CAGCCAGAGACACAGCCCCTGCTCATG CACTCCAG		
17	We4082	CTGGAGTGCATGAGCAAGGGCTGTGTCT CTGGCTG	Met 802 Lys	pIRES-2468
18	We4083	CAGCCAGAGACACAGCCCCTGCTCATGC ACTCCAG		
19	We4084	CATGGTCCGGCATGCCAACAGATGTGTG GCCCTG	Glu 818 Ala	pIRES-2469
20	We4085	CAGGGCCACACATCTGTTGGCATGCCG GACCATG		
21	We4086	CATGGTCCGGCATAAGAACAGATGTGTG GCCCTG	Glu 818 Lys	pIRES-2470
22	We4087	CAGGGCCACACATCTGTTCTTATGCCGG ACCATG		
23	We4088	GGTCCGGCATGAGAAGAGATGTGTGGC CCTG	Asn 819 Lys	pIRES-2471
24	We4089	CAGGGCCACACATCTTCTCATGCCGG ACC		
25	We4090	GCTTCCATCAGGGCAAGCAGTATGCCCC TGGAGAAAC	Glu 835 Gln	pIRES-2472
26	We4091	GTTTCTCCAGGGGCATACTGCTTGCCCT GATGGAAGC		
27	We4092		Pro 838 Lys	pIRES-2473

SEQ ID NO:	Oligonucleótido	Secuencia de oligonucleótidos para mutagénesis (5' → 3')	Mutación de FvW (de x a y)	Designación del plásmido de expresión
		GGGCAAGGAGTATGCCAAGGGAGAAAC AGTGAAGATTGG		
28	We4093	CCAATCTTCACTGTTTCTCCCTTGGCATA CTCCTTGCCC		
29	We4094	CGGAACCGGAAGTGGAACTGCACAGAC CATGTGTG	Asp 853 Asn	pIRES-2474
30	We4095	CACACATGGTCTGTGCAGTTCCACTTCC GGTTCCG		

### Ejemplo 2: Transfección de plásmidos y expresión de mutantes de FvW en células HEK-293

Los plásmidos de expresión se cultivaron en *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se purificaron utilizando protocolos convencionales (Qiagen, Hilden, Alemania). Las células HEK-293 se transfectaron usando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se cultivaron en medio exento de suero (Invitrogen 293 Express) en presencia de 4 µg/ml de puomicina. Las poblaciones de células transfectadas se propagaron a través de matraces T a matraces de agitación a partir de los cuales se recogió el material sobrenadante para una cuantificación de antígeno FvW y análisis Biacore.

### Ejemplo 3: Cuantificación del antígeno FvW

El antígeno FvW en el material sobrenadante del cultivo se determinó mediante un ELISA cuya realización es conocida por los expertos en la técnica. Brevemente, se incubaron microplacas con 100 µl por pocillo del anticuerpo de captura (IgG de conejo anti-FvW humano, Dako A0082 [Dako, Hamburgo, Alemania], diluido 1:2000 en tampón A [Sigma C3041, Sigma-Aldrich, Múnich, Alemania]) durante una noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas tres veces con tampón B (Sigma P3563), cada pocillo se incubó con 200 µl de tampón C (Sigma P3688) durante 1,5 horas a temperatura ambiente (bloqueo). Después de otras tres etapas de lavado con tampón B, se incubaron diluciones en serie de la muestra de ensayo en tampón B, así como diluciones en serie de plasma humano estándar (ORKL21; 20 - 0,2 mU/ml; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania) en tampón B (volúmenes por pocillo: 100 µl) durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado con tampón B, se añadieron 100 µl de una dilución 1:16000 en tampón B del anticuerpo de detección (IgG de conejo anti-FvW humano Dako P0226, marcada con peroxidasa) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado con tampón B, se añadieron 100 µl de solución de sustrato (OUVF, Siemens Healthcare Diagnostics) por pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µl de dilución de parada sin diluir (OSFA, Siemens Healthcare Diagnostics) preparaba las muestras para la lectura en un lector de microplacas adecuado, a 450 nm de longitud de onda. Las concentraciones de las muestras de ensayo se calcularon después usando una curva estándar con plasma humano estándar como referencia.

### Ejemplo 4: Análisis de la unión de mutantes de FvW a FVIII

Todos los ensayos de unión se llevaron a cabo usando un instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare) y chips CM 3. El tampón del sistema y el tampón de dilución para los productos de FVIII es HBS-P (20 mmol/L de Hepes, 100 mmol/l de NaCl, 0,005% de polisorbato 20, pH 7,3). Un anticuerpo monoclonal anti-FvW que no interfiere con la unión de FVIII se inmoviliza mediante el uso de química de acoplamiento de amino de Biacore. Todos los ensayos de inmovilización, saturación y unión se llevan a cabo a una temperatura controlada de 25°C.

El anticuerpo monoclonal anti-FvW se une covalentemente a un chip CM 3 activado mediante NHS y EDC (ambos de GE Healthcare), un acoplamiento en el que el anticuerpo se fija en su extremo amino-terminal a los filamentos de dextrano sobre la superficie de oro del chip. Para la inmovilización, el anticuerpo monoclonal se diluye hasta 10 µg/ml en acetato de sodio 10 mM (pH 4,5). La solución de anticuerpo circula sobre el chip durante 8 minutos con un caudal de 5 µl/min.

Después del procedimiento de inmovilización, los filamentos de dextrano no acoplados están saturados por el flujo

de etanolamina 1 M (pH 8,3) sobre el chip durante 5 min (caudal de 5 µl/min). Una celda de flujo de referencia se establece mediante la saturación de una celda de flujo vacía con etanolamina utilizando el mismo procedimiento que el anterior.

5 Los mutantes de FvW se inmovilizan con el anticuerpo monoclonal anti-FvW acoplado covalentemente mediante el flujo de mutantes de FvW (en el material sobrenadante del cultivo) sobre el chip hasta su saturación con un caudal de 5 µl/min.

10 Para la evaluación de la unión de mutantes de FvW a FVIII, una preparación de FVIII se diluye en serie en tampón HBS-P, por ejemplo, a concentraciones de 0,3125 µg/ml, 0,625 µg/ml, 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml y 5 µg/ml. Una muestra de cada dilución circula sobre el chip durante 12 min (caudal 10 µl/ml), seguido de un tiempo de disociación de 5 min con tampón HBS-P. Después de cada ejecución, el chip se lava con CaCl<sub>2</sub> 250 mM durante 3 min para eluir el FVIII unido a FvW. A continuación, el mutante de FvW se retira mediante un lavado con glicina 10 mM (pH 2,1) durante 4 min y el siguiente mutante de FvW se une al chip como se ha descrito anteriormente.

15 Los parámetros de unión se calculan utilizando el programa informático BIAevaluation (Biacore, GE Healthcare). Los métodos de ajuste de la curva se basan en ecuaciones de Langmuir. Los datos de entrada para los cálculos son las masas molares de los analitos, otros parámetros como máx. RU y las pendientes se extraen automáticamente de las curvas de asociación y disociación ajustadas. Las salidas del programa informático BIAevaluation son las constantes de la tasa de asociación y las constantes de la tasa de disociación, a partir de las cuales se calculan las constantes de afinidad.

#### LISTA DE SECUENCIAS

- 20 <110> CSL Behring GmbH
- <120> Variantes del Factor de von Willebrand que tienen una afinidad de unión al Factor VIII mejorada
- <130> A187
- <150> EP12155509.8  
< 151> 2012-02-15
- 25 <160> 38
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1  
< 211> 8442  
< 212> ADN
- 30 < 213> Homo sapiens

ES 2 651 523 T3

<400> 1  
atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt gccagggacc 60  
ctttgtgcag aaggaactcg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct tttcgggaagt 120  
gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg cagttacctc 180  
ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca gaatggcaag 240  
agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttgtt tgtcaatggt 300  
accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg gctgtatcta 360  
gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt ggccaggatc 420  
gatggcagcg gcaactttca agtccctctg tcagacagat acttcaacaa gacctgcggg 480  
ctgtgtggca actttaacat ctttctgtaa gatgacttta tgaccaaga agggaccttg 540  
acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga acagtgggtg 600  
gaacgggcat ctctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat gcagaagggc 660  
ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcgggtg ttgcccgctg ccacctctg 720  
gtggaccccg agccttttgt ggcctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg tgctgggggg 780  
ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccgga cctgtgcca ggagggaaatg 840  
gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc tggatggag 900  
tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat caatgaaatg 960  
tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgccctgagg gacagctcct ggatgaaggc 1020  
ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta ccctcccggc 1080  
acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg gatctgcagc 1140  
aatgaagaat gtccagggga gtgccttctc acaggtcaat cacacttcaa gagctttgac 1200  
aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga ttgccaggac 1260

ES 2 651 523 T3

cactccttct	ccattgtcat	tgagactgtc	cagtgtgtctg	atgaccgcga	cgctgtgtgc	1320
acccgctccg	tcaccgtccg	gctgcctggc	ctgcacaaca	gccttgtgaa	actgaagcat	1380
ggggcaggag	ttgccatgga	tggccaggac	gtccagctcc	ccctcctgaa	aggtgacctc	1440
cgcatccagc	atacagtjac	ggcctccgtg	cgccctcagct	acggggagga	cctgcagatg	1500
gactgggatg	gccgcgggag	gctgctggtg	aagctgtccc	ccgtctatgc	cggaagacc	1560
tgcggcctgt	gtgggaatta	caatggcaac	cagggcgacg	acttccttac	cccctctggg	1620
ctggcggagc	cccgggtgga	ggacttcggg	aacgcctgga	agctgcacgg	ggactgccag	1680
gacctgcaga	agcagcacag	cgatccctgc	gccctcaacc	cgcgcatgac	caggttctcc	1740
gaggaggcgt	gcgcggtcct	gacgtccccc	acattcgagg	cctgccatcg	tgccgtcagc	1800
ccgctgccct	acctgcggaa	ctgccgctac	gacgtgtgct	cctgctcgga	cggccgcgag	1860
tgccctgtcg	gcgccctggc	cagctatgcc	gcggcctgcg	cggggagagg	cggtgcgcgtc	1920
gcgtggcgcg	agccaggccc	ctgtgagctg	aactgcccca	aaggccaggt	gtacctgcag	1980
tgcgggaccc	cctgcaacct	gacctgccgc	tctctctctt	acccggatga	ggaatgcaat	2040
gaggcctgcc	tggagggctg	cttctgcccc	ccagggctct	acatggatga	gaggggggac	2100
tgctgcccc	aggcccagtg	cccctgttac	tatgacggtg	agatcttcca	gccagaagac	2160
atcttctcag	accatcacac	catgtgctac	tgtgaggatg	gcttcatgca	ctgtaccatg	2220
agtggagtcc	ccggaagctt	gctgcctgac	gctgtcctca	gcagtcccct	gtctcatcgc	2280
agcaaaagga	gcctatcctg	tcggcccccc	atggtcaagc	tggtgtgtcc	cgctgacaac	2340
ctgcgggctg	aagggctcga	gtgtacccaa	acgtgccaga	actatgacct	ggagtgcacg	2400
agcatgggct	gtgtctctgg	ctgcctctgc	ccccgggca	tggtccggca	tgagaacaga	2460
tgtgtggccc	tggaaaggtg	tcctgcttcc	catcagggca	aggagtatgc	ccctggagaa	2520
acagtgaaga	ttggctgcaa	cacttgtgtc	tgtcgggacc	ggaagtggaa	ctgcacagac	2580
catgtgtgtg	atgccacgtg	ctccaogatc	ggcatggccc	actacctcac	cttcgacggg	2640
ctcaaatacc	tgttcccccg	ggagtgccag	tacgttctgg	tgcaaggatta	ctgcggcagt	2700
aaccctggga	cctttcggat	cctagtgggg	aataagggat	gcagccacct	ctcagtgaaa	2760
tgcaagaaac	gggtcaccat	cctggtggag	ggaggagaga	ttgagctggt	tgacggggag	2820
gtgaatgtga	agaggcccat	gaaggatgag	actcactttg	aggtggtgga	gtctggccgg	2880
tacatcattc	tgctgctggg	caaagccctc	tcogtggctc	gggaccgcca	cctgagcatc	2940
tccgtggctc	tgaagcagac	ataccaggag	aaagtgtgtg	gcctgtgtgg	gaattttgat	3000
ggcatccaga	acaatgacct	caccagcagc	aacctccaag	tggaggaaga	ccctgtggac	3060
tttgggaact	cctggaaaagt	gagctcgcag	tgtgctgaca	ccagaaaagt	gcctctggac	3120

ES 2 651 523 T3

tcatccctg ccacctgcc taacaacatc atgaagcaga cgatggtgga ttctctctgt 3180  
 agaatcotta ccagtgaagt cttccaggac tgcaacaagc tggaggacc cgagccatat 3240  
 ctggatgtct gcatttacga cacctgctcc tgtgagtcca ttggggactg cgctgcttc 3300  
 tgcgacacca ttgctgccta tgcccacgtg tgtgccagc atggcaaggt ggtgacctgg 3360  
 aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga gaacgggtat 3420  
 gagtgtgagt ggcgctataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg tcagcacctt 3480  
 gagccactgg cctgcctgtg gcagtgtgtg gagggtgccc atgccactg ccctccaggg 3540  
 aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgacctg aagactgtcc agtgtgtgag 3600  
 gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaaag aaagtcacct tgaatcccag tgacctgag 3660  
 cactgccaga tttgccactg tgatgtgtc aacctcacct gtgaagcctg ccaggagccg 3720  
 ggaggcctgg tggtgccctc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct gtatgtggag 3780  
 gacatctcgg aaccgctgtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgga cctggtcttc 3840  
 ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagttt aagtgtgaa gccctttgtg 3900  
 gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc cgtggtggag 3960  
 taccagcagc gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc gtcagagctg 4020  
 cggcgcattg ccagccaggt gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac cagcaggtc 4080  
 ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc ctcccgcac 4140  
 gccctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt tgtccgctac 4200  
 gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatccggg tgggcattgg gcccocatgc 4260  
 aacctcaagc agatccgct catcgagaag caggccctg agaacaaggc ctctgtgtg 4320  
 agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct ctgtgacctt 4380  
 gccctgaag cccctcctcc tactctgccc cccacatgg cacaagtca tgtgggccc 4440  
 gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccattggtct ggatgtggcg 4500  
 ttcgtcctgg aaggatcggg caaaattggt gaagccgact tcaacaggag caaggagttc 4560  
 atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggcaggaca gcatccacgt cacggtgctg 4620  
 cagtactcct acatggtgac cgtggagtac cccttcagcg aggcacagtc caaaggggac 4680  
 atcctgcagc ggggtcgaga gatccgtac cagggcggca acaggaccaa cactgggctg 4740  
 gccctgctgt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg ggagcaggcg 4800  
 cccaacctgg tctacatggt caccggaat cctgcctctg atgagatcaa gaggctgcct 4860  
 ggagacatcc aggtgtgtcc cattggagtg ggcctaatg ccaacgtgca ggagctggag 4920  
 aggattggct ggcccattgc ccctatctc atccaggact ttgagacgct cccccgagag 4980  
 gctcctgacc tgggtctgca gaggtgctgc tcgggagagg ggtgagat ccccaccctc 5040

ES 2 651 523 T3

tccccctgcac	ctgactgcag	ccagcccctg	gacgtgatcc	ttctcctgga	tggtcctcc	5100
agtttcccag	cttcttattt	tgatgaaatg	aagagtttcg	ccaaggcttt	catttcaaaa	5160
gccaatatag	ggcctcgtct	cactcaggtg	tcagtgtctgc	agtatggaag	catcaccacc	5220
attgacgtgc	catggaacgt	ggccccggag	aaagcccatt	tgctgagcct	tgtggacgtc	5280
atgcagcggg	agggaggccc	cagccaaatc	gggatgcct	tggtctttgc	tgtgcgatac	5340
ttgacttcag	aaatgcatgg	ggcgcgcccg	ggagcctcaa	aggcgggtgt	catcctggtc	5400
acggacgtct	ctgtggattc	agtggatgca	gcagctgatg	ccgccaggtc	caacagagtg	5460
acagtgttcc	ctattggaat	tggagatcgc	tacgatgcag	cccagctacg	gatcttgga	5520
ggcccagcag	gcgactccaa	cgtggtgaag	ctccagcgaa	tcgaagacct	ccctaccatg	5580
gtcaccttgg	gcaattcctt	cctccacaaa	ctgtgctctg	gatttgtag	gatttgcatg	5640
gatgaggatg	ggaatgagaa	gaggcccggg	gacgtctgga	ccttgccaga	ccagtgccac	5700
accgtgactt	gccagccaga	tggccagacc	ttgctgaaga	gtcatcgggt	caactgtgac	5760
cgggggctga	ggccttcgtg	ccctaacagc	cagtcccctg	ttaaagtgga	agagacctgt	5820
ggctgccgct	ggacctgccc	ctgcgtgtgc	acaggcagct	ccactcggca	catcgtgacc	5880
tttgatgggc	agaatttcaa	gctgactggc	agctgttctt	atgtcctatt	tcaaaacaag	5940
gagcaggacc	tggaggtgat	tctccataat	ggtgcctgca	gccctggagc	aaggcagggc	6000
tgcatgaaat	ccatcgaggt	gaagcacagt	gccctctccg	tcgagctgca	cagtgcacatg	6060
gaggtgacgg	tgaatgggag	actggtctct	gttccttacg	tgggtgggaa	catggaagtc	6120
aacgtttatg	gtgccatcat	gcatgaggtc	agattcaatc	accttgggtca	catcttcaca	6180
ttcactccac	aaaacaatga	gttccaactg	cagctcagcc	ccaagacttt	tgcttcaaaag	6240
acgtatggtc	tgtgtgggat	ctgtgatgag	aacggagcca	atgacttcat	gctgagggat	6300
ggcacagtca	ccacagactg	gaaaacactt	gttcaggaat	ggactgtgca	gcggccaggg	6360
cagacgtgcc	agcccatcct	ggaggagcag	tgtcttgtcc	ccgacagctc	ccactgccag	6420
gtcctcctct	taccactggt	tgctgaatgc	cacaaggtcc	tggctccagc	cacattctat	6480
gccatctgcc	agcaggacag	ttgccaccag	gagcaagtgt	gtgaggtgat	cgctcttat	6540
gccacacctc	gtcggaccaa	cgggtctgct	gttgactgga	ggacacctga	tttctgtgct	6600
atgtcatgcc	caccatctct	ggtttataac	cactgtgagc	atggtgtcc	ccggcactgt	6660
gatggcaacg	tgagctcctg	tggggacat	ccctccgaag	gctgtttctg	ccctccagat	6720
aaagtcatgt	tggaaggcag	ctgtgtccct	gaagaggcct	gcactcagtg	cattggtgag	6780
gatggagtcc	agcaccagtt	cctggaagcc	tgggtcccgg	accaccagcc	ctgtcagatc	6840
tgcacatgcc	tcagcgggcg	gaaggtcaac	tgcacaacgc	agccctgccc	cacggccaaa	6900

ES 2 651 523 T3

gctcccacgt gtggcctgtg tgaagtagcc cgcctccgcc agaatgcaga ccagtgtctgc 6960  
 cccgagtatg agtgtgtgtg tgacccagtg agctgtgacc tgcccccagt gcctcactgt 7020  
 gaacgtggcc tccagcccac actgaccaac cctggcaggt gcagacccaa cttcacctgc 7080  
 gcctgcagga aggaggagtg caaaagagtg tccccaccct cctgcccccc gcaccgttg 7140  
 cccacccttc ggaagaccca gtgctgtgat gagtatgagt gtgcctgcaa ctgtgtcaac 7200  
 tccacagtga gctgtocctt tgggtacttg gcctcaaccg ccaccaatga ctgtggctgt 7260  
 accacaacca cctgcottcc cgacaagggt tgtgtccacc gaagcaccat ctaccctgtg 7320  
 ggccagtctt gggaggaggg ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga ggatgccgtg 7380  
 atgggcctcc gcgtggccca gtgctcccag aagccctgtg aggacagctg tccgtcgggc 7440  
 ttcacttacg ttctgcatga aggcgagtgc tgtggaaggt gcctgccatc tgcctgtgag 7500  
 gtggtgactg gctcaaccgc gggggactcc cagtcttctt ggaagagtgt cggctcccag 7560  
 tgggcctccc cggagaaccc ctgcctcatc aatgagtgtg tccgagtgaa ggaggaggtc 7620  
 tttatacaac aaaggaacgt ctctgcccc cagctggagg tccctgtctg cccctcgggc 7680  
 tttcagctga gctgtaagac ctacagctgc tgcccaagct gtcgctgtga gcgcatggag 7740  
 gcctgcatgc tcaatggcac tgtcattggg cccgggaaga ctgtgatgat cgatgtgtgc 7800  
 acgacctgcc gctgcatggt gcaggtgggg gtcatctctg gattcaagct ggagtgcagg 7860  
 aagaccacct gcaaccctg ccccctgggt tacaaggaag aaaataacac aggtgaatgt 7920  
 tgtgggagat gtttgctac ggcttgacc attcagctaa gaggaggaca gatcatgaca 7980  
 ctgaagcgtg atgagacgct ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa ggtcaatgag 8040  
 agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggtgcc caccotttga tgaacacaag 8100  
 tgtctggctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgctgtga cacatgtgag 8160  
 gagcctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaaggtggg aagctgtaag 8220  
 tctgaagtag aggtggatat ccactactgc cagggcaaat gtgccagcaa agccatgtac 8280  
 tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgctcctgct gctctccgac acggacggag 8340  
 cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtaccatga ggttctcaat 8400  
 gccatggagt gcaaatgctc ccccaggaag tgcagcaagt ga 8442

<210> 2  
 < 211> 2813  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

5

<400> 2  
 Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile  
 1 5 10 15

ES 2 651 523 T3

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr  
 20 25 30  
 Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly  
 35 40 45  
 Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly  
 50 55 60  
 Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys  
 65 70 75 80  
 Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu  
 85 90 95  
 Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro  
 100 105 110  
 Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys  
 115 120 125  
 Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly  
 130 135 140  
 Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly  
 145 150 155 160  
 Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln  
 165 170 175  
 Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala  
 180 185 190  
 Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser  
 195 200 205  
 Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln  
 210 215 220  
 Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu  
 225 230 235 240  
 Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu  
 245 250 255  
 Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala  
 260 265 270

ES 2 651 523 T3

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His  
 275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys  
 290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met  
 305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu  
 325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His  
 340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn  
 355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys  
 370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp  
 385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg  
 405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys  
 420 425 430

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn

ES 2 651 523 T3

515	520	525																			
Gly	Asn	Gln	Gly	Asp	Asp	Phe	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Leu	Ala	Glu	Pro						
530						535					540										
Arg	Val	Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Ala	Trp	Lys	Leu	His	Gly	Asp	Cys	Gln						
545					550					555					560						
Asp	Leu	Gln	Lys	Gln	His	Ser	Asp	Pro	Cys	Ala	Leu	Asn	Pro	Arg	Met						
				565					570					575							
Thr	Arg	Phe	Ser	Glu	Glu	Ala	Cys	Ala	Val	Leu	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe						
			580					585					590								
Glu	Ala	Cys	His	Arg	Ala	Val	Ser	Pro	Leu	Pro	Tyr	Leu	Arg	Asn	Cys						
		595					600					605									
Arg	Tyr	Asp	Val	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Gly	Arg	Glu	Cys	Leu	Cys	Gly						
	610					615					620										
Ala	Leu	Ala	Ser	Tyr	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Arg	Gly	Val	Arg	Val						
625					630					635					640						
Ala	Trp	Arg	Glu	Pro	Gly	Arg	Cys	Glu	Leu	Asn	Cys	Pro	Lys	Gly	Gln						
				645					650					655							
Val	Tyr	Leu	Gln	Cys	Gly	Thr	Pro	Cys	Asn	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Leu						
			660					665					670								
Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Glu	Cys	Asn	Glu	Ala	Cys	Leu	Glu	Gly	Cys	Phe						
		675					680					685									
Cys	Pro	Pro	Gly	Leu	Tyr	Met	Asp	Glu	Arg	Gly	Asp	Cys	Val	Pro	Lys						
		690				695					700										
Ala	Gln	Cys	Pro	Cys	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Glu	Ile	Phe	Gln	Pro	Glu	Asp						
705					710					715					720						
Ile	Phe	Ser	Asp	His	His	Thr	Met	Cys	Tyr	Cys	Glu	Asp	Gly	Phe	Met						
				725					730					735							
His	Cys	Thr	Met	Ser	Gly	Val	Pro	Gly	Ser	Leu	Leu	Pro	Asp	Ala	Val						
			740					745					750								
Leu	Ser	Ser	Pro	Leu	Ser	His	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg						
		755					760						765								

ES 2 651 523 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 651 523 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr  
1235 1240 1245

Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser  
1250 1255 1260

ES 2 651 523 T3

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

ES 2 651 523 T3

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

ES 2 651 523 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 651 523 T3

Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp  
 1970 1975 1980  
  
 Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg  
 1985 1990 1995  
  
 Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser  
 2000 2005 2010  
  
 Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu  
 2015 2020 2025  
  
 Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr  
 2030 2035 2040  
  
 Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile  
 2045 2050 2055  
  
 Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser  
 2060 2065 2070  
  
 Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys  
 2075 2080 2085  
  
 Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val  
 2090 2095 2100  
  
 Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg  
 2105 2110 2115  
  
 Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys Leu Val  
 2120 2125 2130  
  
 Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala  
 2135 2140 2145  
  
 Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys  
 2150 2155 2160  
  
 Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala  
 2165 2170 2175  
  
 Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp  
 2180 2185 2190  
  
 Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val  
 2195 2200 2205

ES 2 651 523 T3

Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn  
 2210 2215 2220  
 Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro  
 2225 2230 2235  
 Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala  
 2240 2245 2250  
 Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu  
 2255 2260 2265  
 Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys  
 2270 2275 2280  
 Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr  
 2285 2290 2295  
 Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg  
 2300 2305 2310  
 Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp  
 2315 2320 2325  
 Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly  
 2330 2335 2340  
 Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe  
 2345 2350 2355  
 Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro  
 2360 2365 2370  
 Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys  
 2375 2380 2385  
 Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val  
 2390 2395 2400  
 Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys  
 2405 2410 2415  
 Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His  
 2420 2425 2430  
 Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys

ES 2 651 523 T3

2435						2440										2445
Asp	Val	Cys	Thr	Cys	Thr	Asp	Met	Glu	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Leu		
2450						2455					2460					
Arg	Val	Ala	Gln	Cys	Ser	Gln	Lys	Pro	Cys	Glu	Asp	Ser	Cys	Arg		
2465						2470					2475					
Ser	Gly	Phe	Thr	Tyr	Val	Leu	His	Glu	Gly	Glu	Cys	Cys	Gly	Arg		
2480						2485					2490					
Cys	Leu	Pro	Ser	Ala	Cys	Glu	Val	Val	Thr	Gly	Ser	Pro	Arg	Gly		
2495						2500					2505					
Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Trp	Ala	Ser		
2510						2515					2520					
Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg	Val	Lys	Glu		
2525						2530					2535					
Glu	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro	Gln	Leu	Glu		
2540						2545					2550					
Val	Pro	Val	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser		
2555						2560					2565					
Ala	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg	Cys	Glu	Arg	Met	Glu	Ala	Cys	Met		
2570						2575					2580					
Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Pro	Gly	Lys	Thr	Val	Met	Ile	Asp		
2585						2590					2595					
Val	Cys	Thr	Thr	Cys	Arg	Cys	Met	Val	Gln	Val	Gly	Val	Ile	Ser		
2600						2605					2610					
Gly	Phe	Lys	Leu	Glu	Cys	Arg	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn	Pro	Cys	Pro		
2615						2620					2625					
Leu	Gly	Tyr	Lys	Glu	Glu	Asn	Asn	Thr	Gly	Glu	Cys	Cys	Gly	Arg		
2630						2635					2640					
Cys	Leu	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Ile	Gln	Leu	Arg	Gly	Gly	Gln	Ile		
2645						2650					2655					
Met	Thr	Leu	Lys	Arg	Asp	Glu	Thr	Leu	Gln	Asp	Gly	Cys	Asp	Thr		
2660						2665					2670					

ES 2 651 523 T3

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

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

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

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

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

Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp  
 2750 2755 2760

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

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

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

Arg Lys Cys Ser Lys  
 2810

5

<210> 3  
 < 211> 30  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Cebador FvW+

10

<400> 3  
 ttcgaattcc cgcagccctc attgcaggg 30

<210> 4  
 < 211> 31  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

15

<220>  
 < 223> Cebador FvW-

<400> 4  
 tccgaattcc ggcagcagca ggcacccatg c 31

20

<210> 5  
 < 211> 29  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

ES 2 651 523 T3

<220>  
 < 223> Cebador We4070

<400> 5  
 ggtgtgtccc gctaacaacc tgcgggctg 29

5 <210> 6  
 < 211> 29  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

10 <220>  
 < 223> Cebador We4071

<400> 6  
 cagccccgag gttgtagcg ggacacacc 29

15 <210> 7  
 < 211> 29  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

20 <220>  
 < 223> Cebador We4072

<400> 7  
 gtcccgtga caaccctcg gctgaaggg 29

25 <210> 8  
 < 211> 29  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Cebador We4073

<400> 8  
 ccctcagcc cgagggtgt cagcgggac 29

30 <210> 9  
 < 211> 35  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Cebador We4074

35 <400> 9  
 ctgaagggt cgagtgtgcc aaaacgtgcc agaac 35

40 <210> 10  
 < 211> 35  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Cebador We4075

<400> 10  
 gtctggcac gtttggcac actcgagccc tcag 35

ES 2 651 523 T3

<210> 11  
 < 211> 37  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

5      <220>  
          < 223> Cebador We4076

<400> 11  
 gtgtacaaa acgtgccgga actatgacct ggagtg      37

10      <210> 12  
          < 211> 37  
          < 212> ADN  
          < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Cebador We4077

15      <400> 12  
          gcactccagg tcatagtcc ggcacgtttt ggtacac      37

20      <210> 13  
          < 211> 35  
          < 212> ADN  
          < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Cebador We4078

<400> 13  
 gtacaaaaac gtgccagaag tatgacctgg agtgc      35

25      <210> 14  
          < 211> 35  
          < 212> ADN  
          < 213> Secuencia artificial

30      <220>  
          < 223> We4079

<400> 14  
 gcactccagg tcatactct ggcacgtttt ggtac      35

35      <210> 15  
          < 211> 35  
          < 212> ADN  
          < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Cebador We4080

40      <400> 15  
          ctggagtgca tgagcagggg ctgtgtctct ggctg      35

<210> 16  
 < 211> 35  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

ES 2 651 523 T3

<220>  
 < 223> Cebador We4081  
  
 <400> 16  
 cagccagaga cacagcccct gctcatgcac tccag 35  
  
 5 <210> 17  
 < 211> 35  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial  
  
 10 <220>  
 < 223> Cebador We4082  
  
 <400> 17  
 ctggagtgca tgagcaaggg ctgtgtctct ggctg 35  
  
 15 <210> 18  
 < 211> 35  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 < 223> Cebador We4083  
  
 20 <400> 18  
 cagccagaga cacagcccctt gctcatgcac tccag 35  
  
 <210> 19  
 < 211> 34  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 < 223> Cebador We4084  
  
 <400> 19  
 catggtccgg catgccaaca gatgtgtggc cctg 34  
  
 30 <210> 20  
 < 211> 34  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 < 223> Cebador We4085  
  
 35 <400> 20  
 cagggccaca catctgttgg catgccggac catg 34  
  
 <210> 21  
 < 211> 34  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 < 223> Cebador We4086  
  
 <400> 21  
 catggtccgg cataagaaca gatgtgtggc cctg 34

ES 2 651 523 T3

<210> 22  
< 211> 34  
< 212> ADN  
< 213> Secuencia artificial

5 <220>  
< 223> Cebador We4087

<400> 22  
cagggccaca catctgttct tatgccggac catg 34

10 <210> 23  
< 211> 31  
< 212> ADN  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Cebador We4088

15 <400> 23  
gtgccggcat gagaagagat gtgtggcct g 31

<210> 24  
< 211> 31  
< 212> ADN  
20 < 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Cebador We4089

<400> 24  
cagggccaca catcttctct catgccggac c 31

25 <210> 25  
< 211> 37  
< 212> ADN  
< 213> Secuencia artificial

30 <220>  
< 223> Cebador We4090

<400> 25  
gcttccatca gggcaagcag tatgccctg gaaaaac 37

35 <210> 26  
< 211> 37  
< 212> ADN  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Cebador We4091

40 <400> 26  
gtttctccag gggcactactg cttgccctga tggaagc 37

<210> 27  
< 211> 39  
< 212> ADN  
< 213> Secuencia artificial

# ES 2 651 523 T3

<220>  
< 223> Cebador We4092

<400> 27  
gggcaaggag tatgccaagg gagaaacagt gaagattgg 39

5 <210> 28  
< 211> 39  
< 212> ADN  
< 213> Secuencia artificial

10 <220>  
< 223> Cebador We4093

<400> 28  
ccaatctca ctgttctcc ctggcatac tcctgccc 39

15 <210> 29  
< 211> 35  
< 212> ADN  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Cebador We4094

20 <400> 29  
cggaaaccgga agtggaactg cacagacat gtgtg 35

<210> 30  
< 211> 35  
< 212> ADN  
< 213> Secuencia artificial

25 <220>  
< 223> Cebador We4095

<400> 30  
cacacatggt ctgtgcagtt ccactccgg ttccg 35

30 <210> 31  
< 211> 102  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

ES 2 651 523 T3

<400> 31

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp  
1 5 10 15

Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr  
20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro  
35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys  
50 55 60

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys  
65 70 75 80

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr  
85 90 95

Asp His Val Cys Asp Ala  
100

<210> 32

< 211> 2050

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5

<400> 32

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp  
1 5 10 15

Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr  
20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro  
35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys  
50 55 60

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys  
65 70 75 80

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr  
85 90 95

ES 2 651 523 T3

Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr  
 100 105 110

Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr  
 115 120 125

Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile  
 130 135 140

Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys  
 145 150 155 160

Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly  
 165 170 175

Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val  
 180 185 190

Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser  
 195 200 205

Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr  
 210 215 220

Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln  
 225 230 235 240

Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val  
 245 250 255

Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg  
 260 265 270

Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met  
 275 280 285

Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val  
 290 295 300

Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val  
 305 310 315 320

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys  
 325 330 335

Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly  
 340 345 350

ES 2 651 523 T3

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



ES 2 651 523 T3

Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro  
850 855 860

Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly  
865 870 875 880

Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg  
885 890 895

Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu  
900 905 910

Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp  
915 920 925

Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe  
930 935 940

Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile  
945 950 955 960

Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr  
965 970 975

Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu  
980 985 990

Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly  
995 1000 1005

Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His  
1010 1015 1020

Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr  
1025 1030 1035

Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg  
1040 1045 1050

Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr  
1055 1060 1065

Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser  
1070 1075 1080

Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val  
1085 1090 1095

ES 2 651 523 T3

Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val  
 1100 1105 1110

Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp  
 1115 1120 1125

Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro  
 1130 1135 1140

Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg  
 1145 1150 1155

Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val  
 1160 1165 1170

Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr  
 1175 1180 1185

Gly Ser Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe  
 1190 1195 1200

Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu  
 1205 1210 1215

Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly  
 1220 1225 1230

Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala  
 1235 1240 1245

Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly  
 1250 1255 1260

Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn  
 1265 1270 1275

Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly  
 1280 1285 1290

His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln  
 1295 1300 1305

Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly  
 1310 1315 1320

Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly  
 1325 1330 1335

ES 2 651 523 T3

Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val  
1340 1345 1350

Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys  
1355 1360 1365

Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu  
1370 1375 1380

Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala  
1385 1390 1395

Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val  
1400 1405 1410

Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val  
1415 1420 1425

Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser  
1430 1435 1440

Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp  
1445 1450 1455

Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe  
1460 1465 1470

Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu  
1475 1480 1485

Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln  
1490 1495 1500

Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys  
1505 1510 1515

Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys  
1520 1525 1530

Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg  
1535 1540 1545

Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val  
1550 1555 1560

Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu

ES 2 651 523 T3

1565						1570								1575
Arg Gly	Leu Gln	Pro Thr	Leu	Thr Asn	Pro Gly	Glu	Cys Arg	Pro						
1580			1585			1590								
Asn Phe	Thr Cys	Ala Cys	Arg	Lys Glu	Glu Cys	Lys	Arg Val	Ser						
1595			1600			1605								
Pro Pro	Ser Cys	Pro Pro	His	Arg Leu	Pro Thr	Leu	Arg Lys	Thr						
1610			1615			1620								
Gln Cys	Cys Asp	Glu Tyr	Glu	Cys Ala	Cys Asn	Cys	Val Asn	Ser						
1625			1630			1635								
Thr Val	Ser Cys	Pro Leu	Gly	Tyr Leu	Ala Ser	Thr	Ala Thr	Asn						
1640			1645			1650								
Asp Cys	Gly Cys	Thr Thr	Thr	Thr Cys	Leu Pro	Asp	Lys Val	Cys						
1655			1660			1665								
Val His	Arg Ser	Thr Ile	Tyr	Pro Val	Gly Gln	Phe	Trp Glu	Glu						
1670			1675			1680								
Gly Cys	Asp Val	Cys Thr	Cys	Thr Asp	Met Glu	Asp	Ala Val	Met						
1685			1690			1695								
Gly Leu	Arg Val	Ala Gln	Cys	Ser Gln	Lys Pro	Cys	Glu Asp	Ser						
1700			1705			1710								
Cys Arg	Ser Gly	Phe Thr	Tyr	Val Leu	His Glu	Gly	Glu Cys	Cys						
1715			1720			1725								
Gly Arg	Cys Leu	Pro Ser	Ala	Cys Glu	Val Val	Thr	Gly Ser	Pro						
1730			1735			1740								
Arg Gly	Asp Ser	Gln Ser	Ser	Trp Lys	Ser Val	Gly	Ser Gln	Trp						
1745			1750			1755								
Ala Ser	Pro Glu	Asn Pro	Cys	Leu Ile	Asn Glu	Cys	Val Arg	Val						
1760			1765			1770								
Lys Glu	Glu Val	Phe Ile	Gln	Gln Arg	Asn Val	Ser	Cys Pro	Gln						
1775			1780			1785								
Leu Glu	Val Pro	Val Cys	Pro	Ser Gly	Phe Gln	Leu	Ser Cys	Lys						
1790			1795			1800								

ES 2 651 523 T3

Thr Ser Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala  
 1805 1810 1815

Cys Met Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met  
 1820 1825 1830

Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val  
 1835 1840 1845

Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro  
 1850 1855 1860

Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys  
 1865 1870 1875

Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly  
 1880 1885 1890

Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys  
 1895 1900 1905

Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp  
 1910 1915 1920

Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys  
 1925 1930 1935

Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys  
 1940 1945 1950

Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu  
 1955 1960 1965

Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp  
 1970 1975 1980

Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser  
 1985 1990 1995

Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro  
 2000 2005 2010

Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly  
 2015 2020 2025

Ser Val Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys  
 2030 2035 2040

Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys  
 2045 2050

<210> 33  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

- <220>  
< 223> Dominio D' modificado de FvW
- 5  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (16)..(16)  
< 223> Xaa es cualquier aminoácido
- 10  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (18)..(18)  
< 223> Xaa es Leu o Pro
- 15  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (24)..(24)  
< 223> Xaa es cualquier aminoácido
- 20  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (26)..(26)  
< 223> Xaa es cualquier aminoácido
- 25  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (30)..(30)  
< 223> Xaa es cualquier aminoácido
- 30  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (31)..(31)  
< 223> Xaa es cualquier aminoácido
- 35  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (33)..(33)  
< 223> Xaa es cualquier aminoácido
- 40  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (35)..(35)  
< 223> Xaa es cualquier aminoácido
- 45  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (39)..(39)  
< 223> Xaa es cualquier aminoácido
- 50  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (55)..(55)  
< 223> Xaa es cualquier aminoácido
- 55  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (56)..(56)  
< 223> Xaa es cualquier aminoácido
- 60  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (62)..(62)  
< 223> Xaa es cualquier aminoácido

ES 2 651 523 T3

<220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (72)..(72)  
 < 223> Xaa es cualquier aminoácido

5  
 <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (75)..(75)  
 < 223> Xaa es cualquier aminoácido

10  
 <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (90)..(90)  
 < 223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 33  
 Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Xaa  
 1 5 10 15  
 Asn Xaa Arg Ala Glu Gly Leu Xaa Cys Xaa Lys Thr Cys Xaa Xaa Tyr  
 20 25 30  
 Xaa Leu Xaa Cys Met Ser Xaa Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro  
 35 40 45  
 Pro Gly Met Val Arg His Xaa Xaa Arg Cys Val Ala Leu Xaa Arg Cys  
 50 55 60  
 Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Xaa Tyr Ala Xaa Gly Glu Thr Val Lys  
 65 70 75 80  
 Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Xaa Arg Lys Trp Asn Cys Thr  
 85 90 95  
 Asp His Val Cys Asp Ala  
 100

15  
 <210> 34  
 < 211> 102  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 < 223> dominio D' modificado

<220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (16)..(16)  
 < 223> Xaa es cualquier aminoácido

25  
 <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (18)..(18)  
 < 223> Xaa es cualquier aminoácido

30  
 <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (26)..(26)  
 < 223> Xaa es cualquier aminoácido

# ES 2 651 523 T3

```

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (30)..(30)
< 223> Xaa es cualquier aminoácido

5
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (31)..(31)
< 223> Xaa es cualquier aminoácido

10
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (39)..(39)
< 223> Xaa es cualquier aminoácido

15
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (55)..(55)
< 223> Xaa es cualquier aminoácido

20
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (56)..(56)
< 223> Xaa es cualquier aminoácido

25
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (72)..(72)
< 223> Xaa es cualquier aminoácido

30
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (75)..(75)
< 223> Xaa es cualquier aminoácido

30
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (90)..(90)
< 223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 34
Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Xaa
1          5          10          15

```

ES 2 651 523 T3

Asn Xaa Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Xaa Lys Thr Cys Xaa Xaa Tyr  
 20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Xaa Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro  
 35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Xaa Xaa Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys  
 50 55 60

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Xaa Tyr Ala Xaa Gly Glu Thr Val Lys  
 65 70 75 80

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Xaa Arg Lys Trp Asn Cys Thr  
 85 90 95

Asp His Val Cys Asp Ala  
 100

- 5 <210> 35  
 < 211> 102  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial
  
- <220>  
 < 223> dominio D' modificado
  
- 10 <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (16)..(16)  
 < 223> Xaa es Asp o Asn
  
- 15 <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (18)..(18)  
 < 223> Xaa es Leu o Pro
  
- 20 <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (26)..(26)  
 < 223> Xaa es Thr o Ala
  
- <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (30)..(30)  
 < 223> Xaa es Gln o Arg
  
- 25 <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (31)..(31)  
 < 223> Xaa es Asn o Lys
  
- 30 <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (39)..(39)  
 < 223> Xaa es Met o Arg o Lys
  
- <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE

ES 2 651 523 T3

< 222> (55)..(55)  
 < 223> Xaa Glu o Ala o Lys

5 <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (56)..(56)  
 < 223> Xaa Asn o Lys

10 <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (72)..(72)  
 < 223> Xaa Glu o Gln

15 <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (75)..(75)  
 < 223> Xaa Pro o Lys

15 <220>  
 < 221> MISC\_FEATURE  
 < 222> (90)..(90)  
 < 223> Xaa Asp o Asn

<400> 35  
 Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Xaa  
 1 5 10 15

Asn Xaa Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Xaa Lys Thr Cys Xaa Xaa Tyr  
 20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Xaa Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro  
 35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Xaa Xaa Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys  
 50 55 60

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Xaa Tyr Ala Xaa Gly Glu Thr Val Lys  
 65 70 75 80

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Xaa Arg Lys Trp Asn Cys Thr  
 85 90 95

20 Asp His Val Cys Asp Ala  
 100

<210> 36  
 < 211> 2332  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25 <400> 36  
 Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr



ES 2 651 523 T3

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu  
 260 265 270

Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile  
 275 280 285

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly  
 290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met  
 305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg  
 325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp  
 340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe  
 355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His  
 370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu  
 385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro  
 405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr  
 420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile  
 435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile  
 450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile  
 465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys  
 485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys  
 500 505 510

ES 2 651 523 T3

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys  
515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala  
530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp  
545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe  
565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln  
580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe  
595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser  
610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu  
625 630 635 640

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

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

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

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

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

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

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Arg Ser Thr Arg  
740 745 750

Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys  
755 760 765

ES 2 651 523 T3

Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn  
 770 775 780

Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro  
 785 790 795 800

His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe  
 805 810 815

Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser  
 820 825 830

Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val  
 835 840 845

Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly  
 850 855 860

Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser  
 865 870 875 880

Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala  
 885 890 895

Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His  
 900 905 910

Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro  
 915 920 925

Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp  
 930 935 940

Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp  
 945 950 955 960

Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys  
 965 970 975

Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys  
 980 985 990

Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala  
 995 1000 1005

Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu

ES 2 651 523 T3

1010		1015		1020
Asn Ser 1025	Pro Ser Val Trp	Gln 1030	Asn Ile Leu	Glu Ser Asp Thr Glu 1035
Phe Lys 1040	Lys Val Thr Pro	Leu 1045	Ile His Asp Arg	Met Leu Met Asp 1050
Lys Asn 1055	Ala Thr Ala Leu	Arg 1060	Leu Asn His Met	Ser Asn Lys Thr 1065
Thr Ser 1070	Ser Lys Asn Met	Glu 1075	Met Val Gln Gln	Lys Lys Glu Gly 1080
Pro Ile 1085	Pro Pro Asp Ala	Gln 1090	Asn Pro Asp Met	Ser Phe Phe Lys 1095
Met Leu 1100	Phe Leu Pro Glu	Ser 1105	Ala Arg Trp Ile	Gln Arg Thr His 1110
Gly Lys 1115	Asn Ser Leu Asn	Ser 1120	Gly Gln Gly Pro	Ser Pro Lys Gln 1125
Leu Val 1130	Ser Leu Gly Pro	Glu 1135	Lys Ser Val Glu	Gly Gln Asn Phe 1140
Leu Ser 1145	Glu Lys Asn Lys	Val 1150	Val Val Gly Lys	Gly Glu Phe Thr 1155
Lys Asp 1160	Val Gly Leu Lys	Glu 1165	Met Val Phe Pro	Ser Ser Arg Asn 1170
Leu Phe 1175	Leu Thr Asn Leu	Asp 1180	Asn Leu His Glu	Asn Asn Thr His 1185
Asn Gln 1190	Glu Lys Lys Ile	Gln 1195	Glu Glu Ile Glu	Lys Lys Glu Thr 1200
Leu Ile 1205	Gln Glu Asn Val	Val 1210	Leu Pro Gln Ile	His Thr Val Thr 1215
Gly Thr 1220	Lys Asn Phe Met	Lys 1225	Asn Leu Phe Leu	Leu Ser Thr Arg 1230
Gln Asn 1235	Val Glu Gly Ser	Tyr 1240	Asp Gly Ala Tyr	Ala Pro Val Leu 1245

ES 2 651 523 T3

Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys  
 1250 1255 1260

His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu  
 1265 1270 1275

Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys  
 1280 1285 1290

Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr  
 1295 1300 1305

Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu  
 1310 1315 1320

Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr  
 1325 1330 1335

Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr  
 1340 1345 1350

Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser  
 1355 1360 1365

Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala  
 1370 1375 1380

Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser  
 1385 1390 1395

Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser  
 1400 1405 1410

Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val  
 1415 1420 1425

Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu  
 1430 1435 1440

Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu  
 1445 1450 1455

Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys  
 1460 1465 1470

Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr  
 1475 1480 1485

ES 2 651 523 T3

Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys  
1490 1495 1500

Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu  
1505 1510 1515

Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile  
1520 1525 1530

Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg  
1535 1540 1545

Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp  
1550 1555 1560

Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu  
1565 1570 1575

Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys  
1580 1585 1590

Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His  
1595 1600 1605

Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu  
1610 1615 1620

Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln  
1625 1630 1635

Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr  
1640 1645 1650

Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile  
1655 1660 1665

Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp  
1670 1675 1680

Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr  
1685 1690 1695

Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser  
1700 1705 1710

Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro  
1715 1720 1725

ES 2 651 523 T3

Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe  
 1730 1735 1740

Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu  
 1745 1750 1755

Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val  
 1760 1765 1770

Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser  
 1775 1780 1785

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg  
 1790 1795 1800

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys  
 1805 1810 1815

Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys  
 1820 1825 1830

Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His  
 1835 1840 1845

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu  
 1850 1855 1860

Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu  
 1865 1870 1875

Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu  
 1880 1885 1890

Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu  
 1895 1900 1905

Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly  
 1910 1915 1920

Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln  
 1925 1930 1935

Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile  
 1940 1945 1950

His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys

ES 2 651 523 T3

1955		1960		1965
Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe 1970		1975		1980
Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val 1985		1990		1995
Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu 2000		2005		2010
Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala 2015		2020		2025
Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr 2030		2035		2040
Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser 2045		2050		2055
Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val 2060		2065		2070
Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly 2075		2080		2085
Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile 2090		2095		2100
Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn 2105		2110		2115
Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser 2120		2125		2130
Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr 2135		2140		2145
Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg 2150		2155		2160
Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu 2165		2170		2175
Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser 2180		2185		2190

ES 2 651 523 T3

Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala  
2195 2200 2205

Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val  
2210 2215 2220

Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met  
2225 2230 2235

Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr  
2240 2245 2250

Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly  
2255 2260 2265

His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe  
2270 2275 2280

Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp  
2285 2290 2295

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp  
2300 2305 2310

Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala  
2315 2320 2325

Gln Asp Leu Tyr  
2330

<210> 37  
<211> 1444  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Factor VIII de cadena sencilla maduro

<400> 37  
Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr  
1 5 10 15

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

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

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro



ES 2 651 523 T3

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met  
 305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg  
 325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp  
 340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe  
 355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His  
 370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu  
 385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro  
 405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr  
 420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile  
 435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile  
 450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile  
 465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys  
 485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys  
 500 505 510

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys  
 515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala  
 530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp  
 545 550 555 560

ES 2 651 523 T3

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe  
565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln  
580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe  
595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser  
610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu  
625 630 635 640

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

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

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

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

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

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

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Arg Ser Thr Arg  
740 745 750

Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Thr Thr Leu Gln  
755 760 765

Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met  
770 775 780

Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro  
785 790 795 800

Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu  
805 810 815

ES 2 651 523 T3

Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn  
820 825 830

Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln  
835 840 845

Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu  
850 855 860

Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu  
865 870 875 880

Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser  
885 890 895

Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala  
900 905 910

Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe  
915 920 925

Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys  
930 935 940

Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His  
945 950 955 960

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn  
965 970 975

Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe  
980 985 990

Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu  
995 1000 1005

Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr  
1010 1015 1020

Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met  
1025 1030 1035

Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg  
1040 1045 1050

Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile

ES 2 651 523 T3

1055		1060		1065
His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr 1070		1075		1080
Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val 1085		1090		1095
Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu 1100		1105		1110
Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val 1115		1120		1125
Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His 1130		1135		1140
Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp 1145		1150		1155
Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala 1160		1165		1170
Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu 1175		1180		1185
Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln 1190		1195		1200
Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser 1205		1210		1215
Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly 1220		1225		1230
Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys 1235		1240		1245
His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu 1250		1255		1260
His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu 1265		1270		1275
Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu 1280		1285		1290

ES 2 651 523 T3

Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe  
 1295 1300 1305

Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His  
 1310 1315 1320

Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro  
 1325 1330 1335

Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr  
 1340 1345 1350

Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr  
 1355 1360 1365

Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp  
 1370 1375 1380

Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn  
 1385 1390 1395

Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu  
 1400 1405 1410

Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln  
 1415 1420 1425

Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu  
 1430 1435 1440

Tyr

<210> 38  
 <211> 585  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 38  
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu  
 1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln  
 20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu  
 35 40 45

ES 2 651 523 T3

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

ES 2 651 523 T3

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg  
 325 330 335  
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr  
 340 345 350  
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu  
 355 360 365  
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro  
 370 375 380  
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu  
 385 390 395 400  
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro  
 405 410 415  
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys  
 420 425 430  
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys  
 435 440 445  
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His  
 450 455 460  
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser  
 465 470 475 480  
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr  
 485 490 495  
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp  
 500 505 510  
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
 515 520 525  
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu  
 530 535 540  
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys  
 545 550 555 560  
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val  
 565 570 575  
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
 580 585

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un Factor de von Willebrand modificado (FvW),  
 en donde la secuencia de aminoácidos de dicho FvW modificado tiene al menos una mutación dentro del dominio D' en relación con la secuencia de aminoácidos del dominio D' de FvW de tipo silvestre como se muestra en SEQ ID NO: 31,
- 5 y en donde la afinidad de la unión de dicho polipéptido que comprende un FvW modificado, con el Factor VIII (FVIII) es mayor que la de un polipéptido de referencia, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido de referencia es idéntica a la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido que comprende un FvW modificado excepto que la secuencia de aminoácidos del dominio D' del polipéptido de referencia es idéntica a SEQ ID NO: 31.
- 10 2. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que
- (a) la afinidad de la unión del polipéptido con el Factor VIII supera la del polipéptido de referencia en al menos 10 por ciento; y/o
- (b) la constante de disociación  $K_D$  de un complejo del polipéptido y el Factor VIII de SEQ ID NO: 37 es menor del 90% de la constante de disociación  $K_D$  de un complejo del polipéptido de referencia y el Factor VIII de SEQ ID NO: 37.
- 15 3. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha al menos una mutación dentro del dominio D' incluye una sustitución de aminoácidos en donde la afinidad de la unión con FVIII se ha incrementado mediante (i) una sustitución de al menos un residuo ácido del dominio D' de FvW con un aminoácido neutro o básico, (ii) mediante una sustitución de al menos un residuo neutro del dominio D' de FvW con un aminoácido básico, y/o (iii) mediante una sustitución de al menos un residuo del dominio D' de FvW con un aminoácido diferente que está presente en la misma posición en uno o varios polimorfos u ortólogos de FvW que tienen un dominio D' diferente de SEQ ID NO: 31.
- 20 4. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además una proteína que mejora la semivida (HLEP), preferiblemente dicha HLEP es una albúmina, más preferiblemente el extremo N-terminal de la albúmina se fusiona con el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos de FvW.
- 25 5. Un complejo que comprende una molécula de Factor VIII y el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. El complejo según la reivindicación 5, en el que el Factor VIII es el polipéptido de SEQ ID NO: 37, y en donde la constante de disociación  $K_D$  del complejo es menor que el 90% de la constante de disociación  $K_D$  de un complejo del polipéptido de referencia y el Factor VIII de SEQ ID NO: 37.
- 30 7. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el complejo según la reivindicación 5 o 6, para uso en el tratamiento o la profilaxis de un trastorno hemorrágico.
8. El polipéptido o el complejo para uso en el tratamiento o la profilaxis de un trastorno hemorrágico según la reivindicación 7, en donde el trastorno hemorrágico es la enfermedad de von Willebrand (EvW) o la hemofilia A.
- 35 9. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el complejo según la reivindicación 5 o 6.
10. Un polinucleótido que codifica el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
11. Un plásmido o un vector, preferiblemente un vector de expresión, que comprende el polinucleótido según la reivindicación 10.
- 40 12. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido según la reivindicación 10 o el plásmido según la reivindicación 11.
13. Un método para producir un polipéptido que comprende un FvW modificado, que comprende:
- (a) cultivar las células hospedadoras según la reivindicación 12 en condiciones tales que se expresa el polipéptido que comprende un FvW modificado; y
- 45 (b) opcionalmente recuperar el polipéptido que comprende un FvW modificado a partir de las células hospedadoras o del medio de cultivo.
14. Un FvW modificado que tiene afinidad hacia FVIII mayor que un FvW no modificado para uso en un método para incrementar la semivida de FVIII, en donde dicho FvW modificado es el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

15. Un método para preparar un complejo que comprende FVIII y FvW, que comprende mezclar un FVIII con el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.